

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

12+

Том 10 N 3

2020



ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ

**Прикладная химия
и биотехнология**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ

ИРКУТСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия
и биотехнология

Том 10 N 3 2020



ИЗДАТЕЛЬСТВО
Иркутского национального исследовательского
технического университета



ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия и биотехнология
Том 10 N 3 2020

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 10 N 3 2020
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. Iolovich

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

Фарион И.А., Могнонов Д.М., Хахинов В.В., Литвинова М.А., Ильина О.В., Аюрова О.Ж. Синтез и исследование олигобензотриазолилимидов.....	376
Бабадеев Д.В., Строганова Е.А. Синтез и идентификация 1,1,3,3-тетра-[1,2-дигидро-1,5-диметил-2-фенил-3-оксопиразол]пропана.....	386
Танганов Б.Б. Прикладные аспекты кислотно-основных взаимодействий и моделирование равновесных концентраций в двухкомпонентных смесях кислот.....	393

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Павловская Н.Е., Гагарина И.Н., Гаврилова А.Ю., Бородин Д.Б. Испытание влияния новых биоpestицидов на возбудителей болезней овощей с применением ДНК-маркеров.....	401
Цивилева О.М., Перфильева А.И., Павлова А.Г. Влияние металлсодержащих биокомпозиов грибного происхождения на растения картофеля <i>in vitro</i>	412
Шафикова Т.Н., Омеличкина Ю.В. Эволюция взглядов на иммунитет растений: от закона Н.Н. Флог «ген-на-ген» до «зигзаг модели» J. Jones и J. Dangl.....	424
Китаевская С.В., Решетник О.А. Влияние низкотемпературной обработки на активность протеолитических ферментов различных видов муки.....	439
Кузакова О.В., Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Гончарова А.М. Регуляция активности аденилатциклаз клеток корня гороха пероксидом водорода при инфицировании патогенами и мутуалистом.....	450
Ха Т.З., Канарский А.В., Канарская З.А., Щербаков А.В., Щербакова Е.Н., Пранович А.В. Влияние условий культивирования на продуцирование ксиланазы и рост бактерий <i>Paenibacillus mucilaginosus</i>	459
Коцупий О.В., Загурская Ю.В., Уфимцев В.И. Определение фенольных соединений в водно-этанольных экстрактах листьев <i>Populus tremula</i> L. с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	470
Коростелев А.В., Рукавицын П.В., Новикова И.В., Кучменко Т.А., Умарханов Р.У., Муравьев А.С. Исследование ароматобразующих компонентов хмеля с применением химических сенсоров.....	479
Кирюхина А.С., Лозовая Т.С., Привалова Е.А., Федосеева В.Г., Оборина Е.Н., Адамович С.Н., Розенцвейг И.Б. Протатраны – биомодуляторы роста дрожжей <i>Candida ethanolica</i>	487
Чикишев Д.В., Абрамов Н.В., Ларина Н.С., Шерстобитов С.В. Формирование химического состава зерна яровой пшеницы при различном уровне минерального питания.....	496
Комиссаров А.В., Бибииков Д.Н., Бадарин С.А., Синицына Н.В., Костылева Н.И., Овчинникова М.В., Коровкина Г.И., Зинина О.С., Плотников И.А., Никифоров А.К. Разработка расчетной зависимости для оценки величины потери массы при лиофилизации диагностических препаратов.....	506
Гамаюрова В.С., Давлетшина Г.А. Особенности поведения фермента панкреатической липазы при рециклизации в процессах синтеза бутилбутирата в неводных средах.....	515

ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

Белозерова О.В., Коваленко В.В., Шакирова Э.В. Исследование состава и свойств нефти Ичѣдинского месторождения.....	522
Баяндин В.В., Шаглаева Н.С., Подгорбунская Т.А., Лукьянов Н.Д., Минаев Н.В., Макаров С.С. ИК-спектроскопия и рентгенография промышленного суспензионного поливинилхлорида.....	529

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Прозорова Г.Ф., Емельянов А.И., Коржова С.А. Новые функциональные сополимеры 1-винил-1,2,4-триазола с аллиламином.....	536
--	-----

CONTENTS

CHEMICAL SCIENCES

Farion I.A., Mogonov D.M., Khakhinov V.V., Litvinova M.A., Il'ina O.V., Ayurova O.Zh. Synthesis and study of oligobenzotriazolylimides.....	376
Babadeev D.V., Stroganova E.A. Synthesis and identification of 1,1,3,3-tetra-[1,2-dihydro-1,5-dimethyl-2-phenyl-3-oxopyrazole]propane.....	386
Tanganov B.B. Applied aspects of acid-base interactions and modelling equilibrium concentrations in two-component acid mixtures.....	393

PHYSICAL-CHEMICAL BIOLOGY

Pavlovskaya N.E., Gagarina I.N., Gavrilova A.Yu., Borodin D.B. Testing the effect of new biopesticides on soilborne pathogens of vegetable diseases using DNA markers.....	401
Tsvileva O.M., Perfileva A.I., Pavlova A.G. The effect of metal-containing biocomposites of fungal origin on potato plants <i>in vitro</i>	412
Shafikova T.N., Omelichkina Yu.V. Evolution of views on plant immunity: from Flor's "gene-for-gene" theory to the "zig-zag model" developed by Jones and Dangl.....	424
Kitaevskaya S.V., Reshetnik O.A. Effects of low-temperature treatment on the activity of proteolytic enzymes in various flour types.....	439
Kuzakova O.V., Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Goncharova A.M. Regulation of the activity of adenylate cyclases by hydrogen peroxide in pea root cells infected with pathogens and a mutualist.....	450
Kha T.Z., Kanarskiy A.V., Kanarskaya Z.A., Scherbakov A.V., Scherbakova E.N., Prano-vich A.V. Impact of cultivation conditions on xylanase production and growth in <i>Paenibacillus mucilaginosus</i>	459
Kotsupiy O.V., Zagurskaya Yu.V., Ufimtsev V.I. Determination of phenolic compounds in water-ethanol extracts of <i>Populus tremula</i> L. leaves using high-performance liquid chromatog-raphy.....	470
Korostelev A.V., Rukavitsyn P.V., Novikova I.V., Kuchmenko T.A., Umarchanov R.U., Muravev A.S. Study of hop aroma components using chemical sensors.....	479
Kiryukhina A.S., Lozovaya T.S., Privalova E.A., Fedoseeva V.G., Oborina E.N., Ada-movich S.N., Rozentsveig I.B. Protatrans as biomodulators of <i>Candida ethanolica</i> growth.....	487
Chikishev D.V., Abramov N.V., Larina N.S., Sherstobitov S.V. Chemical composition of spring wheat at different levels of mineral nutrition.....	496
Komissarov A.V., Bibikov D.N., Badarin S.A., Sinitsyna N.V., Kostyleva N.I., Ovchinni-kova M.V., Korovkina G.I., Zinina O.S., Plotnikov I.A., Nikiforov A.K. Calculation of depend-ences for estimating the amount of weight loss during lyophilization of diagnostic preparations....	506
Gamaurova V.S., Davletshina G.A. Behaviour of pancreatic lipase enzyme during recy-clization when synthesizing butyl butyrate in non-aqueous media	515

CHEMICAL TECHNOLOGY

Belozeroва O.V., Kovalenko V.V., Shakirova E.V. Study of the composition and properties of crude oil mined at the Ichyodinskoye field.....	522
Bayandin V.V., Shaglaeva N.S., Podgorbunskaya T.A., Lukyanov N.D., Minaev N.V., Makarov C.C. IR spectroscopy and X-ray diffraction analysis of industrial polyvinyl chloride sus-pension.....	529

BRIEF COMMUNICATION

Prozorova G.F., Emel'yanov A.I., Korzhova S.A. New functional copolymers of 1-vinyl-1,2,4-triazole with allylamine.....	536
--	-----

Оригинальная статья / Original article

УДК 541.64:542.954

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-376-385>



Синтез и исследование олигобензотриазолилимидов

© И.А. Фарин*, Д.М. Могнонов^{*,**}, В.В. Хахинов^{**}, М.А. Литвинова^{***},
О.В. Ильина*, О.Ж. Аюрова*

*Байкальский институт природопользования СО РАН, г. Улан-Удэ, Российская Федерация

**Бурятский государственный университет, г. Улан-Удэ, Российская Федерация,

***Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления,
г. Улан-Удэ, Российская Федерация

Резюме: Миграционная сополимеризация бис-имидов ненасыщенных дикарбоновых кислот с нуклеофилами, такими как диамины, бис-фенолы, бис-меркаптаны, позволяет достаточно легко получать трехмерные гетероциклические полимеры. Такие азотсодержащие термостойкие полимеры представляют практический интерес, поскольку имеют высокие эксплуатационные показатели, а также ввиду доступности исходного сырья. Для получения термостойких полимерных материалов предложен синтез олигобензотриазолилимидов взаимодействием бис-малеимидов с бензотриазолами. Одностадийный синтез в расплаве без выделения побочных продуктов в отсутствие органических растворителей является наиболее приемлемым с технологической и экологической точек зрения. Для поиска оптимальных условий синтеза полимеров был использован метод композиционного ортогонального планирования, где параметром оптимизации была выбрана приведенная вязкость, переменными факторами, влияющими на параметр оптимизации, были исходная концентрация мономеров, продолжительность и температура синтеза. Исследовано строение, свойства и механические характеристики полимеров. Строение олигомеров и полимеров подтверждено данными ИК- и ЯМР-спектроскопии. Проведены эксперименты по использованию экструзионно-прокатной технологии литья для получения композиционных материалов на основе олигобензотриазолилимидов. Данная технология получения композиционных материалов увеличивает время нахождения исходных веществ в текучем состоянии. Меньшая скорость отверждения олигомеров способствует тому, что теплота, выделяемая при структурировании, успевает рассеиваться, не вызывая локальных перегревов материала и возникающих вследствие этого механических напряжений. Это улучшает технологические и физико-механические характеристики композитов на основе данных олигомеров. Выявлены оптимальные условия получения полимерных композиций, изучены физико-механические свойства, разработана технология получения материалов, устойчивых к действию агрессивных сред и перепадам температуры.

Ключевые слова: 1Н-бензотриазол, олигомеры, полимеры, N-фенилмалеимид, метилен-бис-(бензотриазолилсукцинимид), нуклеофильное присоединение

Благодарность: Исследование выполнено в рамках государственного задания РАН, проект № 0339-2019-0006.

Информация о статье: Дата поступления 26 июля 2020 г.; дата принятия к печати 31 августа 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2020 г.

Для цитирования: Фарин И.А., Могнонов Д.М., Хахинов В.В., Литвинова М.А., Ильина О.В., Аюрова О.Ж. Синтез и исследование олигобензотриазолилимидов. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 3. С. 376–385. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-376-385>

Synthesis and study of oligobenzotriazolylimides

Ivan A. Farion*, Dmitry M. Mogonov^{*,**}, Vyacheslav V. Khakhinov^{**},
Marianna A. Litvinova^{***}, Olga V. Il'ina*, Oksana Zh. Ayurova*

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

**Buryat State University, Ulan-Ude, Russian Federation

***East Siberian State University of Technology and Management,
Ulan-Ude, Russian Federation

Abstract: Three-dimensional heterocyclic polymers can be obtained by the migration copolymerization of bis-imides of unsaturated dicarboxylic acids and such nucleophiles as diamines, bisphenols and bismercaptans. As-obtained nitrogen-containing heat-resistant polymers are of practical interest due to their high per-

formance and the availability of the feedstock. In this work, we propose to obtain heat-resistant polymeric materials through the synthesis of oligobenzotriazolylimides by interaction of bis-maleimides with benzotriazoles. One-stage melt synthesis producing no by-products and requiring no organic solvents seems to be the most suitable method from the technological and environmental standpoint. Optimal conditions for the synthesis of polymers were determined using the method of compositional orthogonal planning. Reduced viscosity was chosen as the optimization parameter; the initial concentration of monomers, as well the duration and temperature of synthesis, were the variable factors affecting the optimization parameter. The structure, properties and mechanical characteristics of the obtained polymers were studied. The structure of oligomers and polymers was confirmed by IR and NMR spectroscopy data. A series of experiments was carried out to investigate the potential of extrusion-rolling casting technology for obtaining composite materials based on oligobenzotriazolylimides. This technology maintains initial substances in a fluid state for an extended period of time. The slower curing rate of oligomers facilitates the dissipation of the heat released during structuring, thus causing no local overheating of the material and resulting mechanical stresses. This improves the technological and physical-mechanical characteristics of the composites based on these oligomers. Optimal conditions for the production of polymer composites were identified, and their physical and mechanical properties were studied. A technology was proposed for obtaining materials resistant to aggressive media and temperature drops.

Keywords: 1H-benzotriazole, oligomers, polymers, N-phenylmaleimide, methylene bis- (benzotriazolylsuccinimide), nucleophilic addition

Acknowledgments: The study was carried out under the State task of the Russian Academy of Sciences (project no. 0339-2019-0006).

Information about the article: Received July 26, 2020; accepted for publication August 31, 2020; available online September 30, 2020.

For citation: Farion IA, Mogonov DM, Khakhinov VV, Litvinova MA, Il'ina OV, Ayurova OZh. Synthesis and study of oligobenzotriazolylimides. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):376–385. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-376-385>

ВВЕДЕНИЕ

Миграционная сополимеризация бис-имидов ненасыщенных дикарбоновых кислот с нуклеофилами, такими как диамины, бис-фенолы, бис-меркаптаны, позволяет достаточно легко получать трехмерные гетероциклические полимеры. Такие азотсодержащие термостойкие полимеры представляют практический интерес, поскольку имеют высокие эксплуатационные показатели, а также ввиду доступности исходного сырья. [1–8]. Одностадийный синтез в расплаве без выделения побочных продуктов в отсутствие органических растворителей является наиболее приемлемым с технологической и экологической точек зрения. Тем не менее синтез олигомалеимидов, содержащих несимметричные триазольные циклы, в литературе почти не встречается, за исключением способов получения полибензотриазолимидов (ПБТИ) методом окислительной циклополиконденсации [9, 10]. Основными причинами малочисленных публикаций являются трудности, связанные с синтезом исходных поли-бис-аминоазобензолов, загрязнение конечных продуктов соединениями, используемыми для окислительной циклизации на конечной стадии, неполнота циклизации, приводящая к разноразмерности макромолекулы [11–16].

Во избежание перечисленных недостатков в настоящем сообщении предлагается использовать мономеры с заранее сформированными,

устойчивыми к окислению триазольными циклами. 1H-Бензотриазол (БТ) легко вступает в реакции нуклеофильного присоединения по электронодефицитной олефиновой связи, что дает возможность вводить бензотриазольные фрагменты миграционной сополимеризацией в олигомерную цепь малеимидов. Учитывая стойкость БТ к термическим и химическим воздействиям, возможно получение термостойких реактопластов с комплексом важных эксплуатационных свойств.

Цель настоящей работы – синтез терморезистивных олигобензотриазолимидов с концевыми малеимидными группами путем взаимодействия мольных избытков бис-малеимидов (БМИ) с бензотриазолами по реакции Михаэля в расплаве, а также исследование строения, свойств и механических характеристик материалов, полученных на их основе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исходные реагенты и растворители. Все растворители и реагенты, используемые в работе, очищали в соответствии с известными методиками [17].

N-фенилмалеимид (N-ФМИ) – ярко-желтый кристаллический порошок, синтезировали из малеинового ангидрида и анилина с последующей циклизацией полученной амидокислоты уксусным ангидридом в присутствии уксуснокислого натрия. Очищали перекристаллизацией из изопропилового

спирта. $T_{пл} = 89-90\text{ }^\circ\text{C}$ (лит. $T_{пл} = 85-87\text{ }^\circ\text{C}$ ¹).

БТ перекристаллизовывали из бензола. $T_{пл} = 88-89\text{ }^\circ\text{C}$ (лит. $T_{пл} = 90-99\text{ }^\circ\text{C}$).

4,4'-дифенилметан-бис-малеимид и гексаметилен-бис-малеимид производства КНПО «Карболит» использовали без дополнительной очистки.

3,3',4,4'-Тетрааминодифенилоксид (ТАДО) и 3,3',4,4',-тетрааминодифенилсульфон (ТАДС) производства опытного цеха Новосибирского института органической химии перекристаллизовывали из водно-спиртовой смеси. Температура плавления ТАДО – 149,5–150,5 °С.

3,3',4,4'-Тетрааминодифенилметан (ТАДМ) получали и очищали по известной методике [4].

Стеклопластик получен пропиткой стеклоткани ТС-8/3-250 20–30%-м раствором олигомера в ДМАА. После пропитки стеклоткани ее сушили при 100 °С. Содержание связующего в композите – 25–30%. Полученные препреги собирали в пакет и прессовали при температуре 220 °С и давлении 0,4 МПа.

Синтез исходных соединений 5,5'-бис-бензотриазолметана и 5,5'-бис-бензотриазолоксида. В трехгорлую колбу объемом 500 мл, снабженную мешалкой и термометром, загружали 22 г ТАДМ (ТАДО), ледяную CH_3COOH (110 мл), воду (55 мл). Перемешивали при 40 °С до полного растворения, а затем охлаждали до 13–14 °С. После этого в реакционную колбу добавляли при интенсивном перемешивании раствор нитрита натрия (18 г) в 40 мл дистиллированной воды. Температура повышалась до 65–75 °С, при этом выделялись азотные газы. Реакционную массу перемешивали в течение 1 ч, образовавшуюся суспензию выливали в 500 мл холодной дистиллированной воды, отделяли осадок фильтрованием, промывали и сушили до постоянной массы. После перекристаллизации из смеси CH_3COOH и H_2O в присутствии активированного угля и мочевины выход конечных продуктов составил 90–97%. Температура плавления 5,5'-бис-бензотриазолметана – 230–231 °С, 5,5'-бис-бензотриазолоксида – 252–254 °С.

Элементный анализ для $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_6$, вычислено, %: С – 62,39; Н – 4,03; N – 33,06; найдено, %: С – 62,15; Н – 3,90; N – 33,01.

Элементный анализ для $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_6\text{O}$, вычислено, %: С – 57,14; Н – 3,20; N – 33,22; найдено, %: С – 57,03; Н – 3,58; N – 33,16.

Синтез 5,5'-бис-бензотриазолсульфона. В трехгорлую колбу объемом 1,5 л, снабженную мешалкой и термометром, помещали 10 г (4,5 ммоль) ТАДС, ледяную CH_3COOH (82 мл), нагревали при 500 °С до полного растворения ТАДС, добавляли раствор нитрита натрия 4 г (10,15 ммоль) в 40 мл дистиллированной воды.

Синтез проводили при постоянном перемешивании в течение 1,5 ч, при этом температура смеси повышалась до 90–110 °С. Реакция сопровождалась выделением азотных газов. Выпавший осадок фиолетового цвета разбавляли 1 л дистиллированной воды, отфильтровывали и сушили до постоянной массы. После перекристаллизации концентрированной CH_3COOH (с мочевиной и активированным углем) выход конечного продукта составил 90–97%. Температура плавления – 292–294 °С.

Элементный анализ для $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$, вычислено, %: С – 48,00; Н – 2,68; N – 27,98; найдено, %: С – 47,50; Н – 3,05; N – 27,60.

Синтез модельного соединения (N-фенил-3-(1-бензотриазолил) пирролидин-2,5-дион). В трехгорлую колбу объемом 50 мл, снабженную механической мешалкой, вводом и выводом инертного газа, загружали 1,1913 г (1 ммоль) БТ и 1,7937 г (0,01 ммоль) N-ФМИ в 10 мл N-МП. Затем в реакционную массу прибавляли раствор 0,3956 г (0,3243 ммоль) $\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$, 0,07 мл (0,054 ммоль) триэтиламина в 10 мл N-МП. После полного растворения компонентов систему в течение 10 мин продували аргоном при интенсивном перемешивании. После завершения синтеза реакционную массу осаждали в 500 мл охлажденной до 5–10 °С дистиллированной воде и выдерживали 24 ч. Затем осадок отделяли фильтрованием, сушили до постоянной массы и перекристаллизовывали из водного раствора CH_3COOH . Температура плавления – 258–260 °С.

Элементный анализ для $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_2$, вычислено, %: С – 65,75; Н – 4,14; N – 19,17; найдено, %: С – 65,05; Н – 3,85; N – 18,90. ПМР (ДМСО- d_6) ppm: 7,00–7,60 (ароматические), 4,12–4,22 (метилен), 3,94 (метин).

Синтез полимеров. Реакция 5,5'-бис-бензотриазолметана и 4,4'-дифенилметан-бис-малеимида является типичным примером синтеза исследуемых полимеров. В трехгорлую колбу объемом 50 мл, снабженную механической мешалкой, вводом и выводом инертного газа, загружали 0,6256 г (0,25 ммоль) 5,5'-бис-бензотриазолметана, 0,8959 г (0,25 ммоль) 4,4'-дифенилметан-бис-малеимида и 10 мл N-МП. Затем в реакционную массу прибавляли раствор 0,3956 г (0,3243 ммоль) $\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$ и 0,3956 г (0,054 ммоль) триэтиламина в 10 мл N-МП. После полного растворения компонентов систему в течение 10 мин продували аргоном. После этого колбу помещали в предварительно термостатированную до 120 °С баню и выдерживали в течение 24 ч. После этого осадок отделяли, экстрагировали изопропанолом в аппарате Сокслета и сушили до постоянной массы.

Инфракрасный спектр, cm^{-1} : 1375–1630 (бензотриазольный цикл), 1725, 1730 (C=O).

¹Catalog Handbook of Fine Chemicals, Aldrich, 1992–1993.

Синтез полимеров на основе 5,5'-бис-бензотриазолоксида и 4,4'-дифенилметан-бис-малеимида осуществляли аналогично. При синтезе полимера на основе 5,5'-бис-бензотриазолсульфона и 4,4'-дифенилметан-бис-малеимида в качестве катализатора использовали C_6H_5COOH . Инфракрасный спектр, cm^{-1} : 1500–1620 (ароматическая система), 1700, 1755 (C=O), 1400 (–CH₂–CO–), 1370, 1310, 1160 (–SO₂), 1180 (–C–N–C сукцинимидного цикла).

При синтезе полимера на основе 5,5'-бис-бензотриазолсульфона и гексаметилен-бис-малеимида в качестве катализатора использовали C_6H_5COOH и бензоат лития. Инфракрасный спектр, cm^{-1} : 1500–1620 (конденсированная ароматическая система), 1700, 1755 (C=O), 1435 (–CH₂–CO–), 1400 (–CH₂–), 1160 (1,2,4 бензольное кольцо), серия полос поглощения при 1200–1350 (–(CH₂)₅).

Методы исследования. Элементный анализ выполняли на CHNS-анализаторе EA-3028 (Eurovector).

ИК-спектры регистрировали на спектрометре ALPHA (Bruker) в диапазоне волновых чисел 4000–400 cm^{-1} . Образцы получали прессованием с KBr.

Спектры ЯМР ¹³C регистрировали на спектрометре DRX-500 при частоте 400 МГц в растворе DMSO-d₆. Внутренний стандарт – TMS.

Термогравиметрические исследования проводили на синхронном термическом анализаторе STA 449C «NETZSCH» при скорости нагревания 5 град/мин на воздухе.

Температуру плавления определяли на приборе IA 9100 или по данным ДСК.

Механические показатели материалов определяли на электромеханической разрывной машине Instron-3367 при скорости движения траверсов 10 мм/мин в соответствии с ГОСТ 14236-81.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее была рассмотрена реакция БТ с малеимидами по реакции Михаэля в расплаве, которую можно рассматривать как модельную для нуклеофильного присоединения 1,2,3-бензотриазола по электронодефицитной кратной связи N-ФМИ [16]. Была показана вероятность преимущественного протекания нуклеофильной атаки БТ на кратную связь малеимидов при их взаимодействии в расплаве при повышенной температуре по направлению 1 в сравнении с направлением 2 атакой на атомы азота 1,2,3-бензотриазола на карбонильный углерод N-ФМИ (2) (рис. 1).

Выход N-фенил-3-(1-бензотриазолил)пирролидин-2,5-диона (I) в присутствии таких катализаторов, как триэтиламин (Et_3N) или карбоновая кислота, составил только 50%, а в присутствии каталитической системы $Et_3N-C_6H_5COOH$ (мольное соотношение 1:6) он достиг 90%. Высокий

выход в последнем случае можно объяснить положительным взаимным влиянием кислотного и основного компонентов каталитической системы. Было отмечено, что при добавлении в реакционную массу Et_3N цвет раствора изменялся от зеленовато-желтого до вишнево-красного. Это связано с образованием комплекса с переносом заряда между бензотриазолят-анионом N-ФМИ. В присутствии одного Et_3N высокий выход не был достигнут, по-видимому, из-за конкурирующей гомополимеризации N-ФМИ по анионному механизму.

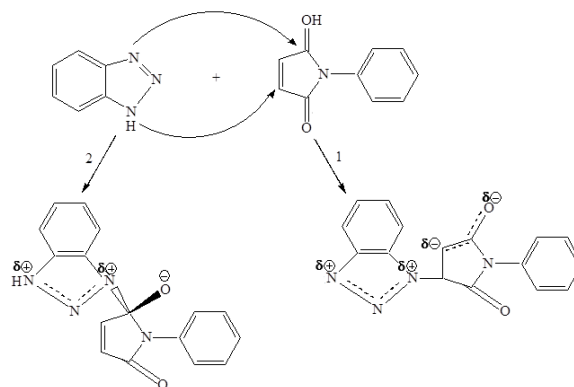


Рис. 1. Схема возможных направлений взаимодействия 1Н-бензотриазола с N-фенилмалеимидом

Fig. 1. Possible directions of 1H-benzotriazole and N-phenylmaleimide interaction

Информацию, полученную при синтезе модельного соединения, использовали при изучении процесса полимерообразования бис-бензотриазолов с ароматическими бис-малеимидами на примере реакции 1 моль 5,5'-бис-бензотриазолметана и 4 моль гексаметилен-бис-малеимида (рис. 2).

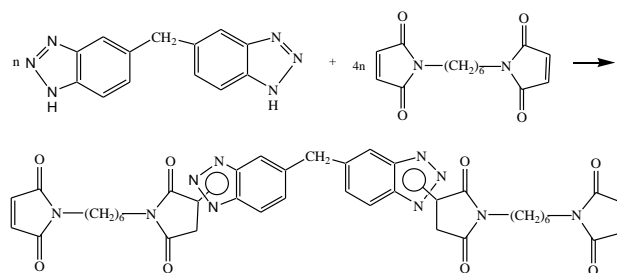


Рис. 2. Синтез модельного соединения N-фенил-3-(1-бензотриазолил)пирролидин-2,5-диона

Fig. 2. Synthesis of a model compound N-phenyl-3-(1-benzotriazolyl)pyrrolidine-2,5-dione

Для поиска оптимальных условий синтеза полимеров был использован метод композиционного ортогонального планирования (метод Бокса – Уилсона) [19]. Параметром оптимизации выбрана приведенная вязкость, а переменными факторами, влияющими на параметр оптимизации, были: исходная концентрация мономеров,

продолжительность и температура синтеза [5].

Синтез выполнялся согласно матрице планирования, содержащей 15 экспериментальных точек. Дисперсию воспроизводимости вычисляли по 5 дублированным значениям. Верхние пределы переменных факторов ограничиваются растворимостью мономеров, летучестью растворителя и временными затратами. В результате обработки экспериментальных данных по алгоритму метода была получена математическая модель процесса образования олигомера, выраженная полиномом второй степени в кодированных переменных.

Согласно расчетам композиционного планирования, наибольшее влияние на параметр оптимизации оказывает исходная концентрация мономеров. Исходя из частных зависимостей определены следующие оптимальные значения процесса синтеза олигомера: температура синтеза – 110–115 °С, продолжительность синтеза – 1,0–1,5 ч, исходная концентрация каждого мономера – 0,25–0,27 моль/л, при параметре оптимизации $\eta_{пр} = 0,50–0,55$ дл/г. Превышение оптимальных значений переменных факторов увеличивает вероятность гелеобразования.

В присутствии каталитической системы C_6H_5COOH и Et_3N приведенная вязкость полученного полимера была очень низкой ($\eta_{пр} = 0,05$ дл/г), что можно объяснить +I-эффектом метиленовых групп гексаметилен-бис-малеимида. После замены Et_3N на $C_6H_5COO^-Li^+$ (молярное соотношение $C_6H_5COOH/C_6H_5COO^-Li^+$, равное 1:2) была достигнута $\eta_{пр}$ порядка 1,00 дл/г. Высокая активность этой каталитической системы скорее всего обусловлена образованием координационной связи между катионом Li^+ и карбонильным кислородом малеимидного цикла, что облегчает нуклеофильную атаку на олефиновые атомы углерода. Помимо этого бензоат-анионы, обладая сравнимой с третичными

аминами основностью в апротонных средах, способствуют ионизации 5,5'-бис-бензотриазолов. Присутствие в системе донора протонов и низкая нуклеофильность $C_6H_5COO^-$ из-за делокализации заряда в карбоксилат-анионе благоприятствует подавлению конкурирующих реакций гомополимеризации гексаметилен-бис-малеимида по анионному механизму. К тому же бензоат лития в отличие от третичных аминов – нелетучее соединение и не удаляется из реакционной зоны.

Строение олигомера подтверждено данными ИК- и ЯМР-спектроскопии. В ИК-спектре (рис. 3) интенсивная полоса поглощения карбонила $C=O$ при 1717 см^{-1} смещена в сторону меньших длин волн по сравнению с поглощением $C=O$ исходного N-ФМИ на $17,5\text{ см}^{-1}$ из-за увеличения порядка связи карбонила при раскрытии олефиновой связи. Вторая полоса поглощения с плечом при 1717 см^{-1} принадлежит второму карбонилу. Поглощение при $1187,5\text{ см}^{-1}$ свидетельствует о деформационных колебаниях $C-N-C$, а малоинтенсивные полосы при 2930 и 2979 соответствуют валентным $C-H$ сукцинимидного цикла.

В спектре ПМР ($CHCl_3-d$) протоны групп CH_2 и CH олигомера – хорошо разрешенные квартеты при 3,59–3,65 и 3,82–3,87 м.д. (рис. 4).

В спектре ЯМР ^{13}C ($DMCO-d_6$) наблюдаются сигналы алифатических атомов углерода при 35,43 и 56,34 м.д. и два сигнала карбонильных углеродов при 172,33 и 173,19. Сигналы всех шести углеродов бензотриазолильного фрагмента при 110,71; 119,72; 124,78; 128,38; 133,09 и 145,43 м.д. подтверждают образование сукцинимида с несимметричным 1-бензотриазолильным заместителем. Пики при 127,17 и 129,29 м.д. соответствуют атомам углерода в орто- и мета-положениях N-фенильного фрагмента (рис. 5).

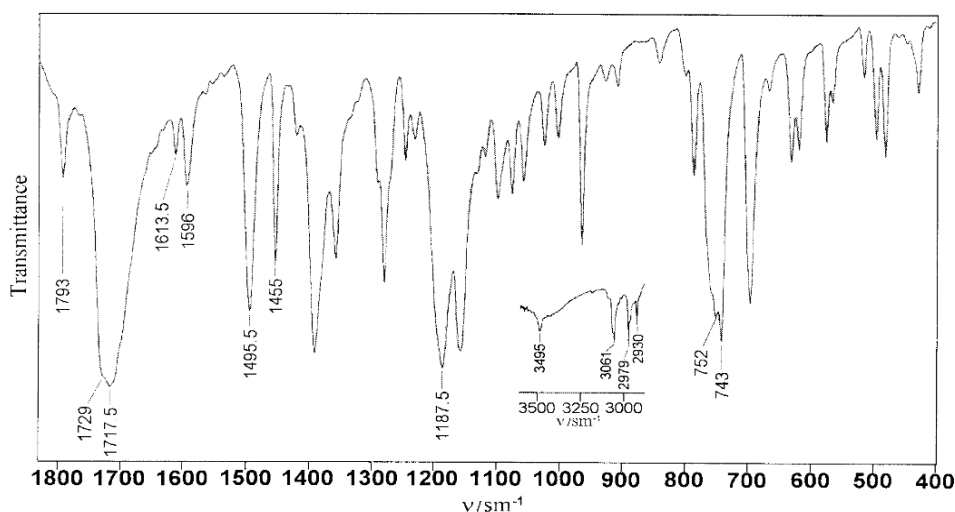


Рис. 3. ИК-спектр области «отпечатков пальцев» олигомера

Fig. 3. IR spectrum of area of oligomer "fingerprints"

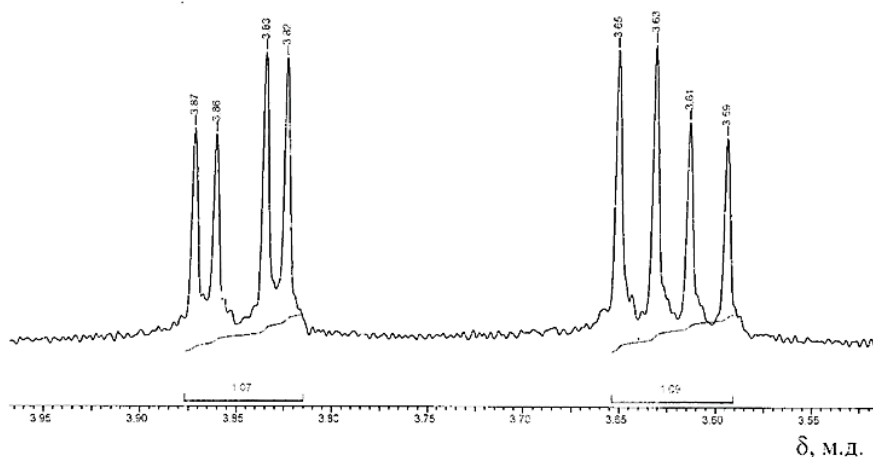


Рис. 4. Спектр ПМР. Аليفатические метиленовые протоны олигомера (CHCl₃-d)

Fig. 4. NMR-¹H spectrum. Aliphatic methylene protons of oligomer (CHCl₃-d)

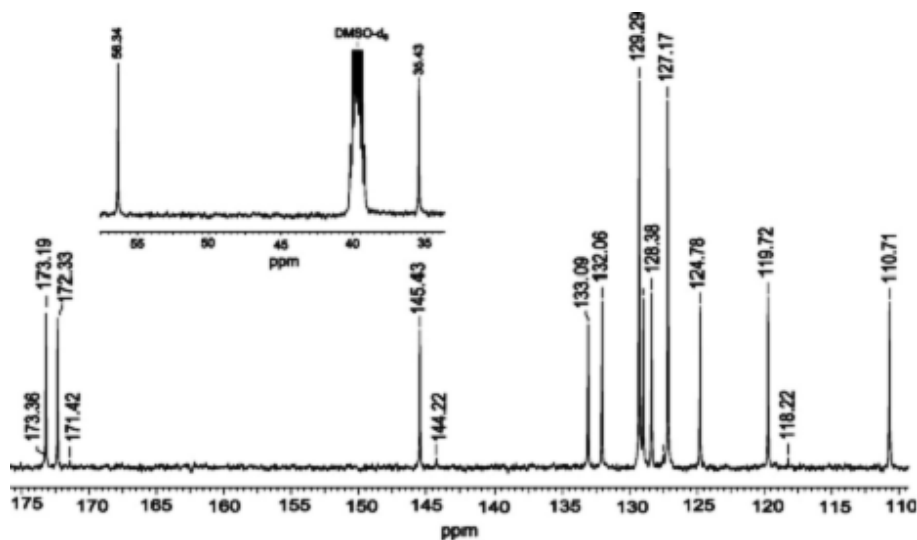


Рис. 5. Спектр ЯМР ¹³C олигомера

Fig. 5. NMR ¹³C spectrum of an oligomer

На основании полученных результатов были синтезированы олигобензотриазолимиды, выход, приведенная вязкость и температура разложения которых представлены в таблице.

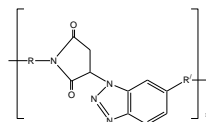
Полученные олигомеры после затвердевания представляют собой непрозрачную хрупкую массу, хорошо растворимую в полярных апротонных растворителях и в смеси CHCl₃ + ацетон. В растворах щелочей они окрашиваются в малиновый цвет, что является одной из характерных реакций на малеимидный гетероцикл.

Динамический термогравиметрический анализ полученных олигомеров свидетельствует, что при 350–360 °С начинается процесс интенсивной термоокислительной деструкции. Наиболее термостойкими являются олигомеры с группой SO₂ между бензольными ядрами. Подобное характерно и для других полигетероариленов с группами SO₂.

Согласно данным дифференциально-скани-

рующей калориметрии эндотермический эффект (эндотерма) фазового перехода первого рода (плавление) наблюдается при 130–135 °С. Экзотермический эффект соответствует гомополимеризации олигомеров по кратным связям, очень сильно ушрен и проявляется при температуре выше 180 °С. С точки зрения технологии получения композиционных материалов данное явление можно считать благоприятным, так как увеличивается время нахождения олигомеров в текучем состоянии (жизнеспособность расплава). Меньшая скорость отверждения олигомеров должна способствовать тому, что теплота, выделяемая при структурировании, успевает рассеиваться, не вызывая локальных перегревов материала и возникающих вследствие этого механических напряжений. Все это должно улучшить технологические и физико-механические характеристики композитов на основе данных олигомеров [20].

Свойства олигобензотриазолилимидов общей формулы



Properties of oligobenzotriazolyimides of the general formula

R	R'	Выход, %	$\eta_{пр}$ в N-МП, дл/г	$T_{разл.}$, °C на воздухе*
	CH ₂	85	0,55	350
	SO ₂	91	0,60**	350
	SO ₂	95	0,66**	355
	O	88	0,40***	370
	O	92	1,00	350
	CH ₂	86	0,90	350

* – температура пересечения касательных в области перегиба кривой;

** – вязкость определена в ДМФА;

*** – вязкость определена в N-МП + 2% LiCl.

С использованием полученного олигомера были изготовлены стеклопластики (см. табл.). Ортогональное расположение волокон в исходных препрегах обеспечило анизотропию физико-механических свойств (ГОСТ 11262-80). Предел прочности при растяжении составляет 174,40 МПа, относительном удлинении при разрыве – 15,6%. Модуль упругости (ТМА, трехточечный изгиб, 1 Гц) при 250 °С составляет 18,6 МПа.

Проведены экспериментальные работы по получению термостойких полимерных покрытий на основе синтезированных олигомеров. Композиционные материалы получены с помощью автоматизированной установки экструзионного литья [21]. Температура экструдера соответствовала 250–300 °С, что позволило полностью расплавить исходный олигомер и получить пленочные покрытия на подложках различной поверхности. Преимуществом данной установки является равномерное прогревание исходного вещества. Прочность клеевых соединений на основе данного олигомера, согласно ГОСТ 14759-69, составляет $\sigma_p = 2,7$ МПа (металлические пластины Ст-3 внахлест, сдвигающая нагрузка параллельна плоскости клеевого соединения).

Исследована возможность получения композиционного материала. В качестве наполнителя использовали деревянные опилки, угольный шлак, песок. Композиционные материалы наносили на кровельную металлическую черепицу в виде пленочных покрытий. Эксперименты показали, что адгезионная прочность полимера к черепице на основе алюминия и оцинкованного железа при комнатной температуре достаточно велика и при повышении температуры не изменяется. При температуре выше 500 °С пленки на поверхности быстро коксуются, обеспечивая пониженную горючесть и огнестойкость, что позволяет отнести их к самозатухающим и трудногорючим.

Испытания показали, что покрытия имеют защитные свойства, обеспечивающие их длительную сохранность в различных условиях эксплуатации. Они не подвержены гидролизу, устойчивы к действию агрессивных сред в широком диапазоне температур. Продукция соответствует всем эксплуатационным и экологическим требованиям.

Проведенные экспериментальные исследования показали, что технология экструзионно-прокатно-формовочного литья является перспективной. Показана возможность применения данной технологии для получения новых композиционных материалов в качестве термо- и огнестойких покрытий. Оптимизированы составы и условия получения полимерных композиций, изучены физико-механические свойства, разработана технология получения материалов, устойчивых к действию агрессивных сред и перепадам температуры.

ВЫВОДЫ

Взаимодействием 1Н-бензотриазола с четырехкратным избытком бис-малеимида в расплаве синтезированы терморезистивные олигобензотриазолилимиды. Согласно данным термогравиметрического анализа, термоокислительная деструкция у полученных олигомеров начинается при 350–360 °С, что свидетельствует об их высокой термостойкости. Экзотермы, соответствующие гомополимеризации по кратным связям олигомеров, существенно уширены, что увеличивает время их нахождения в текучем состоянии (жизнеспособность расплава), позволяя улучшить технологические и физико-механические свойства материалов, полученных на основе синтезированных олигомеров. Показана перспективность использования олигомеров в качестве связующих для слоистых пластиков и клеевых композиций.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Коршак В.В. Термостойкие полимеры. М.: Наука, 1969. 411 с.
2. Виноградова С.В., Васнев В.А. Поликонденсационные процессы и полимеры. М.: Наука, 2000. 373 с.
3. Бюллер К.-У. Тепло- и термостойкие полимеры / пер с нем. Н.В. Афанасьева, Г.М. Цейтлина. М.: Химия, 1984. 1056 с.
4. Фарион И.А., Могнонов Д.М., Хахинов В.В., Дорошенко Ю.И. Синтез и исследование полибензотриазолиминов // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 2000. Т. 42. N 5. С. 734–739.
5. Фарион И.А., Могнонов Д.М., Раднаева Л.Д., Дорошенко Ю.Е. Полигетероарилены на основе бисмалеимидов и 2,2'-бис-бензимидазолов, синтезируемых через дихлорангидриды бис-аминоамидов дикарбоновых кислот // Высокомолекулярные соединения. Серия Б. 2002. Т. 44. N 3. С. 516–519.
6. Lin R.-H., Liu Y.-H., Chen Y.-H., Lee A.C., Ho T.H. Morphology controls of the melt blending in a novel highly crosslinked bismaleimide system // European Polymer Journal. 2007. Vol. 43. Issue 10. P. 4197–4209. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.08.004>
7. Iredale R.J., Ward C., Hamerton I. Modern advances in bismaleimide resin technology: A 21st century perspective on the chemistry of addition polyimides. // Progress in Polymer Science. 2017. Vol. 69. P. 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2016.12.002>
8. Ouchi M., Terashima T., Sawamoto M. Transition Metal-Catalyzed Living Radical Polymerization: Toward Perfection in Catalysis and Precision Polymer Synthesis // Chemical Reviews. 2009. Vol. 109. Issue 11. P. 4963–5050. <https://doi.org/10.1021/cr900234b>
9. Gall VG. Benzo-bis-triazole polymers. Patent USA, no. 3376233. 1968.
10. Пат. № 2136705, Российская Федерация. Способ получения термостойких полимеров / И.А. Фарион, Д.М. Могнонов, В.В. Хахинов, Е.В. Ленская, О.В. Ту-Ши-Ин; патентообладатель Байкальский институт природопользования СО РАН, Бурятский государственный университет; заявл. 11.06.1997, опубл. 10.09.1999.
11. Katritzky A.R. The continuing magic of benzotriazole: An overview of some recent advances in synthetic methodology // Journal of Heterocyclic Chemistry. 1999. Vol. 36. Issue 6. P. 1501–1522. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570360611>
12. Li Zh., Li T., Fu R., Yang J. Regioselective 1,4-conjugate aza-Michael addition of dienones with benzotriazole // Heterocyclic Communications. 2017. Vol. 23. Issue 4. P. 287–291. <https://doi.org/10.1515/hc-2016-0182>
13. Lv J., Wu H., Wang Y.M. Organocatalytic enantioselective aza-Michael additions of N-heterocycles to α,β -unsaturated enones // European Journal of Organic Chemistry. 2010. Vol. 41. Issue 36. P. 2073–2083. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200901227>
14. Hou X., Hemit H., Yong J., Nie L., Aisa H.A. Mild and Efficient Procedure for Michael Addition of N-Heterocycles to α,β -Unsaturated Compounds Using Anhydrous K_3PO_4 as Catalyst // An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry. 2010, Vol. 40. Issue 7. P. 973–979. <https://doi.org/10.1080/00397910903029867>
15. Физер Л., Физер М. Реагенты для органического синтеза: в 5 т.; пер. с англ. Н.С. Зефинова и др. Т. 4. М.: Мир, 1971. 446 с.
16. Hopewell J.L., Hill D.J.T., Pomery P.J. Electron spin resonance study of the homopolymerization of aromatic bismaleimides // Polymer. 1998. Vol. 39. Issue 23. P. 5601–5607. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(98\)00023-8](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(98)00023-8)
17. Farion I.A., Mogonov D.M., Il'ina O.V., Bal'zhinov S.A. Crosslinking benzotriazolylimides and polymeric materials on base of them. // Journal of Applied Polymer Science. 2012. Vol. 126. Issue 6. P. 1797–1807. <https://doi.org/10.1002/app.34475>
18. Могнонов Д.М., Фарион И.А., Аюрова О.Ж., Ильина О.В., Заяханов М.Е., Битуев А.В. О нуклеофильном присоединении 1Н-бензотриазола к малеимидам // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9. N 1. С. 6–12. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-1-6-12>
19. Ninan K.N., Krishnan K., Mathew J. Addition polyimides. I. Kinetics of cure reaction and thermal decomposition of bismaleimides // Journal of Applied Polymer Science. 1986. Vol. 32. Issue 7. P. 6033–6042. <https://doi.org/10.1002/app.1986.070320731>
20. Пат. РФ № 2284214, Российская Федерация. Протонпроводящие композиционные полимерные мембраны и способ их получения / Б.А. Трофимов, Д.М. Могнонов, Т.Г. Ермакова, Н.П. Кузнецова, Г.Ф. Мячина, Л.И. Волкова [и др.]; патентообладатели Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, Байкальский институт природопользования СО РАН; заявл. 04.07.2005, опубл. 27.09.2006.
21. Михайлин Ю.А. Конструкционные полимерные композиционные материалы (армированные пластики, ВКПМ). 2-е изд., испр. и доп. СПб.: Научные основы и технологии. 2010. 822 с.

REFERENCES

1. Korshak VV. *Heat-resistant polymers*. Moscow: Nauka; 1969. 411 p. (In Russian)
2. Vinogradova SV, Vasnev VA. *Polycondensation processes and polymers*. Moscow: Nauka; 2000. 373 p. (In Russian)
3. Buhler K-U. *Spezialplaste*. Berlin: Akademie Verlag; 1978. 1015 p. (Russ. ed.: Byuller K-U. *Тепло-*
4. Farion IA, Mogonov DM, Khakhinov VV, Doroshenko YuE. Synthesis and Investigation of Poly(benzotriazolimidines). *Vysokomolekulyarnye soedineniya. Seriya A*. 2000;42(5):734–739. (In Russian)

5. Farion IA, Magnonov DM, Radnaeva LD, Doroshenko YuE. Poly(heteroarylenes) based on bis(maleimides) and 2,2'-bis(benzimidazoles) synthesized through dichlorhydrates of dicarboxylic acid bis(o-aminoanilides). *Vysokomolekulyarnye soedineniya. Seriya B.* 2002;44(3):516–519. (In Russian)
6. Lin RH, Liu YH, Chen Y-H, Lee AC, Ho TH. Morphology controls of the melt blending in a novel highly crosslinked bismaleimide system. *European Polymer Journal.* 2007;43(10):4197–4209. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.08.004>
7. Iredale RJ, Ward C, Hamerton I. Modern advances in bismaleimide resin technology: A 21st century perspective on the chemistry of addition polyimides. *Progress in Polymer Science.* 2017;69:1–21. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2016.12.002>
8. Ouchi M, Terashima T, Sawamoto M. Transition Metal-Catalyzed Living Radical Polymerization: Toward Perfection in Catalysis and Precision Polymer Synthesis. *Chemical Reviews.* 2009;109(11):4963–5050. <https://doi.org/10.1021/cr900234b>
9. Gall VG. *Benzo-bis-triazole polymers.* Patent USA, no. 3376233; 1968.
10. Farion IA, Mogonov DM, Khakhinov VV, Lenskaya EV, Tu-Shi-In OV. *Heat-resistant polymer production process.* Patent RF, no. 2136705; 1997. (In Russian)
11. Katritzky AR. The continuing magic of benzotriazole: An overview of some recent advances in synthetic methodology. *Journal of Heterocyclic Chemistry.* 1999;36(6):1501–1522. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570360611>
12. Li Zh, Li T, Fu R, Yang J. Regioselective 1,4-conjugate aza-Michael addition of dienones with benzotriazole. *Heterocyclic Communications.* 2017;23(4):287–291. <https://doi.org/10.1515/hc-2016-0182>
13. Lv J, Wu H, Wang YM. Organocatalytic enantioselective aza-Michael additions of N-heterocycles to α,β -unsaturated enones. *European Journal of Organic Chemistry.* 2010;41(36):2073–2083. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200901227>
14. Hou X, Hemit H, Yong J, Nie L, Aisa HA. Mild and Efficient Procedure for Michael Addition of N-Heterocycles to α,β -Unsaturated Compounds Using Anhydrous K_3PO_4 as Catalyst. *An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry.* 2010;40(7):973–979. <https://doi.org/10.1080/00397910903029867>
15. Fieser L, Fieser M. *Reagents for Organic Synthesis.* John Wiley and Sons Inc., NY-London-Sydney-Toronto. 1969. (Russ. ed.: Fieser L, Fieser M. *Reagents for Organic Synthesis.* Moscow: Mir; 1971. 446 p.)
16. Hopewell JL, Hill DJT, Pomery PJ. Electron spin resonance study of the homopolymerization of aromatic bismaleimides. *Polymer.* 1998;39(23):5601–5607. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(98\)00023-8](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(98)00023-8)
17. Farion IA, Mogonov DM, Il'ina OV, Bal'zhinov SA. Crosslinking benzotriazolyimides and polymeric materials on base of them. *Journal of Applied Polymer Science.* 2012;(126):1797–1807. <https://doi.org/10.1002/app.34475>
18. Mogonov DM, Farion IA, Ayurova OZh, Ilina OV, Zayakhanov ME, Bituev AV. On nucleophilic addition of 1H-benzotriazole to maleimides. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotehnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2018;9(1):6–12. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-1-6-12>
19. Ninan KN, Krishnan K, Mathew J. Addition polyimides. I. Kinetics of cure reaction and thermal decomposition of bismaleimides. *Journal of Applied Polymer Science.* 1986;32(7):6033–6042. <https://doi.org/10.1002/app.1986.070320731>
20. Trofimov BA, Mogonov DM, Ermakova TG, Kuznetsova NP, Myachina GF, Volkova LI, et al. *Proton-conducting composite polymer membranes and a method for their production.* Patent RF, no. 2284214; 2005. (In Russian)
21. Mikhailin YuA. *Structural polymer composite materials* (reinforced plastics, VKPM). St. Petersburg: Nauchnye osnovy iologii; 2010. 822 p. (In Russian)

Критерии авторства

Фарион И.А., Могнонов Д.М., Хахинов В.В., Литвинова М.А., Ильина О.В., Аюрова О.Ж. выполнили экспериментальную работу. Авторы совместно обобщили результаты, написали рукопись, имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

Ivan A. Farion, Dmitry M. Mogonov, Vyacheslav V. Khakhinov, Marianna A. Litvinova, Olga V. Il'ina, Oksana Zh. Ayurova carried out the experimental work. The authors on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. All authors have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict interests

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

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

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

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Фарион Иван Александрович,

к.х.н., научный сотрудник,
Байкальский институт природопользования
СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
e-mail: fariv@mail.ru

Ivan A. Farion,

Cand. Sci. (Chemistry), Researcher,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
e-mail: fariv@mail.ru

Могнонов Дмитрий Маркович

д.х.н., профессор, главный научный сотрудник,
Байкальский институт природопользования
СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
e-mail: dmog@binm.ru

Dmitry M. Mogonov,

Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Chief Researcher,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
e-mail: dmog@binm.ru

Хахинов Вячеслав Викторович,

д.х.н., профессор,
Бурятский государственный университет,
670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а,
Российская Федерация,
✉ e-mail: khakhinov@mail.ru

Vyacheslav V. Khakhinov,

Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Buryat State University,
24a, Smolin St., Ulan-Ude, 670000,
Russian Federation,
✉ e-mail: khakhinov@mail.ru

Литвинова Марианна Андреевна,

Инженер,
Восточно-Сибирский государственный
университет технологий и управления,
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в,
Российская Федерация

Marianna A. Litvinova,

Engineer,
East Siberian State University
of Technology and Management
40v, Klyuchevskaya St., Ulan-Ude, 670013,
Russian Federation

Ильина Ольга Васильевна,

к.т.н., ведущий инженер,
Байкальский институт природопользования
СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
e-mail: olii2@yandex.ru

Olga V. Il'ina,

Cand. Sci. (Engineering), Leading Engineer,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
e-mail: olii2@yandex.ru

Аюрова Оксана Жимбиевна,

к.т.н., научный сотрудник,
Байкальский институт природопользования
СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
e-mail: chem88@mail.ru

Oksana Zh. Ayurova,

Cand. Sci. (Engineering), Researcher,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
e-mail: chem88@mail.ru

Оригинальная статья / Original article

УДК 547

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-386-392>



Синтез и идентификация 1,1,3,3-тетра-[1,2-дигидро-1,5-диметил-2-фенил-3-оксопиразол]пропана

© Д.В. Бабадеев*, Е.А. Строганова**

*Казанский федеральный университет, г. Казань, Российская Федерация

**Оренбургский государственный университет, г. Оренбург, Российская Федерация

Резюме: Пиразольные производные представляют практическую ценность как аналитические реагенты, красящие и лекарственные вещества. Известно, что 1,2-дигидро-1,5-диметил-2-фенилпиразол-3H-он (антипирин) и его бидентатные производные являются хорошими аналитическими реагентами на ионы d-металлов (Cd^{2+} , Fe^{3+} , Sc^{3+} , Ti^{4+} , Zn^{2+} , Co^{2+} и др.). Проявление хелатирующей способности открывает возможность использования би-, три- и тетрадентатных производных антипирина в качестве органических лигандов при синтезе металлоорганических координационных полимеров, что обуславливает актуальность синтеза ряда новых тетрадентатных производных 1,2-дигидро-1,5-диметил-2-фенилпиразол-3H-она. Целью настоящей работы являлись синтез и идентификация нового вещества – 1,1,3,3-тетра-[1,2-дигидро-1,5-диметил-2-фенил-3-оксопиразол]пропана (тетраантипирилпропана). В ходе работы проведен обзор существующих методик синтеза производных антипирина, полученных путем конденсации 1,2-дигидро-1,5-диметил-2-фенил-3H-пиразол-3-она с альдегидами алифатического и ароматического ряда. Отработана методика получения и очистки нового, не описанного в литературе соединения – 1,1,3,3-тетра-[1,2-дигидро-1,5-диметил-2-фенил-3-оксопиразол]пропана, по реакции электрофильного замещения в ароматическом кольце оксопиразольного гетероцикла протонированной формы пропандиала (малонового диальдегида) с выходом 17,1%. Соединение представляет собой кристаллическое вещество белого цвета, хорошо растворимое в органических полярных и неполярных растворителях, но не растворимое в воде. Чистоту перекристаллизованного продукта синтеза подтверждали путем измерения температуры плавления и проведения качественной реакции с нитритом натрия на обнаружение незамещенного оксопиразольного цикла субстрата реакции. Структуру 1,1,3,3-тетра-[1,2-дигидро-1,5-диметил-2-фенил-3-оксопиразол]пропана устанавливали методами масс-спектрометрии и спектроскопии комбинационного рассеяния.

Ключевые слова: антипирин, 1,1,3,3-тетра-[1,2-дигидро-1,5-диметил-2-фенил-3-оксопиразол]пропан, тетраантипирилалканы, масс-спектр, спектр комбинационного рассеяния

Информация о статье: Дата поступления 22 мая 2020 г.; дата принятия к печати 31 августа 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2020 г.

Для цитирования: Бабадеев Д.В., Строганова Е.А. Синтез и идентификация 1,1,3,3-тетра-[1,2-дигидро-1,5-диметил-2-фенил-3-оксопиразол]пропана. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 3. С. 386–392. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-386-392>

Synthesis and identification of 1,1,3,3-tetra-[1,2-dihydro-1,5-dimethyl-2-phenyl-3-oxopyrazole]propane

Dmitrii V. Babadeev*, Elena A. Stroganova**

*Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation

**Orenburg State University, Orenburg, Russian Federation

Abstract: Pyrazole derivatives are of practical value as analytical reagents, dyes and medicinal substances. It is known that 1,2-dihydro-1,5-dimethyl-2-phenylpyrazol-3H-one (antipyrine) and its bidentate derivatives are good analytical reagents for d-metal ions (Cd^{2+} , Fe^{3+} , Sc^{3+} , Ti^{4+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , etc.). The chelating ability of bi-, tri- and tetradentate antipyrine derivatives make them promising organic ligands for the synthesis of organometallic coordination polymers. Therefore, synthesis of new tetradentate derivatives of 1,2-dihydro-1,5-dimethyl-2-phenyl-3Hpyrazole-one seems to be a highly relevant research task. The aim of this work was to synthesize and study a new substance – 1,1,3,3-tetra-[1,2-dihydro-1,5-dimethyl-2-phenyl-3-oxopyrazole]propane (tetraantipyryl-propane). A review of existing methods for the synthesis of antipyrine derivatives through condensation of 1,2-dihydro-1,5-dimethyl-2-phenyl-3H-pyrazol-3-one with aliphatic and aromatic aldehydes was carried out. A method was developed for the preparation and purification of 1,1,3,3-tetra-[1,2-

dihydro-1,5-dimethyl-2-phenyl-3-oxopyrazole]propane by the reaction of electrophilic substitution of the protonated form of propandial (malonic dialdehyde) in the aromatic ring of the oxopyrazole heterocycle with a yield of 17.1%. The resulting compound is a white crystalline substance, readily soluble in organic polar and non-polar solvents, but insoluble in water. The purity of the recrystallized synthesis product was confirmed by measuring its melting point and conducting a qualitative reaction with sodium nitrite to detect an unsubstituted oxopyrazole cycle in the reaction substrate. The structure of 1,1,3,3-tetra-[1,2-dihydro-1,5-dimethyl-2-phenyl-3-oxopyrazole]propane was established by mass spectrometry and Raman spectroscopy.

Keywords: antipyrine, 1,1,4,4-tetra-[1,2-dihydro-1,5-dimethyl-2-phenyl-3-oxopyrazole]propane, tetraantipyrilalkanes, mass spectrum, Raman spectrum

Information about the article: Received May 22, 2020; accepted for publication August 31, 2020; available online September 30, 2020.

For citation: Babadeev DV, Stroganova EA. Synthesis and identification of 1,1,3,3-tetra-[1,2-dihydro-1,5-dimethyl-2-phenyl-3-oxopyrazole]propane. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):386–392. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-386-392>

ВВЕДЕНИЕ

Использование пиразолоновых производных в роли аналитических реагентов впервые было рассмотрено в сороковых годах прошлого столетия С.И. Гусевым, И.М. Коренманом, Д.И. Рябчиковым, а позднее А.К. Бабко, А.И. Бусевым, Е. Судо и другими. После 1950 г. началось изучение реакций комплексообразования, были предложены способы избирательного выделения ионов металлов и концентрирования микроэлементов. Работы по концентрации ионов металлов демонстрируют эффективность применения оксопиразолоновых производных в качестве экстрагентов ионов переходных металлов, а также редких и рассеянных элементов [1–12]. Кроме того, производные пиразолона нетоксичны, что обуславливает актуальность их применения в качестве реагентов для импрегнирования с целью получения избирательных сорбентов, применяемых в экологических технологических схемах концентрирования ионов металлов из промышленных стоков или растворов гидрометаллургической переработки руд и шлаков цветной металлургии [13, 14].

Пиразольные производные имеют ценность и как лекарственные вещества, что подтверждается биохимическими исследованиями, продолжающимися и сегодня [15–20].

Несмотря на большой объем накопленного теоретического и практического материала в области производных пиразолона, химия тетраантипирилалканов остается слабо изученной. Поэтому перед авторами настоящей статьи стояла задача отработки методики получения ряда новых, не описанных в литературе производных антипирина с целью последующего исследования их экстракционных способностей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез тетрадентатных производных алифатического ряда 1,2-дигидро-1,5-диметил-2-фенил-3-пиразолона (далее антипирина) осуществляется путем конденсации антипирина с альдегидом по механизму электрофильного замеще-

ния в ароматическом кольце гетероцикла. В синтезе производного использовали реагенты квалификации х.ч. производства компании Merck (Германия).

Образование активных центров на углеродах альдогруппы происходит при введении в реакционную среду минеральной кислоты. Конденсация проводилась при нагревании в течение 2–3 ч. В качестве исходных реагентов использовали метиловый диацеталь пропандиала (метиловый диацеталь малонового альдегида), антипирин, соляную кислоту и раствор аммиака. Количество 1,1,3,3-тетра-[1,2-дигидро-1,5-диметил-2-фенил-3-оксопиразол]пропана (далее – тетраантипирилпропан) рассчитывали из предположения полной конденсации антипирина с диальдегидом. Мольное соотношение пропандиала и антипирина – 1:4.

Малоновый альдегид добавляли к подкисленному раствору антипирина (5 г антипирина на 50 мл соляной кислоты 0,5 моль/л). Смесь нагревали на водяной бане при 80–90 °С в течение 2–3 ч. Схема протекающего процесса приведена на рис. 1.

После нагрева смесь разбавляли дистиллированной водой и добавляли 25%-й раствор аммиака до нейтральной реакции среды для осаждения продуктов конденсации. Выпавший аморфный осадок белого цвета отфильтровывали на воронке Бюхнера и сушили. После сушки проводили перекристаллизацию из этанола. При фильтрации вещество образует на фильтре тонкую переливающуюся пленку, после высушивания приобретает форму белых игольчатых кристаллов. Выход перекристаллизованного продукта составил 17,1%. Продукт синтеза растворим в спирте, не растворим в воде и ацетоне. Интервал температур плавления, определенных на приборе Жукова, составил от 244 до 246 °С.

Структуру 1,1,3,3-тетра-[1,2-дигидро-1,5-диметил-2-фенил-3-оксопиразол]пропана устанавливали методами масс-спектрометрии и спектроскопии комбинационного рассеяния (КР).

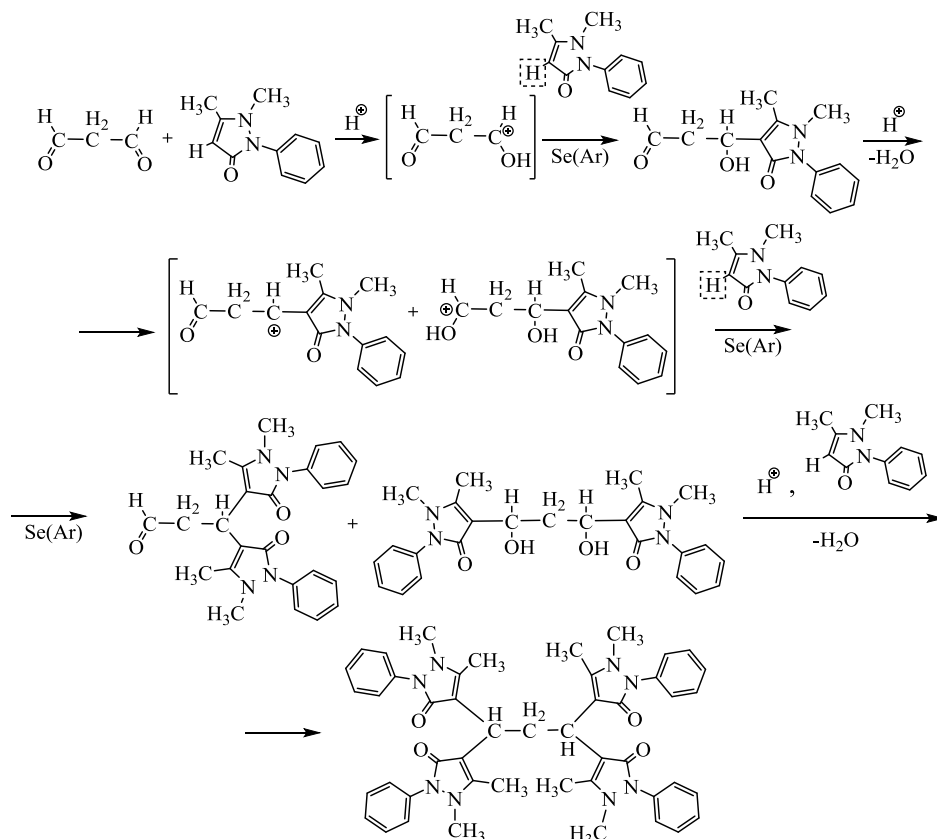


Рис. 1. Взаимодействие малонового альдегида и антипирина в кислой среде

Fig. 1. Interaction of malonic aldehyde and antipyrine in an acidic environment

Масс-спектры записаны на квадрупольном времяпролетном масс-спектрометре сверхвысокого разрешения MaxisImpact HD (Bruker Daltonics). Образец был растворен в ДМСО и разбавлен ацетонитрилом в соотношении 1 к 80. По результатам масс-спектрометрии найдено, m/z : 789,3865 $[M+H]^+$, 811,3668 $[M+Na]^+$. $C_{47}H_{53}N_8O_4$. Масс-спектр вычислено, m/z , – 788,3799.

Спектр КР вещества записан на спектрометре RamMicsM532 (цифровой микроскоп OlympusCX-41 с КР-анализатором EnSpectrR532 ScientificEdition). По результатам анализа КР-спектра установлено присутствие следующих полос рассеяния, ν , cm^{-1} :

3068 (m) $\nu(C-H)_{N\text{-substituted Pyrazolone}}$,
 2990 (w) $\nu(C-H)_{-CH_2-}$,
 2922 (m) $\nu_{asym}(C-H)_{-CH_2-}$,
 2900 (m) $\nu_{sym}(C-H)_{-CH_2-}$,
 1655(w) $\nu(C=O)_{Pyrazolone}$,
 1621 (m) $\nu(C=C)_{Pyrazolone}$,
 1600 (s) $\nu(-C=C-)_{Ar}$,
 1495 (w) $\delta_{3\text{-subst. Ring vib}}$,
 1452 (w) $\delta_{4\text{-subst. Ring vib}}$,
 1403 (w) $\delta_{N\text{-alkyl subst. Ring vib}}$,
 1334 (m) $\nu(C_{Ar}-N)$,
 1308 (m) $\nu(C_{Ar}-N)$,
 double 1174,
 1175 (w) $\nu(C_R-N_{tret})_{Pyrazolone}$,
 1097 (w) $\delta_{rocking}(-CH_3)_N(Pyrazolone)$,

1021 (w) $\delta_{rocking}(C-C)$,
 999 (s) $\nu(C-C)$,
 835 (w) $\delta_{outofplane}(C-H)_{Ar}$,
 641(m) $\delta_{inplane}(C-H)_{Ar}$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Производные 1,2-дигидро-1,5-диметил-2-фенил-3-пиразолона образуются по реакции электрофильного замещения в пиразолоновый цикл катионов ацилия.

Установление структуры очищенного продукта синтеза проводилось при помощи масс-спектрометрии и спектроскопии КР. Наблюдаемые в масс-спектре пики протонированного молекулярного иона $[M+H]^+$ ($m/z = 789,3865$) и аддукта с катионом натрия $[M+Na]^+$ ($m/z = 811,3668$) совпадают с расчетными данными, полученными при помощи пакета программ ChemOffice: $m/z_{[M+H]^+} = 789,3877$; $m/z_{[M+Na]^+} = 811,3696$ (рис. 2). Интенсивность пиков $[M+1+H]^+$, $[M+2+H]^+$ и т.д. обусловлена вкладом изотопов ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O и отвечает расчетным данным: m/z : 789,3877 (100,0%); 790,3910 (50,8%); 790,3847 (3,0%); 791,3944 (12,6%). Серия изотопов для $[M+Na]^+$ (m/z): 811,3696 (100,0%); 812,3730 (50,8%); 813,3763 (12,6%); 814,3667 (3,0%). Это подтверждает получение целевого продукта – 1,1,3,3-тетра-[1,2-дигидро-1,5-диметил-2-фенил-3-оксопиразол]пропана.

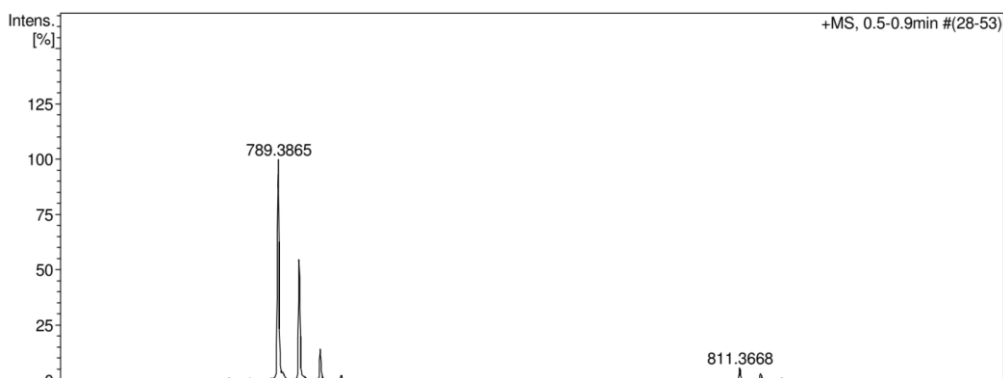


Рис. 2. Масс-спектр комплексов молекулярных ионов $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$

Fig. 2. Mass spectrum of molecular ions complexes $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$

Учитывая, что перекристаллизацию вещества осуществляли из раствора этилового спирта, а также принимая во внимание возможность образования енольных форм (рис. 3), необходимо было установить форму нахождения вещества в продукте кристаллизации. Методом спектроскопии КР было определено, что набор полос соответствует рамановским сдвигам характеристических групп (бензольного кольца, пиразолонового кольца, алифатической цепи), при этом вещество находится исключительно в кето-форме. Отсутствие на раман-спектре 1,1,3,3-тетра-[1,2-дигидро-1,5-диметил-2-фенил-3-оксопиразол]пропана полос неэластичного рассеяния фотонов, характерных для катионов иминия(I) в области $2700\text{--}2330\text{ см}^{-1}$, а также енольных

групп (II) в области $1635\text{--}1615\text{ см}^{-1}$, свидетельствует о нахождении вещества исключительно в кето-форме (рис. 4).

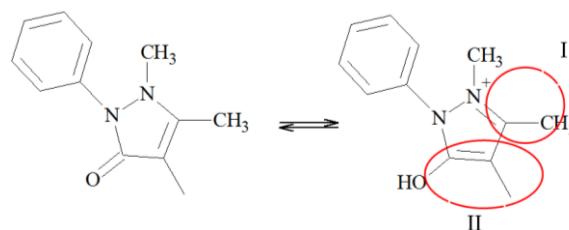


Рис. 3. Схема кето-енольной таутомерии пиразолонового цикла

Fig. 3. Keto-enol tautomerism of the Pyrazolone Cycle

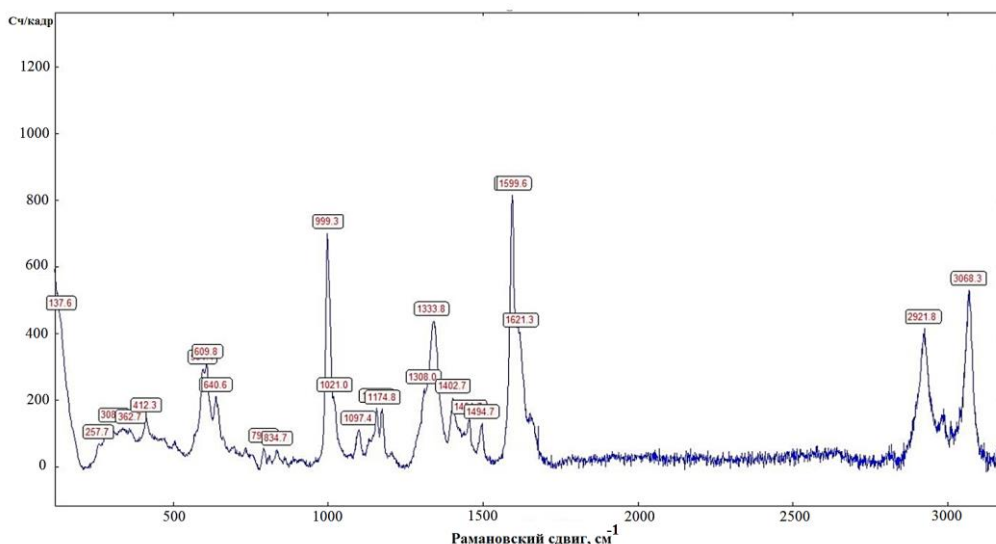


Рис. 4. Раман-спектр 1,1,3,3-тетра-[1,2-дигидро-1,5-диметил-2-фенил-3-оксопиразол]пропана

Fig. 4. Raman spectrum of 1,1,3,3-tetra-[1,2-dihydro-1,5-dimethyl-2-phenyl-3-oxopyrazole]propane

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе исследования успешно проведены синтез нового тетраденатного производного антипирина –1,1,3,3-тетра-[1,2-дигидро-1,5-диметил-2-фенил-3-оксопиразол]бутана, его очистка и выделение в устойчивой кри-

сталлической форме с выходом 17,1%. Методами масс-спектрометрии и спектроскопии комбинационного рассеяния проведена идентификация структуры и выявлена форма нахождения продукта синтеза.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Elattar K.M, Fadda A.A. Chemistry of antipyrine // *Synthetic Communications*. 2016. Vol. 46. Issue 19. P. 1567–1594. <https://doi.org/10.1080/00397911.2016.1211703>
2. Дегтёв М.И., Аликина Е.Н. Физико-химические свойства антипирин и его производных: монография. Пермь: Изд-во Пермского государственного университета, 2009. 174 с.
3. Дегтёв М.И., Аликина Е.Н., Порошина Н.В. Экстракционные возможности новых расслаивающихся систем без органического растворителя // *Вестник Пермского университета. Серия: Химия*. 2011. N 1 (1). С. 51–59.
4. Петров Б.И., Калиткин К.В., Назмецева К.А. Экстракционная система без органического растворителя вода – антипирин – сульфосалициловая кислота // *Известия Алтайского государственного университета*. 2013. N 3-2 (79). С. 198–208. [https://doi.org/10.14258/izvasu\(2013\)3.2-42](https://doi.org/10.14258/izvasu(2013)3.2-42)
5. Petrov BI, Lesnov AE, Denisova SA. Phase and extraction equilibriums in aqueous segregable systems with protolytic interaction // *Journal of Analytical Chemistry*. 2015. Vol. 70. Issue 6. P. 647–660. <https://doi.org/10.1134/S1061934815040140>
6. Денисова С.А., Леснов А.Е., Петров Б.И. Экстракция циркония диантипирилметаном и диантипирилгептаном в экстракционных системах различного типа // *Известия Алтайского государственного университета*. 2014. N 3-1 (79). С. 177–181. [https://doi.org/10.14258/izvasu\(2014\)3.1-32](https://doi.org/10.14258/izvasu(2014)3.1-32)
7. Темерев С.В., Станкевич О.Б. Экстракция веществ расплавами пиразолона их хлоридных растворов // *Известия Алтайского государственного университета*. 2013. N 3-1 (79). С. 175–182.
8. Логинова О.Б., Темерев С.В. Применение новых расслаивающихся систем с производными пиразолона для извлечения и определения ионов меди, свинца, кадмия и цинка из водных растворов // *Известия Алтайского государственного университета*. 2011. N 3-1 (71). С. 126–129.
9. Логинова О.Б., Темерев С.В. Особенности извлечения ионов меди, свинца кадмия и цинка из водных растворов производными пиразолона с последующим определением инструментальными методами // *Известия Алтайского государственного университета*. 2012. N 3-2 (75). С. 132–137.
10. Дегтёв М.И., Аликина Е.Н., Амиджанов А.А., Попова О.Р. Расслаивающиеся системы без органического растворителя – новый тип экстракции макро- и микроколичеств ионов металлов // *Доклады Академии наук Республики Таджикистан*. 2012. Т. 55. N 8. С. 664–668.
11. Дегтёв М.И., Юминова А.А., Амиджанов А.А., Максимов А.С. Расслаивающиеся системы антипирин, сульфосалициловой кислоты, сульфата натрия и воды для извлечения макроколичеств ионов металлов // *Доклады Академии наук Республики Таджикистан*. 2014. Т. 57. N 4. С. 315–320.
12. Заболотных С.А., Желнина В.О., Денисова С.А., Елохов А.М., Леснов А.Е. Использование расслаивающейся системы вода – антипирин – алкилбензолсульфо кислота для экстракции ионов металлов // *Журнал Сибирского федерального университета. Химия*. 2017. Т. 10. N 4. С. 536–544. <https://doi.org/10.17516/1998-2836-0047>
13. Строганова Е.А., Улядарова В.Е. Синтез и исследование структуры функционального производного 4,4-метилена-бис-(1,2-дигидро-1,5-диметил-2-фенил-3-пиразолона) // *Вестник Оренбургского государственного университета*. 2015. N 10 (185). С. 316–321.
14. Ефимов В.В., Андреева А.В., Любяшкин А.В., Товбис М.С. Синтез новых производных пиразола // *Решетневские чтения*. 2016. N 20. С. 334–336.
15. Demirci S. Synthesis and biological activity studies of some new hybrid compounds derived from antipyrine // *Heterocyclic Communications*. 2016. Vol. 22. Issue 3. P. 143–149. <https://doi.org/10.1515/hc-2016-0002>
16. Abu-Melha S. Synthesis, modeling study and antioxidants activity of new heterocycles derived from 4-antipyrinyl-2-chloroacetoamidothiazoles // *Applied Sciences*. 2018. Vol. 8. Issue 11. P. 2128. <https://doi.org/10.3390/app8112128>
17. Ei Ashry E.S.H., Awad L.F., Ibrahim E.I., Bdeewy O.Kh. Synthesis of antipyrine derivatives derived from dimedone // *Chinese Journal of Chemistry*. 2007. Vol. 25. Issue 4. P. 570–573. <https://doi.org/10.1002/cjoc.200790107>
18. Bayrak H., Cebeci Y.U., Karaoğlu Ş.A. Synthesis of novel antipyrine derivatives possessing remarkable antimicrobial activities // *Chemistry Select*. 2019. Vol. 4. Issue 44. P. 12906–12908. <https://doi.org/10.1002/slct.201902376>
19. Поваров И.Г., Ефимов В.В., Любяшкин А.В., Косицына А.С., Субоч Г.А., Товбис М.С. Получение сульфаниламидов на основе новых производных аминопиразолов // *Журнал Сибирского федерального университета. Химия*. 2019. Т. 12. N 2. С. 240–247. <https://doi.org/10.17516/1998-2836-0122>
20. Baysal Z., Aksoy E., Dolak İ., Ersöz A., Say R. Adsorption behaviours of lysozyme onto polyhydroxyethyl methacrylate cryogels containing methacryloyl antipyrine-Ce(III) // *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2018. Vol. 67. Issue 4. P. 199–204. <https://doi.org/10.1080/00914037.2017.1320655>

REFERENCES

1. Elattar KM, Fadda AA. Chemistry of antipyrine. *Synthetic Communications*. 2016;46(19):1567–1594. <https://doi.org/10.1080/00397911.2016.1211703>
2. Degtev MI, Alikina EN. *Physicochemical properties of antipyrine and its derivatives*. Perm: Perm State University; 2009. 174 p. (In Russian)
3. Degtev MI, Alikina EN, Poroshina NV. Extractive possibilities of new phase-separation systems without organic solvent. *Vestnik Permskogo universiteta. Seriya: Khimiya = Bulletin of Perm University. Chemistry*. 2011;1:51–59. (In Russian)
4. Petrov BI, Kalitkin KV, Nazemtseva KA. Extraction system without an organic solvent water – antipyrine – sulfosalicylic acid. *Izvestiya Altaiskogo gosudarstvennogo universiteta = Izvestiya of Altai State University*. 2013;3-2:198–208. (In Russian) [https://doi.org/10.14258/izvasu\(2013\)3.2-42](https://doi.org/10.14258/izvasu(2013)3.2-42)
5. Petrov BI, Lesnov AE, Denisova SA. Phase and extraction equilibriums in aqueous segregable systems with protolytic interaction. *Journal of Analytical Chemistry*. 2015;70(6):647–660. <https://doi.org/10.1134/S1061934815040140>
6. Denisova SA, Lesnov AE, Petrov BI. Extraction of zirconium by diantiprylmethane and diantiprylhethane in xtraction systems of various types. *Izvestiya Altaiskogo gosudarstvennogo universiteta = Izvestiya of Altai State University*. 2014;3-1:177–181. (In Russian) [https://doi.org/10.14258/izvasu\(2014\)3.1-32](https://doi.org/10.14258/izvasu(2014)3.1-32)
7. Temerev SV, Stankevich OB. Extraction of substances by melting pyrazolones from chloride solutions. *Izvestiya Altaiskogo gosudarstvennogo universiteta = Izvestiya of Altai State University*. 2013;3-1:175–182. (In Russian)
8. Loginova OB, Temerev SV. Using a new bottom system with a pyrazolone derivatives for extraction and determination of Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} and Zn^{2+} ions from water solutions. *Izvestiya Altaiskogo gosudarstvennogo universiteta = Izvestiya of Altai State University*. 2011;3-1:126–129. (In Russian)
9. Loginova OB, Temerev SV. Features of copper, lead, cadmium and zinc ion extraction from aqueous solutions by pyrazolone derivatives with the subsequent determination by instrumental methods. *Izvestiya Altaiskogo gosudarstvennogo universiteta = Izvestiya of Altai State University*. 2012;3-2:132–137. (In Russian)
10. Degtev MI, Alikina EN, Aminjanov AA, Popova ON. Exfoliate systems without organic solvents – new type macro and extraction of metal ions microquantities. *Doklady Akademii nauk Respubliki Tadjikistan = Reports of the Academy of Sciences of the Republic of Tajikistan*. 2012;55(8):664–668. (In Russian)
11. Degtev MI, Yuminova AA, Aminjanov AA, Maksimov AS. Organic-solvent-free extraction systems with phase separation based on antipyrine, sulfosalicylic acid, sodium sulphate and water for extraction of metal ions macroamounts. *Doklady Akademii nauk Respubliki Tadjikistan = Reports of the Academy of Sciences of the Republic of Tajikistan*. 2014;57(4):315–320. (In Russian)
12. Zabolotnykh SA, Zhelnina VO, Denisova SA, Elokhov AM, Lesnov AE. The water – antipyrine – alkyl benzene sulfonic acid stratifying system to extract metal ions. *Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Khimiya = Journal of Siberian Federal University. Chemistry*. 2017;10(4):536–544. (In Russian) <https://doi.org/10.17516/1998-2836-0047>
13. Stroganova EA, Ulyadarova VE. Synthesis and research of structure of new functional compound based on 4,4-metilen-bis-(1,2-dihidro-1,5-dimethyl-2-phenil-3-pirazolone). *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta = Vestnik Orenburg State University*. 2015;10:316–321. (In Russian)
14. Efimov VV, Andreeva AV, Lyubyashkin AV, Tovbis MS. Synthesis of new pyrazole derivatives. *Reshetnevskie chteniya = Reshetnev Readings*. 2016;20:334–336. (In Russian)
15. Demirci S. Synthesis and biological activity studies of some new hybrid compounds derived from antipyrine. *Heterocyclic Communications*. 2016;22(3):143–149. <https://doi.org/10.1515/hc-2016-0002>
16. Abu-Melha S. Synthesis, modeling study and antioxidants activity of new heterocycles derived from 4-antipyrinyl-2-chloroacetoamidothiazoles. *Applied Sciences*. 2018;8(11):2128. <https://doi.org/10.3390/app8112128>
17. Ei Ashry ESH, Awad LF, Ibrahim EI, Bdeewy OKh. Synthesis of antipyrine derivatives derived from dimedone. *Chinese Journal of Chemistry*. 2007;25(4):570–573. <https://doi.org/10.1002/cjoc.200790107>
18. Bayrak H, Cebeci YU, Karaoğlu ŞA. Synthesis of novel antipyrine derivatives possessing remarkable antimicrobial activities. *Chemistry Select*. 2019;4(44):12906–12908. <https://doi.org/10.1002/slct.201902376>
19. Povarov IG, Efimov VV, Lyubyashkin AV, Kositsyna AS, Suboch GA, Tovbis MS. Synthesis of sulphanylamides from new derivatives of aminopyrazoles. *Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Khimiya = Journal of Siberian Federal University. Chemistry*. 2019;12(2):240–247. (In Russian) <https://doi.org/10.17516/1998-2836-0122>
20. Baysal Z, Aksoy E, Dolak İ, Ersöz A, Say R. Adsorption behaviours of lysozyme onto polyhydroxyethyl methacrylate cryogels containing methacryloylantipyrine-Ce(III). *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2018;67(4):199–204. <https://doi.org/10.1080/00914037.2017.1320655>

Критерии авторства

Бабадеев Д.В., Строганова Е.А. выполнили экспериментальную работу. Авторы совместно обобщили результаты, написали рукопись, имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бабадеев Дмитрий Викторович,
магистрант,
Казанский федеральный университет,
Химический институт им. А.М. Бутлерова,
420111, г. Казань, ул. Кремлёвская, 29/1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: dima.babadeev@mail.ru

Строганова Елена Алексеевна,
к.х.н., старший преподаватель
кафедры химии,
Оренбургский государственный университет,
460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13,
Российская Федерация,
e-mail: Stroganova_Helen@mail.ru

Contribution

Dmitrii V. Babadeev, Elena A. Stroganova carried out the experimental work. The authors on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. All authors have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict interests

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

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

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Dmitrii V. Babadeev,
Master Student,
Kazan Federal University,
Alexander Butlerov Institute of Chemistry,
29/1, Kremlin St., Kazan, 420111,
Russian Federation,
✉ e-mail: dima.babadeev@mail.ru

Elena A. Stroganova,
Cand. Sci (Chemistry), Senior Lecturer,
Chemistry Department,
Orenburg State University,
13, Pobedy Ave., Orenburg, 460018,
Russian Federation,
e-mail: Stroganova_Helen@mail.ru

Оригинальная статья / Original article

УДК 543.25:544.355-128

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-393-400>



Прикладные аспекты кислотно-основных взаимодействий и моделирование равновесных концентраций в двухкомпонентных смесях кислот

© Б.Б. Танганов

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления,
г. Улан-Удэ, Российская Федерация

Резюме: Исследования в области теории и практики водных и неводных растворов сильных и слабых электролитов по-прежнему остаются актуальными. В зарубежной и отечественной литературе есть немало число публикаций по обсуждаемой теме. При этом практически во всех работах кислотно-основные взаимодействия рассматриваются в зависимости от изменения лишь концентрации ионов водорода, в то время как на ионную силу раствора оказывают влияние все присутствующие в системе ионы, концентрация которых переменна в процессе взаимодействия, в частности, при потенциометрическом титровании сильных и слабых электролитов не только в водных, но и в более сложных неводных растворах, значительно отличающихся своими базисными свойствами (диэлектрическая проницаемость, ионное произведение, дипольный момент, вязкость и др.). При исследовании равновесий более приемлема и допустима разработка различных модельных представлений, значительно упрощающих и ускоряющих вычисление и оценку тех или иных свойств рассматриваемых систем. В настоящей работе процессы кислотно-основного взаимодействия представлены в виде базисных уравнений, основанных на законах действующих масс, а также уравнений, выражающих равновесные процессы, ионное произведение растворителя, электронейтральность и материальный баланс в электролитных системах. Приведенные уравнения позволяют учесть влияние концентраций всех заряженных частиц в системе (не только ионов водорода – pH) на ионную силу раствора, коэффициенты активности и, как следствие, на термодинамическую константу диссоциации, а также выразить зависимости равновесных концентраций всех заряженных частиц от кислотности раствора, определяемой потенциометрическим методом, в удобных и объективных логарифмических координатах, дающих возможность оценить концентрации всех частиц в любой момент титрования.

Ключевые слова: кислотно-основные взаимодействия, концентрация ионов водорода, модельные представления, логарифмическая диаграмма, нивелирующий растворитель

Информация о статье: Дата поступления 24 октября 2019 г.; дата принятия к печати 31 августа 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2020 г.

Для цитирования: Танганов Б.Б. Прикладные аспекты кислотно-основных взаимодействий и моделирование равновесных концентраций в двухкомпонентных смесях кислот. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.* 2020. Т. 10. N 3. С. 393–400. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-393-400>

Applied aspects of acid-base interactions and modelling equilibrium concentrations in two-component acid mixtures

B.B. Tanganov

East Siberian State University of Technology and Management,
Ulan-Ude, Russian Federation

Abstract: Fundamental and applied research into aqueous and non-aqueous solutions of strong and weak electrolytes remains to be highly relevant, which fact is confirmed by a large number of Russian and foreign publications. In almost all such publications, acid-base interactions are considered exclusively with regard to changes in hydrogen ion concentrations. However, the ionic strength of solutions is determined by all ions present in the system, the concentration of which varies during interactions. This is particularly true for potentiometric titration of strong and weak electrolytes not only in aqueous, but also in more complex non-aqueous solutions, which differ significantly in their basic properties (dielectric constant, ionic product, dipole moment, viscosity, etc.). In the study of equilibria, it is more feasible to develop model representations that would

greatly simplify and facilitate the computation and evaluation of certain properties of the system under consideration. In this work, acid-base interactions are presented in the form of equations based on mass action laws and those describing equilibrium processes, solvent ionic product, electroneutrality and material balance in electrolyte systems. The proposed equations consider the effect of the concentrations of all charged particles in the system (not only of hydrogen ions – pH) on the ionic strength of the solution, activity coefficients and, as a consequence, the thermodynamic dissociation constant. In addition, these equations allow the dependence between the equilibrium concentrations of all charged particles and the solution acidity determined by the potentiometric method to be expressed in convenient and objective logarithmic coordinates, thus facilitating estimation of the concentration of all particles at any moment of titration.

Keywords: acid-base interactions, hydrogen ion concentration, model representations, logarithmic diagram, levelling solvent

Information about the article: Received October 24, 2019; accepted for publication August 31, 2020; available online September 30, 2020.

For citation: Tanganov BB. Applied aspects of acid-base interactions and modelling equilibrium concentrations in two-component acid mixtures. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):393–400. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-393-400>

ВВЕДЕНИЕ

Вопросам кислотно-основных взаимодействий посвящено множество статей и монографий, заслушано большое количество сообщений на форумах разного уровня. В большинстве из них (например, [1–4]) обсуждались кислотно-основные равновесия на основе потенциометрических измерений кислотности или щелочности растворов, дающих представление о величинах концентрации лишь ионов водорода с последующим расчетом констант диссоциации [5–9].

Между тем для определения термодинамических констант диссоциации электролитов требуется учет не только концентрации ионов водорода, но и всех заряженных частиц, существенно влияющих на ионную силу всей системы и, как следствие, на количественную характеристику в виде коэффициента активности $K_{\text{дисс}}^1$ [10–13]. Иногда наблюдалась существенная разница между концентрационной (кажущейся) и более точной термодинамической константой, более приемлемой для теоретических исследований кислотно-основной силы растворов электролитов.

В данной работе изучалось поведение компонентов в нивелирующем растворителе, предложено применение логарифмических диаграмм «рН раствора – величины равновесных концентраций компонентов смеси», позволяющих осуществить экспресс-оценку концентраций всех частиц в кислотно-основной системе. Целью исследования также являлось определение термодинамических констант диссоциации хлороводородной (не соляной) и хлоруксусной кислот с учетом влияния концентраций всех частиц, участвующих в титруемой системе.

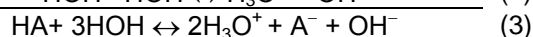
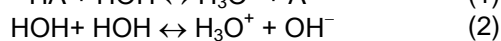
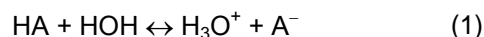
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методы исследования. Методом потенцио-

метрического титрования построена интегральная кривая смеси хлороводородной и хлоруксусной кислот, соответствующая совместной нейтрализации обеих кислот с константами диссоциации, отличающимися небольшой разницей в показателях термодинамических констант диссоциации pK ($\Delta pK < 3$). Построена логарифмическая диаграмма для оценки равновесных концентраций частиц в любой точке титрования.

Измерения электродвижущей силы цепи без переноса (ЭДС) и потенциометрическое титрование осуществляли при $25,0 \pm 0,2$ °C на рН-метре-милливольтметре Metrohm-632 (Швейцария). Проверка водородной ошибки стеклянного электрода в разбавленных и концентрированных растворах сильных и слабых кислот и оснований была проведена ранее.

Графическое и математическое выражения логарифмических диаграмм. Рассмотрим пример реакции взаимодействия слабой одноосновной кислоты HA с водой:



В дальнейшем для простоты рассуждений и последующих расчетов ион гидроксония H_3O^+ обозначим просто как H^+ .

Для расчета равновесных концентраций необходимо составить систему из четырех уравнений с четырьмя неизвестными:

1. Уравнение, основанное на применении закона действующих масс к диссоциации слабой кислоты (реакция (1)):

$$(\text{C}_{\text{H}^+}) \cdot (\text{C}_{\text{A}^-}) / \text{C}_{\text{HA}} = K_a, \quad (4)$$

где K_a – константа кислотности слабой кислоты HA;

¹Albert A., Sergeant E.P. The determination of Ionization constants: a laboratory manual. 3rd Ed. London-New York: Chapman and Hall, 1984. 101 p.

2. Выражение для ионного произведения воды в соответствии с реакцией (2):

$$[C_{H^+}] \cdot [C_{OH^-}] = K_W, \quad (5)$$

где K_W – константа автопротолиза (ионизации), или ионное произведение воды;

3. Уравнение, полученное исходя из того, что в водных растворах протоны не могут находиться в свободном состоянии и число гидратированных протонов, отданное одноосновными кислотами, равно количеству гидратированных протонов, принятых одноосновными основаниями. Другими словами, суммарные концентрации всех образовавшихся одноосновных кислот и одноосновных оснований этой системы равны между собой. Это отражено в правой части реакции (3), откуда следует

$$C_{H^+} = C_{OH^-} + C_{A^-}; \quad (6)$$

4. Уравнение, основанное на применении закона сохранения масс (материального баланса) к кислоте или основанию соответственно:

$$C_0 = C_{HA} + C_{A^-}, \quad (7)$$

где C_0 – общая концентрация кислоты (или основания). Общая концентрация постоянна при постоянном объеме раствора, это условие обычно хорошо соответствует практике (например, при титровании).

Обычные интегральные кривые титрования, которые могут быть построены при расчетах pH в каждый момент титрования, или другие методы не дают представления о равновесных концентрациях всех частиц, находящихся в титруемом растворе [14–20]. Но для оценки кислотно-основного равновесия (в смесях электролитов) необходимо знать именно эти величины. Такую возможность дают логарифмические диаграммы [21, 22]. Для их построения на оси абсцисс откладывают значения pH, а на оси ординат – значения десятичных логарифмов концентраций всех частиц [23].

На рис. 1 в качестве примера изображена логарифмическая диаграмма, построенная для одноосновной бензойной кислоты C_6H_5COOH с константой диссоциации $K_a = 6,46 \cdot 10^{-5}$ ($pK = 4,19$) и общей концентрацией $C = 10^{-2}$ моль/дм³ (в последующем для удобства концентрацию будем выражать в более привычных и удобных единицах – моль/л).

На примере диаграммы, изображенной на рис. 1, можно оценить общую концентрацию C_0 в точке, в которой ветвь кривой HA (начало ряда 2), параллельная оси pH, пересекает ось ординат так, что в этой точке $\lg C = \lg C_0$.

Силу кислоты, характеризующую константой диссоциации K_a , определяют по уравнению $pH = pK_a$, беря значение pH по параллельной ветви HA, начиная с которого (при одном и том же масштабе по осям абсцисс и ординат) линия

кислоты отклоняется под углом 45° вниз направо, а линия основания под таким же углом – вниз налево (точка пересечения рядов 2 и 3). В этой точке $C_{HA} = C_{A^-}$; $\lg C_{HA} = \lg C_{A^-} = \lg C_0 - 0,301 = -2,301$. Получаемые при этом кривые асимптотически приближаются к гиперболам. В областях $pH < pK_a$ и $pH > pK_a$ кривые практически совпадают с гиперболами, если они пересекаются в точке с абсциссой pK_a и ординатой $\lg C_0 - 0,301$. При этом $pH \approx pK_a$.

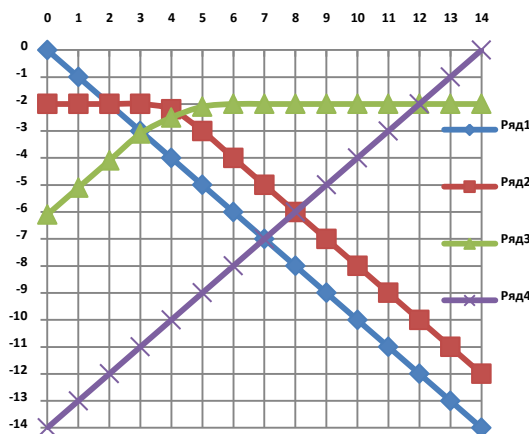


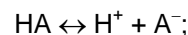
Рис 1. Логарифмическая pH-диаграмма бензойной кислоты: $K = 6,46 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $pK = 4,19$; $C = 0,01$ моль/л; pH относится к раствору эквимольной смеси бензойной кислоты с бензоатом натрия (ось абсцисс – величины pH; ось ординат – логарифмы концентраций всех равновесных частиц).

Ряд 1 – $\lg[H^+]$;
 ряд 2 – концентрации $\lg C_{HA}$;
 ряд 3 – концентрации $\lg C_{A^-}$;
 ряд 4 – концентрации $\lg C_{OH^-}$

Fig. 1. Logarithmic pH diagram of benzoic acid: $K = 6,46 \cdot 10^{-5}$ mol/l; $pK = 4,19$; $C = 0,01$ mol/l; pH refers to the solution of equimolar mixture of benzoic acid and sodium benzoate (the abscissa axis is the pH value; the ordinate axis is the logarithms of the concentrations of all equilibrium particles).

Row 1 – $\lg[H^+]$;
 row 2 – $\lg C_{HA}$ concentrations;
 row 3 – $\lg C_{A^-}$ concentrations;
 row 4 – $\lg C_{OH^-}$ concentrations

Равенство $pH = pK_a$ можно показать также из уравнения для константы равновесия процесса диссоциации сильной и слабой кислоты с учетом коэффициентов активности по Дэвису:



$$K_a = [C_{H^+} f_1] \cdot [C_{A^-} f_2] / [C_{HA}]. \quad (7a)$$

Когда $[C_{HA}] = [C_{A^-}]$, т.е. оттитрована половина кислоты, расчеты по Дэвису приводят к равенству коэффициентов активности.

Вершины углов диаграммы связаны двумя диагоналями (линиями 1 и 4), описываемыми уравнениями $\lg C_{H^+} = -pH$ или $\lg C_{OH^-} = pH - pK_w$. Они всегда пересекаются в точке нейтральности

$pH = 7$ (независимо от величины C_0 и K_a для кислот или C_0 и K_b для оснований).

Логарифмическая диаграмма дает значения равновесных концентраций всех компонентов кислотно-основной системы в зависимости от pH и этим выгодно отличается от представления интегральной кривой при кислотно-основном титровании.

Кривые (ряды), приведенные на диаграмме $\lg C - pH$ (см. рис. 1), построены на основании уравнений, в которых концентрации C_{HA} и C_{A^-} являются функцией pH . Эти зависимости выведены комбинированием уравнений (4)–(7). При решении их относительно C_{HA} и затем относительно C_{A^-} получаем следующие уравнения:

$$C_{HA} = C_0 C_H^+ / (C_H^+ + K_a) = C_0 / (1 + K_a / C_H^+) = C_0 / [1 + 10^{(pH - pK_a)}]; \quad (8)$$

$$C_{A^-} = C_0 K_a / (C_H^+ + K_a) = C_0 / (1 + C_H^+ / K_a) = C_0 / [1 + 10^{(pK_a - pH)}]. \quad (9)$$

Логарифмирование уравнения (8) приводит к равенству:

$$\lg C_{HA} = \lg C_0 - \lg [1 + 10^{(pH - pK_a)}], \quad (10)$$

а уравнения (9) – к выражению:

$$\lg C_{A^-} = \lg C_0 - \lg [1 + 10^{(pK_a - pH)}]. \quad (11)$$

При графическом изображении этих зависимостей на диаграмме $\lg C_0 - pH$ получаются сильно растянутые изогнутые линии, представленные на рис. 1. Их можно найти аппроксимацией двух областей каждой кривой. Для кривой HA (линии кислоты) используют:

а) область $pH < pK_a$. При этом условии в уравнении (10) величина $10^{(pH - pK_a)}$ будет намного меньше 1, откуда для левой ветви кривой

$$\lg C_{HA} = \lg C_0. \quad (12)$$

Это означает, что линия кислоты в области $pH < pK_a$ параллельна оси pH и отстоит от нее на расстоянии $\lg C_0$ (левая часть ряда 2);

б) область $pH > pK_a$. В этом случае $10^{(pH - pK_a)} \gg 1$, и поэтому из уравнения (10) следует

$$\lg C_{HA} = pK_a - pH + \lg C_0. \quad (13)$$

Эта функция представлена на диаграмме в виде нисходящей под углом 45° кривой (при одинаковом масштабе по осям ординат и абсцисс) (правая часть ряда 2), пересекающей верхнюю кривую (уравнение (10)) при $pH = pK_a$;

в) точку $pH = pK_a$. Из уравнений (8) и (9) получаются значащие ординаты (точка пересечения рядов 2 и 3):

$$\lg C_{HA} = \lg C_{A^-} = \lg C_0 - \lg 2 = \lg C_0 - 0,301. \quad (14)$$

Аналогично для линии основания используют:

а) при $pH < pK_a$ из уравнения (11) $\lg C_{A^-}$ соответствует

$$\lg C_{A^-} = pH - pK_a + \lg C_0 \quad (15)$$

Уравнение (15) описывает левую прямолинейную ветвь линии основания, восходящую под углом 45° ;

б) область $pH > pK_a$. При этом из уравнения (11) получают

$$\lg C_{A^-} = \lg C_0. \quad (16)$$

Уравнение (16) описывает ветвь линии основания, параллельной оси pH (левая часть ряда 3);

в) точку $pH = pK_a$. При этом, как было показано выше,

$$\lg C_{A^-} = \lg C_0 - 0,301. \quad (17)$$

Связь между диаграммами $\lg C - pH$ и кривыми титрования значительно упрощает построение и анализ кривой титрования.

На рис. 2 показана интегральная кривая титрования водного раствора смеси 0,05 М хлорводородной (HA_1) и хлоруксусной (HA_2) кислот водным раствором KOH . Как видно, смесь титруется с одним скачком, соответствующим одновременной нейтрализации обеих кислот. В данном примере вода – нивелирующий растворитель по отношению к рассматриваемой смеси.

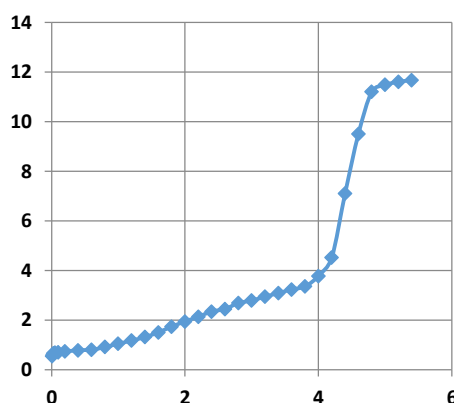


Рис. 2. Интегральная кривая титрования в воде смеси HA_1 и HA_2 кислот водным раствором гидроксида калия (ось абсцисс – V мл KOH ; ось ординат – pH раствора)

Fig. 2. Integral curve of titration in water of a mixture of HA_1 and HA_2 acids with an aqueous solution of potassium hydroxide (abscissa axis – KOH volume, ml; ordinate axis – pH of the solution)

На рис. 3 представлена логарифмическая диаграмм на основании расчетных уравнений (10)–(17) для разных участков нейтрализации HA_1 и HA_2 . Так, ряд 1 характеризует ход изменения равновесной концентрации первого компонента HA_1 по уравнениям (12)–(14), ряд 2 соответствует изменению равновесной концентрации сопряженного кислоте основания A_1^- согласно равенствам (15)–(17). Аналогично, ряду 3 соответствует изменение равновесной концентрации

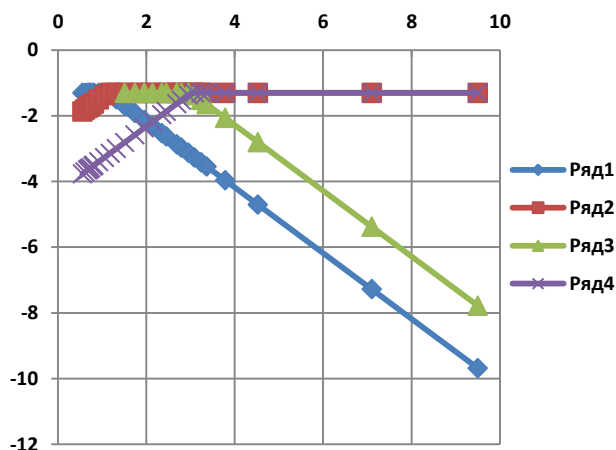


Рис. 3. Логарифмическая pH-диаграмма смеси 0,05 М HA_1 и 0,05 М HA_2 . $K(HA_1) = 10^{-1}$ моль/л; $K(HA_2) = 10^{-3}$ моль/л (ось абсцисс – величины pH; ось ординат – логарифмы концентраций всех равновесных частиц).
 Ряд 1 – $\lg[HA_1]$; ряд 2 – $\lg C(A_1^-)$;
 ряд 3 – $\lg C(HA_2)$; ряд 4 – $\lg C(A_2^-)$

Fig. 3. Logarithmic pH diagram of a mixture of 0,05 M HA_1 and 0,05 M HA_2 . $K(HA_1) = 10^{-1}$ mol/l; $K(HA_2) = 10^{-3}$ mol/l (the abscissa axis is the pH value; the ordinate axis is the logarithms of the concentrations of all equilibrium particles).
 Row 1 – $\lg[HA_1]$; row 2 – $\lg C(A_1^-)$;
 row 3 – $\lg C(HA_2)$; row 4 – $\lg C(A_2^-)$

Некоторые данные потенциметрического титрования смеси HA_1 и HA_2 водным раствором гидроксида калия (столбцы 1, 2), параметры для построения логарифмической диаграммы и расчетов pK_1 , pK_2 (столбцы 3–11)
 Data of potentiometric titration of HA_1 and HA_2 mixture with an aqueous solution of potassium hydroxide (columns 1 and 2), parameters for logarithmic chart and calculations of pK_1 , pK_2 (columns 3–11)

V, мл NaOH	pH	$[H^+]$	$\lg[HA_1]$	$\lg[A_1^-]$	$\lg[HA_2]$	$\lg[A_2^-]$	I	$\lg f$	pK_{HA1}	pK_{HA2}
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0,01	0,55	0,2818	-1,301	-1,871	-1,301	-3,771	0,08254	-0,1198	1,377	3,276
0,02	0,61	0,2454	-1,301	-1,811	-1,301	-3,711	0,08845	-0,1234	1,377	3,276
0,03	0,67	0,2137	-1,301	-1,751	-1,301	-3,651	0,09477	-0,1271	1,377	3,276
0,05	0,69	0,2041	-1,301	-1,731	-1,301	-3,631	0,09698	-0,1284	1,377	3,276
0,1	0,71	0,1949	-1,301	-1,711	-1,301	-3,611	0,09924	-0,1297	1,379	3,279
0,2	0,74	0,1819	-1,301	-1,681	-1,301	-3,581	0,10273	-0,1316	1,383	3,283
0,4	0,79	0,1621	-1,301	-1,631	-1,301	-3,531	0,10881	-0,1349	1,389	3,289
0,6	0,81	0,1548	-1,301	-1,611	-1,301	-3,511	0,11135	-0,1362	1,392	3,292
0,8	0,92	0,1202	-1,301	-1,501	-1,301	-3,401	0,12638	-0,1437	1,406	3,307
1	1,05	0,08912	-1,301	-1,371	-1,301	-3,271	0,14679	-0,1531	1,426	3,326
1,2	1,18	0,06606	-1,361	-1,301	-1,301	-3,141	0,15925	-0,1585	1,437	3,337
1,4	1,32	0,04786	-1,501	-1,301	-1,301	-3,001	0,15968	-0,1587	1,441	3,337
1,6	1,51	0,03090	-1,691	-1,301	-1,301	-2,811	0,16054	-0,1590	1,438	3,338
1,8	1,74	0,01819	-1,921	-1,301	-1,301	-2,581	0,16221	-0,1597	1,439	3,339
2	1,95	0,01122	-2,131	-1,301	-1,301	-2,371	0,16471	-0,1608	1,441	3,342
2,2	2,14	0,00724	-2,321	-1,301	-1,301	-2,181	0,16821	-0,1622	1,444	3,344
2,4	2,35	0,00446	-2,531	-1,301	-1,301	-1,971	0,17420	-0,1646	1,449	3,349
2,6	2,45	0,00354	-2,631	-1,301	-1,301	-1,871	0,17813	-0,1662	1,452	3,352
2,8	2,69	0,00204	-2,871	-1,301	-1,301	-1,631	0,19156	-0,1713	1,462	3,362
3	2,79	0,00162	-2,971	-1,301	-1,301	-1,531	0,19930	-0,1742	1,468	3,368
3,2	2,95	0,00110	-3,131	-1,301	-1,301	-1,371	0,21513	-0,1799	1,479	3,379
3,4	3,09	0,00081	-3,271	-1,301	-1,371	-1,301	0,22361	-0,1828	1,485	3,386
3,6	3,24	0,00057	-3,421	-1,301	-1,521	-1,301	0,22361	-0,1828	1,485	3,386
3,8	3,36	0,00043	-3,541	-1,301	-1,641	-1,301	0,22361	-0,1828	1,485	3,386
4	3,78	0,00016	-3,961	-1,301	-2,061	-1,301	0,22361	-0,1828	1,485	3,386
4,2	4,52	3,02E-05	-4,701	-1,301	-2,801	-1,301	0,22361	-0,1828	1,485	3,386
4,4	7,1	7,943E-08	-7,281	-1,301	-5,381	-1,301	0,22361	-0,1828	1,485	3,386
4,6	9,5	3,162E-10	-9,681	-1,301	-7,781	-1,301	0,22361	-0,1828	1,485	3,386

второго компонента HA_2 , а ряд 4 – изменению равновесной концентрации A_2^- (сопряженного хлоруксусной кислоте основания $ClCH_2COO^-$).

При сравнении рис. 2 и 3 можно констатировать, что в отличие от интегральной кривой логарифмическая диаграмма намного информативнее, так как имеется возможность оценить равновесные концентрации всех частиц, находящихся в рассматриваемой системе. Диагонали для расчета равновесных концентраций ионов H^+ и OH^- на графике отсутствуют (они имеются на рис. 1).

В таблице приведены данные потенциметрического титрования смеси HCl и $ClCH_2COOH$ с концентрациями по 0,05 М водным раствором KOH (в области нейтрализации кислот от 25 до 75%), равновесные концентрации всех частиц системы, ионная сила и коэффициенты активности кислот для оценок термодинамических констант диссоциации компонентов смеси с применением расчетных уравнений (10)–(17) для разных участков нейтрализации HA_1 и HA_2 .

Статистическая обработка величин показателей термодинамических констант диссоциации (столбцы 10 и 11) для 28 точек приводит к следующим результатам: $pK_{HA1} = 1,443$ и $pK_{HA2} = 3,344$.

Как видно из таблицы, равновесные концентрации (столбцы 4–7) значимы и поэтому влияют на величины ионной силы I (столбец 8), коэффициенты активности f ионов (столбец 9) и, как следствие, на показатели термодинамических констант диссоциации кислот HA_1 и HA_2 (столбцы 10 и 11).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как видно из рис. 2, кривая потенциометрического титрования смеси кислот разной силы характеризуется наличием одного скачка pH. Второй скачок отсутствует, так как кислоты характеризуются довольно близкими константами кислотности ($pK_{\text{HA}_1} = 1,00$ и $pK_{\text{HA}_2} = 3,00$ [13]). Известно [5, 10], что дифференциация электролитов возможна при отношении показателей констант диссоциации $K_{\text{HA}_1} / K_{\text{HA}_2} \geq 10^3$. Поэтому вода в данном случае является нивелирующим растворителем. Более объективные расчеты с учетом всех равновесных частиц в анализируемой системе несколько отличаются от известных в литературе (ср. $pK_{\text{HCl}} = 1,00$ и $1,443$; $pK_{\text{ClCH}_2\text{COOH}} = 3,00$ и $3,344$). Вот почему предпочтительно учитывать равновесные концентрации всех частиц в анализируемых растворах для получения термодинамических констант диссоциации компонентов анализируемой системы.

ВЫВОДЫ

1. Рассмотрены взаимодействия смеси электролитов в нивелирующем растворителе (вода) на основе законов: действующих масс, ионного произведения растворителя, электронейтральности, сохранения масс (материального баланса). Выведены модельные уравнения для оценки всех равновесных частиц в рассматриваемой

системе.

2. Применение выведенных модельных уравнений состояния ионов и молекул в растворах электролитов приводит к представлению диаграммы зависимости концентраций всех равновесных частиц от pH титруемого раствора в области от 25 до 75% нейтрализации смеси кислот сильным основанием (в буферных областях).

3. В отличие от интегральной кривой, соответствующей совместной нейтрализации обеих кислот, представление процесса в логарифмических координатах приводит к оценке более приемлемых и объективных величин равновесных концентраций всех частиц в титруемой системе, значительно облегчающих расчеты ионных сил, коэффициентов активности, и, как результат, к получению более точных, более обоснованных термодинамических констант диссоциации хлороводородной (не соляной) и хлоруксусной кислот в нивелирующем растворителе – вода.

4. Нейтрализация смеси компонентов, сопровождающаяся наличием одного совместного скачка на интегральной кривой (см. рис. 2), а также диаграмма «отрицательные логарифмы концентраций всех частиц – pH изучаемого раствора» (см. рис. 3) свидетельствуют, что разница в показателях термодинамических констант диссоциации обоих компонентов хлороводородной (на пересечении рядов 1 и 2) и хлоруксусной (пересечение рядов 3 и 4) кислот не достигает 3 (пример: $\Delta pK = pK_{\text{ClCH}_2\text{COOH}} - pK_{\text{HCl}} = 3,344 - 1,443 = 2,901$). Это есть признаки нивелирующего действия растворителя в отношении хлороводородной и хлоруксусной кислот.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Палит Ш.Р., Дас М.Н., Сомаяджулу Г.Р. Неводное титрование / пер. с англ.; под ред. А.П. Крешкова. М.: Госхимиздат. 1958. 192 с.
2. Харнед Г., Оуэн Б. Физическая химия растворов электролитов / пер. с англ. под ред. А.Ф. Капустинского. М.: Изд-во иностранной литературы, 1952. 628 с.
3. Мэлвин-Хьюз Э.Я. Физическая химия: в 2 кн.; пер. с англ. Е.Н. Еремина; под ред. Я.И. Герасимова. М.: Изд-во иностранной литературы. 1962. Кн. 2. 628 с.
4. Робинсон Р.А., Стокс Р.Г. Растворы электролитов / пер. с англ.; под ред. А.Н. Фрумкина. М.: Изд-во иностранной литературы, 1963. 646 с.
5. Крешков А.П., Быкова Л.Н., Казарян Н.А. Кислотно-основное титрование в неводных средах. М.: Химия. 1967. 192 с.
6. Ваддингтон Т. Неводные растворители / пер. с англ. М.: Химия. 1971. 376 с.
7. Денеш И. Титрование в неводных средах / пер. с англ. И.Ф. Долмановской, С.С. Чуранова; под ред. И.П. Белецкой. М.: Мир. 1971. 413 с.
8. Измайлов Н.А. Электрохимия растворов. 3-е изд., испр. М.: Химия. 1976. 488 с.
9. Александров В.В. Кислотность неводных растворов. Харьков: Вища школа. 1981. 152 с.
10. Крешков А.П. Аналитическая химия неводных растворов. М.: Химия. 1982. 256 с.
11. Полторацкий Г.М., Семенов С.В. Средние ионные коэффициенты активности и константа диссоциации HCl в системе HCl – H₂SO₄ – H₂O при 298 K // Журнал общей химии. 2002. Т. 72. N 10. С. 1599–1602.
12. Levanov A.V., Gurbanova U.D., Isaikina O.Y., Lunin V.V. Dissociation constants of hydrohalic acids hcl, hbr, and hi in aqueous solutions // Russian Journal of Physical Chemistry A. 2019. Vol. 93. Issue 1. P. 93–101. <https://doi.org/10.1134/S0036024419010187>
13. Отто М. Современные методы аналитической химии; в 2 т. пер. с нем. под ред. А.В. Гармаша. М.: Техносфера. Т. 1. 2003. 416 с.; т. 2. 2004. 288 с.
14. Roda G., Dallanoce C., Grazioso G., Liberti V., De Amici M. Determination of acid dissociation constants of compounds active at neuronal nicotinic

acetylcholine receptors by means of electrophoretic and potentiometric techniques // *Analytical Sciences*. 2010. Vol. 26. Issue 1. P. 51–54. <https://doi.org/10.2116/analsci.26.51>

15. Lysova S.S., Zevatskii Y.E., Demidov E.V., Novoselov N.P. Densimetric study of protolytic equilibria in aqueous electrolyte solutions // *Russian Journal of General Chemistry*. 2015. Vol. 85. Issue 4. P. 781–785. <https://doi.org/10.1134/S1070363215040015>

16. Rockwood A.L. Meaning and measurability of single-ion activities, the thermodynamic foundations of pH, and the Gibbs free energy for the transfer of ions between dissimilar materials // *Chem-PhysChem*. 2015. Vol. 16. Issue 9. P. 1978–1991. <https://doi.org/10.1002/cphc.201500044>

17. Lysova S.S., Skripnikova T.A., Zevatskii Yu.E. Algorithm for calculating the dissociation constants of weak electrolytes and ampholytes in water solutions // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2017. Vol. 91. Issue 12. P. 2366–2369. <https://doi.org/10.1134/S0036024418050229>

18. Levanov A.V., Isaikina O.Y., Lunin V.V. Dissociation constant of nitric acid // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2017. T. 91. N 7. P. 1221–1228. <https://doi.org/10.1134/S0036024417070196>

19. Meychik N.R., Stepanov S.I., Nikolaeva Yu.I.

Calculating the ionization constant of functional groups of carboxyl ion exchangers // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2018. Vol. 92. N 2. P. 265–270. <https://doi.org/10.1134/S0036024418010156>

20. Леванов А.В., Курбанова У.Д., Исайкина О.Я., Лунин В.В. Константы диссоциации галогенводородных кислот HCl, HBr и HI в водном растворе // *Журнал физической химии*. 2019. Т. 93. N 1. С. 86–94/

21. Танганов Б.Б. Исследование равновесий в неводных растворах поликислот (модель и эксперимент). II. Термодинамические константы диссоциации поликислот // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2011. N 6. С. 55–57.

22. Tanganov B.B. Modelling of ions mobility in plasmalike concept and transfer processes in electrolyte solutions // *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 2013. Vol. 7. Issue. 8. P. 711–724.

23. Tanganov B.B., Alekseeva I.A. A Method for calculating the acid-base equilibria in aqueous and nonaqueous electrolyte solutions // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2017. Vol. 91. Issue 6. P. 1149–1151. <https://doi.org/10.1134/S0036024417060243>

REFERENCE

1. Palit ShR, Das MN, Somayadzhulu GR. *Non-aqueous titration*. Moscow: Goskhimizdat; 1958. 192 p.

2. Harned HS, Owen BB. *The physical chemistry of electrolytic solutions*. 3rd ed., New York: Reinhold Pub.; 1939. (Russ. ed.: Harned G, Owen B. *Physical chemistry of electrolyte solutions*. Moscow: Izdatel'stvo inostrannoi literury; 1952. 628 p.

3. Melvin-H'yuz EYa. *Physical chemistry*. Moscow: Izdatel'stvo inostrannoi literury; 1962. Book 2. 628 p.

4. Robinson RA, Stokes RH. *Electrolyte solutions. The measurement and interpretation of conductance, chemical potential and diffusion in solutions of simple electrolytes*. 2nd ed. London, Butterworths Scientific Publication; 1959. (Russ. ed.: Robinson R, Stokes R. *Rastvory elektrolitov*. Moscow: Izdatel'stvo inostrannoi literury; 1963. 646 p.)

5. Kreshkov AP, Bykova LN, Kazaryan NA. *Acid-base titration in non-aqueous media*. Moscow: Khimiya; 1967. 192 p. (In Russian)

6. Vaddington T. *Non-aqueous solvents*. Moscow: Khimiya; 1971. 376 p. (In Russian)

7. Denesh I. *Titration in non-aqueous media*. Moscow: Mir; 1971. 413 p. (In Russian)

8. Izmailov NA. *Electrochemistry of solutions*. Moscow: Khimiya; 1976. 488 p. (In Russian)

9. Aleksandrov VV. *Acidity of non-aqueous solutions*. Khar'kov: Vishcha shkola; 1981; 152 p. (In Russian)

10. Kreshkov AP. *Analytical chemistry of non-*

aqueous solutions. Moscow: Khimiya; 1982. 256 p. (In Russian)

11. Poltoratskii GM, Semenov SV. Average ionic activity coefficients and dissociation constant of HCl in the HCl – H₂SO₄ – H₂O system at 298 K. *Zhurnal obshchei khimii = Russian Journal of General Chemistry*. 2002;72(10):1599–1602. (In Russian)

12. Levanov AV, Gurbanova UD, Isaikina OY, Lunin VV. Dissociation constants of hydrohalic acids hcl, hbr, and hi in aqueous solutions. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2019;93(1):93–101. <https://doi.org/10.1134/S0036024419010187>

13. Otto M. *Analytische Chemie*. WILEY-VSH Verlag GmbH, 2000 (Russ. Ed.: Otto M. *Sovremennye metody analiticheskoi khimii*. Moscow: Tekhnosfera, Vol. 2, 2003; Vol. 3, 2004).

14. Roda G, Dallanoce C, Grazioso G, Liberti V, De Amici M. Determination of acid dissociation constants of compounds active at neuronal nicotinic acetylcholine receptors by means of electrophoretic and potentiometric techniques. *Analytical Sciences*. 2010;26(1):51–54. <https://doi.org/10.2116/analsci.26.51>

15. Lysova SS, Zevatskii YE, Demidov EV, Novoselov NP. Densimetric study of protolytic equilibria in aqueous electrolyte solutions. *Russian Journal of General Chemistry*. 2015;85(4):781–785. <https://doi.org/10.1134/S1070363215040015>

16. Rockwood AL. Meaning and measurability of single-ion activities, the thermodynamic foundations of pH, and the Gibbs free energy for the transfer of

Ions between dissimilar materials. *ChemPhysChem*. 2015;16(9):1978–1991. <https://doi.org/10.1002/cp.201500044>

17. Lysova SS, Skripnikova TA, Zevatskii YuE. Algorithm for calculating the dissociation constants of weak electrolytes and ampholites in water solutions. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2017;91(12):2366–2369. <https://doi.org/10.1134/S0036024418050229>

18. Levanov AV, Isaikina OY, Lunin VV. Dissociation constant of nitric acid. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2017;91(7):1221–1228. <https://doi.org/10.1134/S0036024417070196>

19. Meychik NR, Stepanov SI, Nikolaeva Yul. Calculating the Ionization constant of functional groups of carboxyl ion exchangers. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2018;92(2):265–270. <https://doi.org/10.1134/S0036024418010156>

20. Levanov AV, Kurbanova UD, Isaikina OYa, Lunin VV. Dissociation constants of hydrohalic

acids HCl, HBr and HI in aqueous solutions. *Zhurnal fizicheskoi khimii = Journal of Physical Chemistry*. 2019;93(1):86–94. (In Russian) <https://doi.org/10.1134/S0044453719010187>

21. Tanganov BB. Investigation of equilibria in non-aqueous solutions of polyacids (model and experiment). II. Thermodynamic dissociation constants of polyacids. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy = International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2011;6:55–57. (In Russian)

22. Tanganov BB. Modelling of ions mobility in plasmalike concept and transfer processes in electrolyte solutions. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 2013;7(8):711–724.

23. Tanganov BB, Alekseeva IA. A Method for calculating the acid-base equilibria in aqueous and nonaqueous electrolyte solutions. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2017;91(6):1149–1151. <https://doi.org/10.1134/S0036024417060243>

Критерии авторства

Танганов Б.Б. выполнил экспериментальную работу, на основании полученных результатов провел обобщение и написал рукопись, имеет на статью полное авторское право и несет ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Автор прочел и одобрил окончательный вариант рукописи.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ

Танганов Борис Бадмаевич,
д.х.н., профессор,
ведущий научный сотрудник отдела
организации научных исследований,
Восточно-Сибирский государственный
университет технологий и управления,
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40а,
Российская Федерация,
✉ e-mail: tanganov@rambler.ru

Contribution

Boris B. Tanganov carried out the experimental work, on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. Boris B. Tanganov has exclusive author's rights and bear responsibility for plagiarism.

Conflict interests

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

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

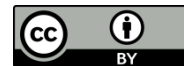
INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Boris B. Tanganov,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Leading Researcher;
East Siberian State University of Technology
and Management,
40a, Kluchevskaya St., Ulan-Ude, 670013,
Russian Federation,
✉ e-mail: tanganov@rambler.ru

Оригинальная статья / Original article

УДК 632.937:635.63

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-401-411>



Испытание влияния новых биопестицидов на возбудителей болезней овощей с применением ДНК-маркеров

© Н.Е. Павловская, И.Н. Гагарина, А.Ю. Гаврилова, Д.Б. Бородин

Орловский государственный аграрный университет им. Н.В. Парахина,
г. Орел, Российская Федерация

Резюме: В условиях защищенного грунта овощи подвергаются воздействию различных вредителей и возбудителей вирусных, бактериальных или грибковых болезней. Выращивание овощей в закрытом грунте требует исключения всех химических средств обработки и контроля над возбудителями болезней и вредителями. В связи с этим применение более чувствительных методов в диагностике патогенов является актуальным и востребованным. Неоценимую роль при этом играют молекулярные маркеры. В настоящей работе для идентификации наиболее распространенных заболеваний томата (*Xanthomonas euvesicatoria*), огурца (*Ascochyta cucumis*) и картофеля (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) использована полимеразная цепная реакция. Установлено, что ранняя диагностика заболеваний овощных культур методами, основанными на полимеразной цепной реакции, позволяет обнаруживать следовые количества патогенных микроорганизмов в максимально сжатые сроки и отбирать для борьбы с ними эффективные препараты, обладающие фунгицидным действием. Создание биологических средств защиты овощных культур особенно актуально в связи с их значимостью в питании как источников витаминов и минеральных веществ. Нами были испытаны новые биологические средства защиты овощных культур в условиях закрытого грунта. В ходе исследований фунгицидное действие на возбудителя болезни томатов – черную бактериальную пятнистость (*Xanthomonas euvesicatoria*), и возбудителя аскохитоза огурца (*Ascochyta cucumis*) проявил запатентованный нами препарат для предпосевной обработки семян овощных культур в условиях защищенного грунта. Также фунгицидное действие на развитие *Phytophthora* на картофеле проявил препарат, запатентованный как средство предпосевной обработки семян гороха. Отмечено, что действие этих препаратов эффективно при замачивании семян и двойной обработке растений в период цветения растворами с концентрацией $10^{-4}\%$.

Ключевые слова: биопестициды, картофель, томат, огурец, бактериальные болезни

Информация о статье: Дата поступления 29 января 2019 г.; дата принятия к печати 31 августа 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2020 г.

Для цитирования: Павловская Н.Е., Гагарина И.Н., Гаврилова А.Ю., Бородин Д.Б. Испытание влияния новых биопестицидов на возбудителей болезней овощей с применением ДНК-маркеров. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 3. С. 401–411. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-401-411>

Testing the effect of new biopesticides on soilborne pathogens of vegetable diseases using DNA markers

Ninel E. Pavlovskaya, Irina N. Gagarina,
Anna Yu. Gavrilova, Dmitry B. Borodin

Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhin, Orel, Russian Federation

Abstract: In protected ground, vegetables are exposed to various pests and pathogens of viral, bacterial or fungal diseases. Growing vegetables indoors requires the elimination of all chemical treatments and control over pathogens and pests. In this regard, the application of sensitive methods based on molecular markers in the diagnostics of pathogens is highly relevant. In this work, polymerase chain reaction was used to identify the most common diseases of tomato (*Xanthomonas euvesicatoria*), cucumber (*Ascochyta cucumis*) and potato (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*) plants. It was established that early diagnosis of

vegetable diseases using polymerase chain reaction allows rapid detection of trace amounts of pathogenic microorganisms thus facilitating selection of effective fungicidal preparations. The creation of biological protection for vegetable crops is relevant considering their nutritional importance. New biological methods for protecting vegetables in greenhouses were tested. Thus, the fungicidal effect of the authors' patented preparation developed for pre-sowing treatment of vegetable seeds in protected ground on the pathogens of tomato black bacterial spot (*Xanthomonas euvesicatoria*) and cucumber stem hypertrophy (*Ascochyta cucumis*) was confirmed. Another preparation patented as a means of pre-sowing treatment of pea seeds demonstrated fungicidal action against the development of *Phytophthora infectans* on potato plants. It was observed that these preparations are effective at concentrations of $10^{-4}\%$ for soaking seeds and double treatment of plants during the flowering period.

Keywords: biopesticides, potatoes, tomato, cucumber, bacterial diseases

Information about the article: Received January 29, 2019; accepted for publication August 31, 2020; available online September 30, 2020.

For citation: Pavlovskaya NE, Gagarina IN, GavriloVA AYU, Borodin DB. Testing the effect of new biopesticides on soilborne pathogens of vegetable diseases using DNA markers. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):401–411. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-401-411>

ВВЕДЕНИЕ

Овощи занимают важнейшее место в рационе питания человека, так как являются источником витаминов, углеводов, органических кислот, микроэлементов, необходимых для полноценной жизнедеятельности человека. Так, для удовлетворения спроса в овощах жителей нашей страны необходимо производить 20477,8 тыс. т в год. Однако в рационе жителей России доля овощей ниже, чем большинства развитых стран. В среднем обеспеченность населения нашей страны овощами составляет 41,5%, что в 4 раза ниже нормы. Например, объема производимого в стране картофеля (28–32 млн т в год) явно недостаточно. Импортные овощи, выращенные в закрытом грунте, в структуре потребления жителей страны занимают 70%, ежегодно недостаток компенсируется импортом из таких стран, как Турция, Израиль, Нидерланды и Китай [1].

Объявленные России санкции стали толчком для развития собственного сельского хозяйства [2]. Повышаются объемы производства, сокращается импорт продовольствия, открываются новые предприятия, растет привлекательность многих отраслей, в том числе растениеводство в защищенном грунте. По данным Союза производителей овощей, прирост тепличных площадей в 2018 г. составил 154 га.

Вместе с тем в условиях защищенного грунта овощи подвергаются воздействию различных вредителей и возбудителей вирусных, бактериальных и грибковых болезней. Болезней тепличных культур существует множество: это корневые и стеблевые гнили, ржавчины, мучнистые росы ложные и настоящие, различного рода пятнистости, увядания, токсикозы, вирозы, фитоплазмозы. Каждую из болезней перечисленных групп могут вызывать генетически различные формы патогенов, и для воздействия практически на каждую из них нужен отдельный эффективный препарат строго определенной химиче-

ской природы, способный подавлять развитие возбудителей заболеваний, оказывать лечебное влияние на растения [3].

По данным ООН и других международных организаций, ежегодные потери урожая овощей всех сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей составляют около 35% валовых сборов урожая. Инфекции сельскохозяйственных культур также влияют на доходность продукции за счет снижения качества [4, 5].

Существует ряд методов по выявлению возбудителей болезней. В полевых условиях предварительный диагноз болезней, вызываемых фитопатогенными грибами, ставят по проявлению симптомов заболевания, а точную идентификацию возбудителя проводят в лаборатории главным образом по морфологии спор и другим морфолого-культуральным признакам патогена с применением методов микроскопии и культивирования на питательных средах. Однако морфологические характеристики спор у близкородственных видов микромицетов могут совпадать, а внутри одного вида значительно варьировать. Кроме того, симптомы болезни могут проявляться нетипично или заболевание может проходить в скрытой форме [6, 7].

В связи с этим применение более чувствительных методов является актуальным и востребованным в диагностике фитопатогенов. Неоценимую роль при этом играют молекулярные маркеры. С их помощью составлены подробные молекулярные карты генома человека и десятков видов растений и животных, на которые нанесены важнейшие гены, определяющие рост и развитие организмов, морфологические признаки, устойчивость к заболеваниям и другие свойства. Использование молекулярных маркеров позволяет значительно ускорять процесс селекции [7]. В настоящее время насчитывается несколько десятков типов молекулярных маркеров. Наиболее широко используемые ДНК-маркеры моно-

локусные: CAPS, SCAR, SNP; мультилокусные: SSAP, IRAP, DaT. Их разделяют на три группы согласно основному методу анализа: маркеры, исследуемые с помощью блот-гибридизации, ПЦР и ДНК-чипов [8]. С помощью молекулярных маркеров можно: ускорять процесс селекции; сокращать площади, занятые селекционным материалом; достигать более высокой точности отбора; добиваться экономии трудовых и материальных ресурсов.

Системы молекулярного маркирования хозяйственно ценных признаков разрабатываются с 90-х гг. прошлого века и применяются в овощеводстве на томатах, перце, баклажанах, луке и других культурах.

Ранняя диагностика заболеваний, например, методами, основанными на полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяет обнаруживать следовые количества патогенных микроорганизмов в максимально сжатые сроки [9], выбрать и своевременно применить меры защиты, что снижает экономические риски сельского хозяйства, связанные с заболеваниями растений. Данные методы превосходят традиционные по специфичности, чувствительности, скорости проведения анализа, производительности и служат их существенным дополнением. Кроме того, их применение не требует глубоких знаний биологии и морфологии исследуемых микроорганизмов. Однако, несмотря на широкое применение в качестве инструмента исследования, использование технологий на основе ПЦР в сельском хозяйстве на практике по-прежнему ограничено [10].

В нашей стране наиболее востребованными овощами является картофель, а основными культурами защищенного грунта – огурец и томат, поэтому требуется тщательное изучение причин возникновения наиболее распространенных заболеваний и разработки методов борьбы с ними.

Среди заболеваний огурца отмечены бактериальная прикорневая гниль (бактерии *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*), аскохитоз (гриб *Ascochyta cucumeris*), мучнистая роса (Гриб *Erysiphe cichoracearum*), вирусные заболевания (ВОМ, ВЗКМО).

Томаты наиболее часто поражаются фузариозами (виды грибов *Fusarium*), серой гнилью (гриб *Botrytis cinerea*), мучнистой росой и фитофторозом. Мозаика томатов вызывается вирусом табачной мозаики – *Nicotiana virus (Virothrix ivanovskii, Tobacco virus 1)*. Стрик вызывается одним вирусом либо комплексом двух, а иногда трех вирусов: табачной мозаики, реже – огуречной мозаики или чаще в сочетании с X-вирусом картофеля [11].

Среди болезней картофеля особенно распространены являются: фитофтороз (*Phytophthora infestans*), ризоктониоз (*Rhizoctonia sola-*

ni), черная ножка (бактерии *Pectobacterium*), парша обыкновенная (*Streptomyces scabies*): макроспориоз (*Macrosporium solani Ell. Et Mart.*), кольцевая гниль (*Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*), а также вирусные болезни, вызываемые вирусами «М и L вирусы картофеля – РВ», «S и A вирусы картофеля – РВ», «X и Y вирусы картофеля – РВ» [12].

В связи с ограничением применения химических препаратов на овощных культурах в период вегетации основное внимание в борьбе с вредителями уделяют качественному и своевременному проведению профилактических мероприятий, а также методам биологической борьбы и внедрению устойчивых сортов [13].

Сегодня в сельском хозяйстве развитых стран наблюдается тенденция к переходу на органические технологии земледелия и растениеводства, подразумевающие выращивание сельскохозяйственных культур без применения агрохимикатов. Однако по применению биологических средств защиты растений и биоудобрений Россия отстает от развитых стран мира в 30 раз. Эта ситуация существенно ограничивает конкурентоспособность российского агросектора и снижает экспортный потенциал российской сельхозпродукции.

Создание биологических средств защиты овощных культур особенно актуально ввиду их значимости в питании как источников витаминов и минеральных веществ. Выращивание овощей в закрытом грунте требует исключения всех химических средств обработки и контроля над возбудителями болезней и вредителями. Однако пока против главных болезней огурца и томата разрешенных эффективных средств защиты практически нет [14].

Рынок биопестицидов в России оценивается в 5 раз ниже, чем в Европейском Союзе (около 60 млн долл.) и в 10 раз – чем в США (около 120 млн долл.). На сегодняшний день объем применения биологических средств защиты растений в России составляет всего 1–2% [11].

Из наиболее распространенных заболеваний картофеля одним из самых опасных считается кольцевая гниль, вызываемая бактерией *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*. Болезнь распространена в странах Северной Европы и Канады. Можно ожидать, что в связи с глобальным потеплением ареал распространения этого карантинного объекта будет расширяться [15]. Заболеванию способствуют повышенная температура воздуха и высокая влажность почвы. Кольцевая гниль крайне вредоносна. Сильно пораженные клубни обычно гниют, не давая всходов, слабо пораженные растения в результате их общего угнетения образуют значительно меньше клубней. Потери урожая от кольцевой гнили в отдельные годы могут достигать 45%. Болезнь проявляется в стеблевой и клубневой

формах. Меры борьбы включают оптимальную агротехнику, соблюдение севооборота, подбор относительно устойчивых сортов, тщательное уничтожение растительных остатков, обработку семян пестицидами перед посевной, обработку растений пестицидами в течение вегетационного периода.

Аскохитоз (*Ascochyta cucumis*) развивается у растений огурца, выращиваемого в тепличных условиях. Поражаются листья, стебли, реже плоды. На листьях – крупные желтовато-бурые пятна, которые сильно разрастаются, светлеют, подсыхают. Пораженная ткань имеет разрывы и может покрываться черными точечными пикнидами. Сильно пораженные листья засыхают. Аскохитоз сильнее проявляется в период массового плодоношения. Благоприятствуют развитию болезни высокая влажность и ослабленное состояние растений (недостаток питания, резкие колебания температуры, плохая агротехника и обильное плодоношение) [16].

При поражении черной бактериальной пятнистостью (*Xanthomonas euvesicatoria*) растения томата хуже развиваются и приобретают угнетенный вид. Заболевание может проявляться на растении в течение всей его жизни в виде мелких водянистых точечных пятен на семядолях, листьях, черешках, стеблях и плодах. Со временем пятна чернеют, листья желтеют, сеянцы могут погибнуть.

Целью данной работы являлось испытание влияния вновь созданных биологических средств защиты овощных культур от некоторых возбудителей заболеваний томата (*Xanthomonas euvesicatoria*), огурца (*Ascochyta cucumis*) и картофеля (*Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для исследования были взяты огурец сорта Герман F1, томат сорта Санька, картофель сорта Голубизна. На томатах и огурце испытывался новый биологический препарат, защищенный патентом РФ № 2626174 [17], индуцирующий болезнеустойчивость растений овощных культур за счет компонентов сигнальной системы устойчивости на основе метаболитов гриба *Trichoderma* (далее – препарат 1), а на картофеле – препарат, защищенный патентом РФ № 2463759 [18], усиливающий иммунитет растений на основе биофлавоноидов гречихи (далее – препарат 2). Идентификацию возбудителей болезней (кольцевой гнили картофеля (*Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*), черной бактериальной пятнистости томатов (*Xanthomonas euvesicatoria*), аскохитозы огурца (*Ascochyta cucumis*; *Phoma cucurbitacearum*; *Didymella bryoniae*)) проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в прописи «Биоком».

Перед посевом на 2 ч замачивали: семена

томатов и огурцов – в растворе препарата 1, картофель, предназначенный для посадки, – в растворе препарата 2. Растворы препаратов 1 и 2 имели концентрацию 10⁻⁴%. В период цветения растений проводили их двукратное опрыскивание этими же растворами. Также дважды опрыскивали растения, посеянные без предварительного замачивания семян в растворах применяемых препаратов. Контролем служили ничем не обработанные растения и растения, обработанные промышленным препаратом Фитоспорин М (препарат микробиологического происхождения, созданный на основе живых бактерий *Bacillus Subtilis* (клетки сенной палочки, штамм 26D), имеющий широкий спектр действия).

Для выделения ДНК из объектов использовали комплект реагентов «Проба-ГС» (ООО «АгроДиагностика» (Москва, Россия), предназначенный для работы с культурами бактерий, смывами с твердых питательных сред, цистами, а также материалом, в котором присутствует значительное количество ингибирующих примесей.

Метод применения комплекта «Проба-ГС» основан на использовании лизиса клеток сильного хаотропного агента – гуанидина тиоционата (GuSCN), и последующей сорбции ДНК на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля, стеклянное «молоко» и т.д.).

Протокол проведения анализа. При выделении ДНК из мицелия гриба или растительной ткани достаточно в 50 мкл лизирующего буфера набора «Проба-ГС» гомогенизировать 25–50 мг ткани исследуемого растения. Для выявления и диагностики бактериальных и грибковых заболеваний овощных культур были использованы:

1) комплект реагентов производства ООО «АгроДиагностика» для ПЦР-амплификации ДНК *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* – кольцевой гнили картофеля. Для проведения амплификации ДНК возбудителя использовали праймеры с нуклеотидной последовательностью PSA-F (5'-ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa-3') и PSA-R (5'-tac tga gat gtt tca ctt ccc c-3');

2) комплект реагентов производства ООО «АгроДиагностика» для ПЦР-амплификации ДНК *Xanthomonas euvesicatoria* – черной бактериальной пятнистости томата. Для идентификации возбудителя использовали праймеры SSU-642-F (5'-gtcrtccydccttcctc-3') и SSU-1445-R (5'-haathygtgcca-gcagc-3');

3) комплект реагентов производства ООО «АгроДиагностика» для ПЦР-амплификации ДНК грибов *Ascochyta*, *Didymella*, *Phoma*. Для проведения амплификации ДНК возбудителя аскохитоза огурца использовали праймеры с нуклеотидной последовательностью didy70 – (5' ctttgctgccatctctacc – 3') и didy300 – (5' gcgttcaagattcgatgattca- 3').

Результаты анализировали методом горизонтального гель-электрофореза.

Для анализа с растений брали пробы в различные фазы: цветения, плодоношения и технической спелости.

Идентификация возбудителей болезней проводилась на разных стадиях развития растений: на листьях в фазу цветения и плодоношения, на клубнях картофеля, плодах томатов и огурца – в фазу технической спелости.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе изучения влияния новых биопестицидов на возбудителей болезней овощных культур на клубнях картофеля в контрольном варианте были выявлены признаки заболевания фитотрофом. Клубни, обработанные Фитоспорином М и препаратом 2, были свободны от *Phytophthora* (рис. 1).

Наименьшая распространенность болезни и ее развитие отмечались на варианте с применением биологического пестицида Нигор. При обработке Фитоспорином М распространенность и развитие болезни были выше, что составляло 7,6–4,3% по сравнению с контролем.

По результатам ПЦР на наличие возбудителя кольцевой гнили картофеля в разные фазы развития растения с детекцией в формате электрофореза показано, что полученные фрагменты ДНК размером 502 п.о. в контрольном образце принадлежат бактерии *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*, которая является анаморфой возбудителя кольцевой гнили. В исследуемых образцах наличие возбудителей не детектируется (рис. 2).

На листьях огурцов во время цветения визуально развитие аскохитоза не отмечалось, первые признаки заболевания были выявлены в фазе начала плодоношения (рис. 3).

В фазу плодоношения на листьях контрольных вариантов отмечалось повсеместное развитие аскохитоза (рис. 3, 1), в вариантах с применением Фитоспорина М (рис. 3, 2) и препарата 1 явных признаков заболевания не отмечено.

На рис. 4 представлены результаты ПЦР на аскохитоз огурца в различных фазах развития с детекцией в формате электрофореза. Показано, что полученные фрагменты ДНК размером 300 п.о. в контрольном образце принадлежат грибам *Didymella bryoniae* и *Phoma* sp., которые являются анаморфой возбудителя аскохитоза. В исследуемых образцах детектируется наличие возбудителей аскохитоза в фазах цветения и плодоношения в вариантах без обработки.

Методом ДНК-технологии установлено, что заболевание проявилось на листьях контрольного варианта уже в стадии цветения (рис. 4.1), а также в фазе плодоношения (рис. 4, 5), но в плодах технической спелости маркер не выявлен (рис. 4, 9). В вариантах с обработкой Фитоспорином М и биологическим препаратом признаки поражения аскохитозом не обнаружены (рис. 4, 2–4; 6–12).

Результаты исследования показали, что обработка биологическим пестицидом снижает развитие бурой гнили на томате Санька (рис. 5). В фазу цветения заболевание не было отмечено ни на одном варианте. Заболевание начало развиваться в период плодоношения и было отмечено в контрольном варианте и в варианте с обработкой биологическим пестицидом при опрыскивании. Во время технической спелости томатов максимальное развитие заболевания было отмечено в контрольном варианте – 10,2%, минимальное развитие заболевания – в варианте с применением биологического пестицида – 2,1%. Обработка биопрепаратом Фитоспорин М также показала хорошее действие, развитие заболевания составило 2,9%.

По результатам проведения ПЦР на выявление черной бактериальной пятнистости в различных фазах развития томата с детекцией в формате электрофореза в контрольном образце выявлены фрагменты ДНК размером 614 п.о., принадлежащие грибам *Xanthomonas euvesicatoria*, которые являются возбудителем названного заболевания. В исследуемых образцах детектируется наличие возбудителей в фазах цветения и плодоношения в образцах без обработки.

Молекулярный метод диагностики выявил скрытую инфекцию уже на стадии цветения в контрольном варианте (рис. 6: 1, 5). Ни в варианте с Фитоспорином М (рис. 6: 2, 6, 10), ни в варианте с обработкой биологическим препаратом (рис. 6: 4, 7, 8, 11, 12) маркер возбудителя бактериальной пятнистости не обнаружен. Следует отметить, что в контрольном варианте в стадии технической спелости плода возбудитель также не выявлен.

В результате проведенных исследований таких овощных культур, как томаты, огурцы и картофель в разные фазы развития растений бактериальные или грибковые заболевания были выявлены только в контрольных образцах, не подвергавшихся обработке препаратами.

Таким образом, можно сделать заключение, что фитопатогенная инфекция на овощных культурах, в частности, на картофеле, проявляется в основном в стадии цветения, что связано, очевидно, с пиком максимального заражения вирусной инфекцией, источником которой являются многие агрономические факторы (сорняки, микроранения и др.).

Фитопатогенная инфекция размножается в образцах, не обработанных биологическими препаратами, в составе которых содержатся биологически активные соединения микробного и растительного происхождения.

В дальнейших исследованиях проводили подбор растительного и микробного компонента для довизуальной диагностики наличия вирусной, бактериальной или грибковой инфекции в овощах, а также компонента, снижающего фито-

патогенную нагрузку, в питательных средах для частности, картофеля.
микрклонального размножения растений, в

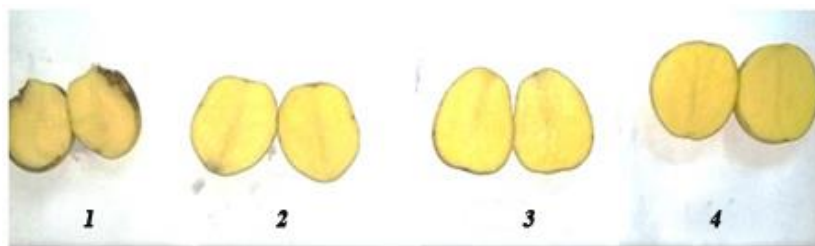


Рис. 1. Влияние биологических препаратов на развитие фитофтороза у клубней картофеля сорта Голубизна: 1 – контроль; 2 – Фитоспорин М; 3 – препарат 2 (обработка семян + опрыскивание); 4 – препарат 2 (опрыскивание)

Fig. 1. Influence of a biological drug on the development of Phytophthora in potato tuber:
1 – control; 2 – Fitosporin M; 3 – Preparation 2 (seed treatment + spraying); 4 – Preparation 2 (spraying)

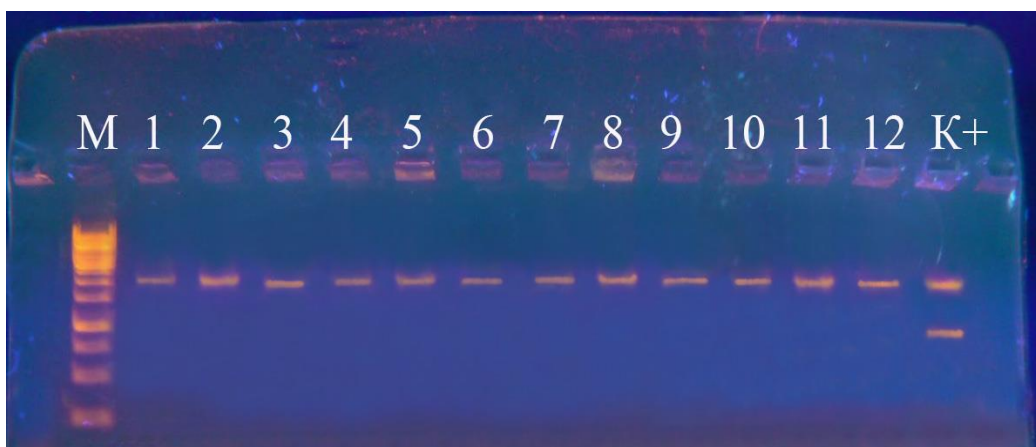


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации на наличие возбудителя болезни в растениях картофеля сорта Голубизна на различных стадиях развития:
1 – фаза цветения, контроль без обработки;
2 – фаза цветения, контроль обработан биопрепаратом Фитоспорин М;
3 – фаза цветения, обработан биологическим пестицидом (обработка семян и двукратное опрыскивание);
4 – фаза цветения, обработан биологическим пестицидом (двукратное опрыскивание);
5 – фаза плодоношения, контроль без обработки;
6 – фаза плодоношения, контроль обработан биопрепаратом Фитоспорин М;
7 – фаза плодоношения, обработан биологическим пестицидом (обработка семян и двукратное опрыскивание);
8 – фаза плодоношения, обработан биологическим пестицидом (двукратное опрыскивание);
9 – плоды, техническая спелость, контроль без обработки;
10 – плоды, техническая спелость, контроль обработан биопрепаратом Фитоспорин М;
11 – плоды, техническая спелость, обработан биологическим пестицидом (обработка семян и двукратное опрыскивание);
12 – плоды, техническая спелость, обработан биологическим пестицидом (двукратное опрыскивание);
K+ – контроль с присутствием возбудителя

Fig. 2. Electrophoregram of amplification products for the presence of the pathogen ring rot in plants of the variety "Blue" at different stages of development:

- 1 – Leaves. Flowering phase, control without treatment;
- 2 – Flowering phase, control treated with the biological product "Fitosporin M";
- 3 – Flowering phase, treated with a biological pesticide (seed treatment and 2-fold spraying);
- 4 – Flowering phase, treated with a biological pesticide (2-fold spraying);
- 5 – Fruiting phase, control without treatment;
- 6 – Fruiting phase, control treated with the biological product "Fitosporin M";
- 7 – Fruiting phase, treated with biological pesticide (seed treatment and 2-fold spraying);
- 8 – Leaves. Fruiting phase, treated with a biological pesticide (2-fold spraying);
- 9 – Root crop., technical ripeness, control without processing;
- 10 – technical ripeness, control treated with the biological product "Fitosporin M";
- 11 – technical ripeness, treated with a biological pesticide (seed treatment and 2-fold spraying);
- 12 – technical ripeness, treated with a biological pesticide (2-fold spraying);
- K+ – control with the presence of the pathogen



Рис. 3. Влияние биологического препарата на развитие аскохитоза у огурца сорта Герман F1:
 1 – контроль; 2 – Фитоспорин М; 3 – препарат 1 (обработка семян + опрыскивание); 4 – препарат 1 (опрыскивание)

Fig. 3. Influence of a biological drug on the development of Ascochyta *Ascochyta cucumis* cucumber German F1:
 1 – control; 2 – Fitosporin M; 3 – Preparation 1 (seed treatment + spraying); 4 – Preparation 1 (spraying)

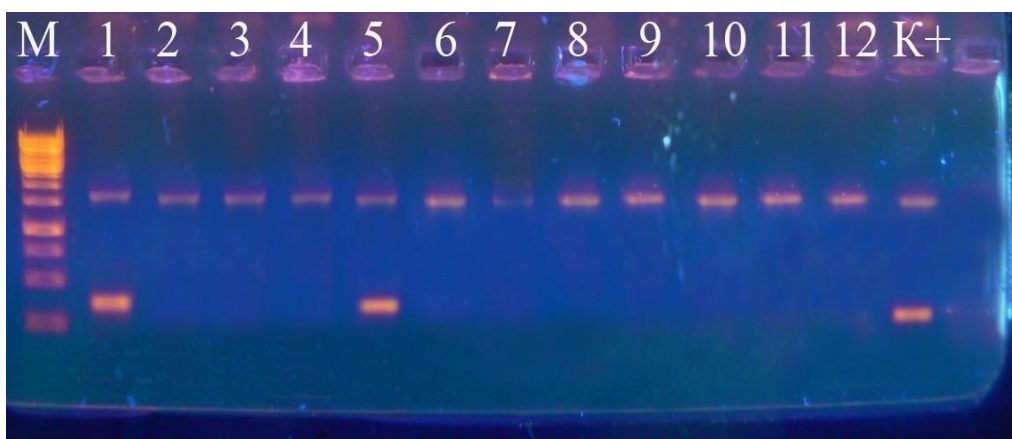


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации на наличие возбудителя болезни в огурцах сорта Герман F 1 на различных стадиях развития растения:
 1 – фаза цветения, контроль без обработки;
 2 – фаза цветения, контроль обработан биопрепаратом Фитоспорин М;
 3 – фаза цветения, обработан биологическим пестицидом (обработка семян и двукратное опрыскивание);
 4 – фаза цветения, обработан биологическим пестицидом (двукратное опрыскивание);
 5 – фаза плодоношения, контроль без обработки;
 6 – фаза плодоношения, контроль обработан биопрепаратом Фитоспорин М;
 7 – фаза плодоношения, обработан биологическим пестицидом (обработка семян и двукратное опрыскивание);
 8 – фаза плодоношения, обработан биологическим пестицидом (двукратное опрыскивание);
 9 – плоды, техническая спелость, контроль без обработки;
 10 – плоды, техническая спелость, контроль обработан биопрепаратом Фитоспорин М;
 11 – плоды, техническая спелость, контроль обработан биологическим пестицидом (обработка семян и двукратное опрыскивание);
 12 – плоды, техническая спелость, обработан биологическим пестицидом (двукратное опрыскивание);
 K+ – контроль с присутствием возбудителя

Fig. 4. Electrophoregram of amplification products for the presence of the pathogen in plants of the cucumber variety "German F 1" at different stages of development:
 1 – Leaves. Flowering phase, control without treatment;
 2 – Flowering phase, control treated with the biological product "Fitosporin M";
 3 – Flowering phase, treated with a biological pesticide (seed treatment and 2-fold spraying);
 4 – Flowering phase, treated with a biological pesticide (2-fold spraying);
 5 – Fruiting phase, control without treatment;
 6 – Fruiting phase, control treated with the biological product "Fitosporin M";
 7 – Fruiting phase, treated with biological pesticide (seed treatment and 2-fold spraying);
 8 – Leaves. Fruiting phase, treated with a biological pesticide (2-fold spraying);
 9 – Root crop., technical ripeness, control without treatment;
 10 – technical ripeness, control treated with the biological product "Fitosporin M";
 11 – technical ripeness, treated with a biological pesticide (seed treatment and 2-fold spraying);
 12 – technical ripeness, treated with a biological pesticide (2-fold spraying);
 K+ – control with the presence of the pathogen

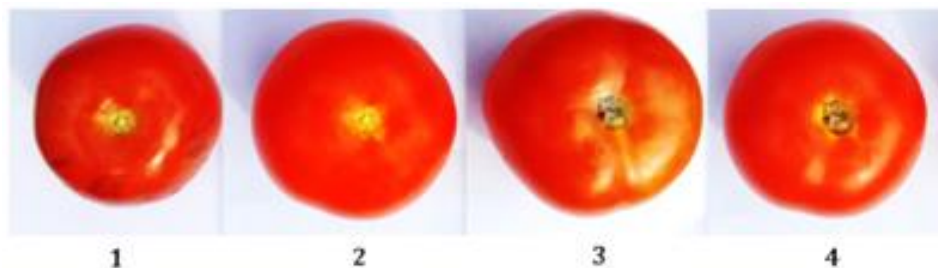


Рис. 5. Влияние биологического препарата на развитие бактериальной пятнистости на томате сорта Санька: 1 – контроль; 2 – Фитоспорин М; 3 – препарат 1 (обработка + опрыскивание); 4 – препарат 1 (опрыскивание)

Fig. 5. Influence of a biological drug on the development of bacterial blotch on tomato variety "Sanka": 1 – control; 2 – Fitosporin M; 3 – Preparation 1 (treatment + spraying); 4 – Preparation 1 (spraying)

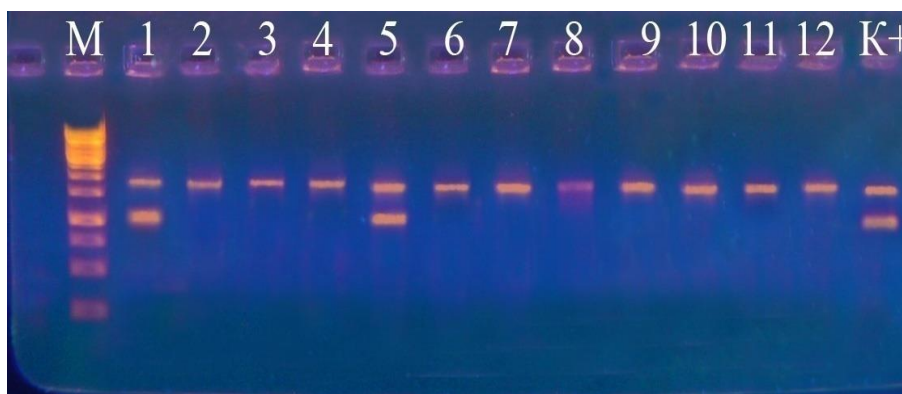


Рис. 6. Электрофореграмма продуктов амплификации на наличие возбудителя черной бактериальной пятнистости в томатах сорта Санька на различных стадиях развития растения:

- 1 – фаза цветения, контроль без обработки;
- 2 – фаза цветения, контроль обработан биопрепаратом Фитоспорин М;
- 3 – фаза цветения, обработан биологическим пестицидом (обработка семян и двукратное опрыскивание);
- 4 – фаза цветения, обработан биологическим пестицидом (двукратное опрыскивание);
- 5 – фаза плодоношения, контроль без обработки;
- 6 – фаза плодоношения, контроль обработан биопрепаратом Фитоспорин М;
- 7 – фаза плодоношения, обработан биологическим пестицидом (обработка семян и двукратное опрыскивание);
- 8 – фаза плодоношения, обработан биологическим пестицидом (двукратное опрыскивание);
- 9 – плоды, техническая спелость, контроль без обработки;
- 10 – плоды, техническая спелость, контроль обработан биопрепаратом Фитоспорин М;
- 11 – плоды, техническая спелость, контроль обработан биологическим пестицидом (обработка семян и двукратное опрыскивание);
- 12 – плоды, техническая спелость, обработан биологическим пестицидом (двукратное опрыскивание);
- K+ – контроль с присутствием возбудителя

Fig. 6. Electrophoregram of amplification products for the presence of the pathogen tomato variety "Sanka" at different stages of development:

- 1 – Leaves. Flowering phase, control without treatment;
- 2 – Flowering phase, control treated with the biological product "Fitosporin M";
- 3 – Flowering phase, treated with a biological pesticide (seed treatment and 2-fold spraying);
- 4 – Flowering phase, treated with a biological pesticide (2-fold spraying);
- 5 – Fruiting phase, control without treatment;
- 6 – Fruiting phase, control treated with the biological product "Fitosporin M";
- 7 – Fruiting phase, treated with biological pesticide (seed treatment and 2-fold spraying);
- 8 – Leaves. Fruiting phase, treated with a biological pesticide (2-fold spraying);
- 9 – Root crop., technical ripeness, control without processing;
- 10 – technical ripeness, control treated with the biological product "Fitosporin M";
- 11 – technical ripeness, treated with a biological pesticide (seed treatment and 2-fold spraying);
- 12 – technical ripeness, treated with a biological pesticide (2-fold spraying);
- K+ – control with the presence of the pathogen

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что препарат 1 проявил фунгицидное действие в отношении возбудителей та-

ких болезней томатов и огурцов, как черная бактериальная пятнистость и аскохитоз соответственно.

Методом ПЦР-анализа признаки кольцевой

гнили на картофеле не выявлены, а препарат 2 оказал фунгицидное действие на развитие фитотрофы.

Отмечено эффективное действие названных препаратов в случае предпосевного замачивания семян и дальнейшей двукратной обработки растений в период цветения, при этом рекомендуемая концентрация растворов – $10^{-4}\%$.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Будынков Н.И. Защита растений в теплицах (размышления после очередного семинара по данной проблеме) // Теплицы России. 2009. N 3: С. 29–32.
2. Енгальчева И.А., Пышная О.Н., Тимина Л.С., Вершинина Н.П., Золотарева О.И. Идентификация вирусных болезней овощных культур в условиях московской области // Селекция и семеноводство овощных культур. 2014. N 45. С. 257–264.
3. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. N 4-2. С. 1044–1054.
4. Матвеева Т.В., Павлова О.А., Богомаз Д.И., Демкович Л.А., Лутова А.Е. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений // Экологическая генетика. 2011. Т. 9. N 1. С. 32–43. <https://doi.org/10.17816/ecogen9132-43>
5. Lievens B., Thomma V.P. Recent developments in pathogen detection arrays: Implications for fungal plant pathogens and use in practice // Phytopathology. 2005. Vol. 95. Issue 12. P. 1374–1380. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1374>
6. Schaad N.W., Frederick R.D., Shaw J., Schneider W.L., Hickson R., Petrillo M.D., et al. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues // Annual Review of Phytopathology. 2003. Vol. 41. P. 305–324. <http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095435>
7. Нугманова Т.А. Биопрепараты в овощеводстве и картофелеводстве // Картофель и овощи. 2017. N 6. С. 2–4.
8. Перфильева А.И., Граскова И.А., Рихванов Е.Г. Возбудитель кольцевой гнили картофеля – *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* // Агрехимия. 2013. N 12. С. 34–44.
9. Павловская Н.Е., Гагарина И.Н. Экологические технологии выращивания зеленого лука в условиях защищенного грунта // Вестник ОрелГАУ. 2016. N 2 (59). С. 45–48. <https://doi.org/10.15217/issn1990-3618.2016.2.45>
10. Нековаль С.Н., Маскаленко О.А., Чурикова А.К. Биологическая защита томата от бурой пятнистости (возбудитель *Cladosporium fulvum*

Ранняя диагностика заболеваний овощных культур методами, основанными на полимеразной цепной реакции, позволяет обнаруживать следовые количества патогенных микроорганизмов в максимально сжатые сроки и осуществлять выбор наиболее эффективных фунгицидных препаратов.

Сооке) в защищенном грунте // Достижения науки и техники АПК. 2018. Т. 32. N 8. С. 25–27. <https://doi.org/10.24411/0235-2451-2018-10806>

11. Фролова С.А. Применение биологического пестицида в технологии выращивания томата закрытого грунта // Вестник аграрной науки. 2018. N 2 (71). С. 130–136. <https://doi.org/10.15217/issn2587-666X.2018.2.130>

12. Кажарский В.И., Прищепа И.А. Эффективность совместного применения поверхностно-активных веществ (ПАВ) с инсектицидами на культуре огурца защищенного грунта // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. 2014. N 2. С. 99–105.

13. Доброхотов С.А., Анисимов А.И., Беякова Н.А., Максимова Л.Г., Орлова Г.О. На пути к экологическому земледелию // Защита и карантин растений. 2011. N 12. С. 19–22.

14. Ахатов А.К. Огурцы и томаты в теплицах // Прилож. к журн. «Защита и карантин растений». 2011. N 2. P. 69–114.

15. Георгиева О. Влияние органических удобрений и биологических средств защиты растений на поражение томата болезнями в защищенном грунте // Гавриш. 2013. N 6. С. 20–23.

16. Пигорев И.Я., Долгополова Н.В. Биологическая защита огурца (*Cucumis sativus* L) при технологии выращивания в защищенном грунте // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2018. N 3. С. 49–56.

17. Пат. № 2626174, Российская Федерация. Средство для предпосевной обработки семян овощных культур в условиях защищенного грунта / Н.Е. Павловская, И.Н. Гагарина, Д.Б. Бородин, И.Ю. Солохина, И.А. Гнеушева, Е.В. Костромичева [и др.]; патентообладатель ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет»; заявл. 09.02.2016; опубл. 21.07.2017.

18. Пат. № 2463759, Российская Федерация. Средство для предпосевной обработки семян гороха / Н.Е. Павловская, И.В. Горькова, И.Н. Гагарина, Д.Б. Бородин, Г.А. Борзенкова; патентообладатель ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет»; заявл. 03.05.2011; опубл. 20.10.2012.

REFERENCES

1. Budyakov NI. Plant protection in greenhouses (reflections after the next seminar on this issue). *Teplitsy Rossii*. 2009;3:29–32. (In Russian)

2. Yengalicheva IA, Pishnaya ON, Timina LT, Vershinina NP, Zolotareva OI. Identification of virus diseases of vegetable crops in Moscow region. Se-

leksiya i semenovodstvo ovoshchnyh kultur. 2014;45:257–264. (In Russian)

3. Khlestkina EK. Molecular markers in genetic studies and in breeding. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(4-2):1044–1054. (In Russian)

4. Matveeva TV, Pavlova OA, Bogomaz DI, Demkovich LA, Lutova AE. Molecular markers for the species identification and phylogenetics of plants. *Ekologicheskaya genetika = Ecological Genetics*. 2011;9(1):32–43. (In Russian) <https://doi.org/10.17816/ecogen9132-43>

5. Lievens B, Thomma BP. Recent developments in pathogen detection arrays: Implications for fungal plant pathogens and use in practice. *Phytopathology*. 2005;95(12):1374–1380. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1374>

6. Schaad NW, Frederick RD, Shaw J, Schneider WL, Hickson R, Petrillo MD, et al. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. *Annual Review of Phytopathology*. 2003;41:305–324. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095435>

7. Nugmanova TA. Biopreparations in vegetable and potato growing. *Kartofel' i ovoshchi = Potato and Vegetables*. 2017;6:2-4. (In Russian)

8. Perfileva AI, Graskova IA, Rikhvanov EG. The causative agent of annular potato rot – *Slavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*. *Agrokimiya = Agrochemistry*. 2013;12:34–44. (In Russian)

9. Pavlovskaya NE, Gagarina IN. Ecological cultivation technology of green onions in greenhouse. *Vestnik Orlovskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Vestnik OreIGAU*. 2016;2:45–48. (In Russian)

10. Nekoval SN, Maskalenko OA, Churikova AK. Biological protection of tomato against leaf mold (*Cladosporium fulvum* Cooke) in sheltered ground. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Advances in Science and Technology of Agroindustrial Complex*. 2018;32(8):25–27. (In Russian) <https://doi.org/10.24>

411/0235-2451-2018-10806

11. Frolova SA. Application of biological pesticide in technology for growing tomato under cover. *Vestnik agrarnoi nauki = Bulletin of agrarian science*. 2018;2:130–136. (In Russian) <https://doi.org/10.15217/issn2587-666X.2018.2.130>

12. Kazharskii VI, Prishchepa IA. The effectiveness of simultaneous use of surfactants and insecticides on the culture of protected ground cucumber. *Vestnik Belorusskoi gosudarstvennoi sel'skohozyaistvennoi akademii = Bulletin of the Belarusian State Agricultural Academy*. 2014;2:99–105. (In Russian)

13. Dobrokhotov SA, Anisimov AI, Belyakova NA, Maksimova LG, Orlova GO. On the way to ecological agriculture. *Zashchita i karantin rastenii = Plant protection and quarantine*. 2011;12:19–22. (In Russian)

14. Akhatov AK. Cucumbers and tomatoes in greenhouses. Supplement to the journal *Zashchita i karantin rastenii = Plant protection and quarantine*. 2011;2:69–114. (In Russian)

15. Georgieva O. Effect of organic fertilizers and biological plant protection products on the development of tomato diseases in greenhouses. *Gavrish*. 2013;6:20–23. (In Russian)

16. Pigorev IYa, Dolgopolova NV. Biological protection of cucumber (*Cucumis sativus* L) with technology growing in greenhouses. *Vestnik Kurskoi gosudarstvennoi sel'skohozyaistvennoi akademii = Bulletin of the Kursk State Agricultural Academy*. 2018;3:49–56. (In Russian)

17. Pavlovskaya NE, Gagarina IN, Borodin DB, Solokhina IYu, Gneusheva IA, Kostromicheva EV, et al. Agent for pre-sowing treatment of vegetable crop seeds in protected soil conditions. Patent RF, no. 2626174; 2016. (In Russian)

18. Pavlovskaya NE, Gor'kova IV, Gagarina IN, Borodin DB, Borzenkova GA. Means for pre-sowing treatment of pea seeds. Patent RF, no. 2463759; 2011. (In Russian)

Критерии авторства

Павловская Н.Е., Гагарина И.Н., Гаврилова А.Ю., Бородин Д.Б. выполнили экспериментальную работу. Авторы совместно обобщили результаты, написали рукопись, имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Contribution

Ninel E. Pavlovskaya, Irina N. Gagarina, Anna Yu. Gavrilo A.Yu., Dmitry B. Borodin carried out the experimental work. The authors on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. All authors have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

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.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Павловская Нинэль Ефимовна,
д.б.н., профессор,
заведующая кафедрой биотехнологии,
Орловский государственный аграрный
университет им. Н.В. Парахина,
302019, г. Орел, ул. Генерала Родина, 69,
Российская Федерация,
e-mail: ninel.pavlovskaya@yandex.ru

Гагарина Ирина Николаевна,
к.с.-х.н., доцент, руководитель ЦКП
«Орловский региональный центр
сельскохозяйственной биотехнологии»,
Орловский государственный аграрный
университет им. Н.В. Парахина,
302019 г. Орел, ул. Генерала Родина, 69,
Российская Федерация,
✉ e-mail: i-gagarina@list.ru

Гаврилова Анна Юрьевна,
к.б.н., доцент кафедры биотехнологии,
Орловский государственный аграрный
университет им. Н.В. Парахина,
302019 г. Орел, ул. Генерала Родина, 69,
Российская Федерация,
e-mail: anechkag@bk.ru

Бородин Дмитрий Борисович,
к.с.-х.н., доцент, руководитель ЦКП
«Биотехнологии микрклонального
размножения картофеля»,
Орловский государственный аграрный
университет им. Н.В. Парахина,
302019 г. Орел, ул. Генерала Родина, 69,
Российская Федерация,
e-mail: bioogau@mail.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ninel E. Pavlovskaya,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Head of the Department of Biotechnology,
Orel State Agrarian University
named after N.V. Parakhin,
69, General Rodin St., Orel, 302019,
Russian Federation,
e-mail: ninel.pavlovskaya@yandex.ru

Irina N. Gagarina,
Cand. Sci. (Agriculture), Associate Professor,
Head of the Orel Regional Center of Agricultural
Biotechnology,
Orel State Agrarian University
named after N.V. Parakhin,
69, General Rodin St., Orel, 302019,
Russian Federation,
✉ e-mail: i-gagarina@list.ru

Anna Yu. Gavrilova,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Department of biotechnology,
Orel State Agrarian University
named after N.V. Parakhin,
69, General Rodin St., Orel, 302019,
Russian Federation,
e-mail: anechkag@bk.ru

Dmitry B. Borodin,
Cand. Sci. (Agriculture), Associate Professor,
Head of the Central Research Center
"Biotechnology of Microclonal Reproduction
of Potatoes»,
Orel State Agrarian University
named after N.V. Parakhin,
69, General Rodin St., Orel, 302019,
Russian Federation,
e-mail: bioogau@mail.ru



The effect of metal-containing biocomposites of fungal origin on potato plants *in vitro*

© Olga M. Tsvileva*, Alla I. Perfileva**, Antonina G. Pavlova***

*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms,
Russian Academy of Sciences, Saratov, Russian Federation

**Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch,
Irkutsk, Russian Federation

***Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

Abstract: The effect of metal (II)-containing composites based on extracellular metabolites of basidiomycetes *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola umbellata* and *Laetiporus sulphureus* on the viability and response of potato plants *in vitro* has been investigated. The Lukyanovsky variety of potato, which is susceptible to ring rot, caused by the bacterium *Clavibacter sepedonicus*, was studied. The parameters investigated included biofilm formation by *Clavibacter sepedonicus*, various morphometric parameters of plants and the phytotoxicity of substances of fungal origin. The greatest anti-biofilm-forming effect was observed in metal-containing biocomposites based on *G. lucidum*; Fe- and Co-containing biopreparations inhibited the formation of *Clavibacter sepedonicus* biofilms by 40–50%. The plant height was adversely affected by composites, in the absence of metal (II), derived from *L. sulphureus* and *P. ostreatus*, as well as by a Co-containing composite derived from *P. ostreatus*. The decrease in plant growth, in comparison with the control, can be associated with the pronounced antibiotic properties of these basidiomycetes and cobalt. The remaining biocomposites studied did not have an adverse effect on the growth of potatoes *in vitro*. A number of morphometric parameters (length of internodes, number of leaves) remained virtually unchanged when exposed to biocomposites of fungal origin. In contrast to the vegetative part of plants, the biomass and length of the roots increased by 10–20% under the influence of biocomposites. Copper-containing composites derived from *G. lucidum* had no phytotoxic effect on plants and enhanced potato resistance to *Clavibacter sepedonicus*. The beneficial properties of biocomposites may be judged by the degree of stimulation of the physiological processes underlying the formation of the underground part of the plants, which is a prerequisite for increasing yields. The biocomposites are environmentally friendly because of their natural origin and being effective at very low doses. The results obtained using metal-containing biocomposites derived from *G. lucidum* and *Gr. umbellata* demonstrate the safety and possible improvement in health of potato plants by using biocomposites derived from cultures of higher fungi.

Keywords: *Solanum tuberosum* L., higher fungi, phytopathogenic bacteria, *Clavibacter sepedonicus*, metals (II), biocomposites

Acknowledgments: This work was supported by grant from the President of RF (no. MK-1220.2019.11 for A.I. Perfileva [effect of biopreparations on plants and *Clavibacter sepedonicus*]). Fungal metabolites studies were carried out under research theme no. AAAA-A17-117102740098-8.

Information about the article: Received September 20, 2019; accepted for publication August 31, 2020; available online September 30, 2020.

For citation: Tsvileva OM, Perfileva AI, Pavlova AG. The effect of metal-containing biocomposites of fungal origin on potato plants *in vitro*. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):412–423. (In English) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-412-423>

УДК 632.93, 579.222:577.118

Влияние металлсодержащих биокомпозитов грибного происхождения на растения картофеля *in vitro*

О.М. Цивилева*, А.И. Перфильева**, А.Г. Павлова***

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
г. Саратов, Российская Федерация

**Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск, Российская Федерация

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

Резюме: Изучено влияние содержащих металлы(II) композитов, полученных на основе внеклеточных метаболитов базидиомицетов *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola umbellata* и *Laetigium sulphureus*, на жизнеспособность и ответные реакции растений картофеля *in vitro*. Исследования проводили на пробирочных растениях картофеля *in vitro* сорта Лукьяновский, восприимчивого к возбудителю кольцевой гнили – бактерии *Clavibacter sepedonicus*. Изучали биопленкообразование *Clavibacter sepedonicus*, морфометрические показатели растений, фитотоксичность субстанций грибного происхождения. Наибольший антибиопленкообразующий эффект наблюдался у металлсодержащих биокомпозитов на основе *G. lucidum*; Fe- и Co-содержащие биопрепараты подавляли образование биопленок *Clavibacter sepedonicus* на 40–50%. На высоту растений негативно воздействовали только не содержащие металлы(II) композиты на основе *L. sulphureus* и *P. ostreatus*, а также Co-содержащий препарат из *P. ostreatus*. Снижение прироста растений по сравнению с контролем можно связать с выраженными антибиотическими свойствами этих базидиомицетов и кобальта. Остальные исследуемые биокомпозиты не оказывали негативного влияния на рост картофеля *in vitro*. Ряд морфометрических показателей растений (длина междоузлий, количество листьев) оставался практически неизменным при воздействии биокомпозитов грибного происхождения. В отличие от вегетативной части растений биомасса корней и их длина увеличивалась на 10–20% под влиянием биокомпозитов. Медьсодержащие препараты из *G. lucidum* не проявляли фитотоксического действия в отношении растений и обладали эффектом усиления устойчивости картофеля к *Clavibacter sepedonicus*. Стимуляция физиологических процессов формирования подземной части растений как предпосылка повышения урожайности позволяет судить о полезных свойствах предложенных биокомпозитов, экологически чистых благодаря природному происхождению и эффективных в очень малых дозах. Полученные результаты свидетельствуют о безопасности биокомпозитов на основе *G. lucidum* и *Gr. umbellata* для растений картофеля и возможных перспективах оздоровления картофеля с применением металлсодержащих биокомпозитов, полученных с использованием культур высших грибов.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L., высшие грибы, фитопатогенные бактерии, *Clavibacter sepedonicus*, металлы(II), биокомпозиты

Благодарность: Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации (№ МК-1220.2019.11 для А.И. Перфильевой [влияние биопрепаратов на растения и *Clavibacter sepedonicus*]). Изучение метаболитов грибов выполнено в рамках темы №. АААА-А17-117102740098-8.

Информация о статье: Дата поступления 20 сентября 2019 г.; дата принятия к печати 31 августа 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2020 г.

Для цитирования: Цивилева О.М., Перфильева А.И., Павлова А.Г. Влияние металлсодержащих биокомпозитов грибного происхождения на растения картофеля *in vitro*. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 2. С. 412–423. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-412-423>

INTRODUCTION

Bacteria of the genus *Clavibacter* infect a wide range of cultivated and weed plants [1], including plants of the *Solanaceae* family, which are the most important agricultural crops [2]. The causative agent of ring rot in potatoes [3] belonging to the genus *Clavibacter* is *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) (Spiekermann and Kotthoff, 1914; Davis et al., 1984), designated *Clavibacter sepedonicus* in the new classification [4]. To date, there are no effective means to regulate the population of this pathogen [5, 6]. Moreover, there are no drugs of chemical or biological origin capable of limiting the spread of bacterial potato diseases, and the use of biocontrol agents is highly problematic [1]. Hence, there is an opportunity to develop substances that are effective in combating bacteria, safe to use with the plants and possibly beneficial for the health of the potato when affected by the phytopathogenic gram-positive bacterium *Cms*. Bio-

composites of fungal origin avoid both the environmental risks associated with modern chemical pesticides and the increasing resistance of phytopathogens to chemical pesticides [7]; phytopathogens decrease both the yield and quality of these strategically important crops [8]. Therefore, the most satisfactory solution would be to identify preparations based on natural compounds.

The use of biometals in conjugates of biopolymers and edible fungi represents a more environmentally friendly option for plant protection compared to the use of inorganic chemical forms of metals, such as oxides and salts. For instance, one of the most phytotoxic types of nanomaterials is zinc oxide particles, which are capable of inhibiting the growth of roots of radish, rape, ryegrass, lettuce, corn, cucumber [9]. Inorganic nanostructures were shown to inhibit seed germination, based on indicators such as the length of the seedlings and the rate of plant growth, when analysing the degree of bio-

availability and toxicity of both copper nanoparticles with *Phaseolus radiatus* and *Triticum aestivum* [10] and magnetite nanoparticles Fe₃O₄ and ZnO with *Arabidopsis thaliana* [11]. The use of other metals that do not belong to microelements and are known for their antimicrobial properties, primarily noble metals, is not economically feasible for combating bacterial phytopathogens. In addition, Ag readily leaks into wastewater during rinsing thereby adversely affecting the beneficial bacteria used in wastewater treatment. Similarly, the ingress of silver into water bodies is dangerous for aquatic organisms [12].

A wide range of biologically active metabolites of higher fungi are represented by high molecular weight protein, carbohydrate and lipid substances, by low molecular weight compounds such as amino acids, monosaccharides and fatty acid substances, and finally by groups of compounds dominant in the chemical composition of a mushroom culture. Basidiomycetes, which produce a unique complex of biologically active substances, are being investigated as a source of substances with antibacterial properties, for example we previously studied [13] the generation of potentially antimicrobial inorganic components in extracellular metabolites of basidiomycetes in hybrid biocomposites.

The purpose of this study is to evaluate a treatment for improving the health of agricultural plants. The treatment is created from composites containing metal (II) compounds in macromycete metabolites and is evaluated by determining the viability and the response of potato plants *in vitro*.

EXPERIMENTAL

Research subjects and cultivation conditions. The strain *Clavibacter sepedonicus* Ac-1405 was obtained from the All-Russian collection of microorganisms (Pushchino-Na-Oke, Moscow Oblast). This species is not listed in the classification of microorganisms by pathogenic groups in the Sanitary and Epidemiological Regulations SP 1.3.2322-08. Bacteria *Cms* were grown on a medium with the composition, g/l: glucose – 5.0; peptone – 10.0; yeast extract – 5.0; CaCO₃ – 5.0. The fungal cultures were *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., strain 1315 (reishi mushroom); *Grifola umbellata* (Pers.) Pilát, strain 1622 (umbrella polypore) from the collection of the Department of Mycology and Algology, Moscow State University (Moscow); *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, strain 120707 (sulphur polypore) from the collection of the Department of Botany of Irkutsk State University (Irkutsk); *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Kumm., strain NK352 (oyster mushroom) from the collection of Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences (Saratov). Mushroom cultures were maintained on agarized beer wort (4 degrees Balling).

Cultivation of plants *in vitro*. The studies were

carried out *in vitro* on potato plants *Solanum tuberosum* L. of variety Lukyanovsky (A.G. Lorkh All-Russian Research Institute of Potato Farming), which is susceptible to ring rot [14, 15]. Microclonal propagation of test tube plants was carried out using cuttings. The cuttings were planted at the internode depth in an agar nutrient Murashige and Skoog medium (MS) containing vitamins and hormones, at pH = 5.8–6.0; they were cultivated for 2 weeks and maintained at a constant temperature in the range of 24–25 °C, illumination of 5–6 klx, and photoperiod duration of 16 h; and then transferred into MS liquid medium of the same composition, but without agar.

Evaluation of bactericidal activity. Metal-containing biosamples of fungal origin were obtained as described in [16]. Determination of the sensitivity of the phytopathogen to fungal bioagents was carried out by diffusion in agar.

Methods for studying biofilm formation in bacteria. To study the effect of metal-containing preparations on biofilm formation by *Cms*, the bacterial culture was grown for 1 day in a liquid nutrient medium, then the test agent was added to the suspension, and cultured under aerated conditions for another day. Next, the optical density of the bacterial suspension was measured at a wavelength of 595 nm (A₅₉₅) and the suspension was titrated to 96-well polystyrene plates. After 48 h of incubation, the plates were stained with 1% (w/v) gentian violet solution at room temperature for 45 min. Subsequently, the wells were washed three times with distilled water to remove unabsorbed cells, the dye from bacterial cells was extracted with ethanol, and the A₅₉₅ value was measured on a BIO-RAD model 680 (USA) microplate reader [17].

Determination of biometric parameters of plants. Metal-containing biocomposites were added to the liquid potato growth medium. Then the plants were incubated for 25 days monitoring the following biometric indicators: growth, number of leaves, length of internodes. The fresh biomass of the plant material was assessed gravimetrically.

Determination of the phytotoxicity of a biological product. Potato plants, after removing the roots, were placed in containers with mediums of the following compositions (Table 1).

Table 1. Composition of media for determining the phytotoxicity of a biological product
Таблица 1. Состав сред для определения фитотоксичности биопрепарата

Experiment number	Volume of medium components, ml		
	MS	<i>Cms</i> suspension	Biological product
1	25	25	0,5
2	50	–	0,5
3	25	25	–
4	50	–	–

Note. "–" – denotes the absence of the component.

Each experiment was independently replicated 3 times; in each biological variant of the experiment,

3–5 plants were analysed. The results were recorded every hour for a total of 6 hours.

Statistical processing of experimental data was performed using the Excel software package. The arithmetic mean and standard deviation were assessed. The reliability of the data was checked using the Mann-Whitney *U*-test.

RESULTS AND DISCUSSION

A combination of environmentally friendly biopesticides and beneficial microorganisms constitutes an alternative to chemically manufactured pesticides [18]. We studied biopesticides containing bio-metal (II), in a form generated by fungal action in a nutrient medium, by measuring both bacteriostatic and bactericidal activity of fungal substances against the phytopathogen *Cms*. The total pool of extracellular metabolites was isolated from submerged cultures of *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola umbellata* and *Laetiporus sulphureus*, and found to contain products derived from the introduced metal (II) salts which were produced by fungal biotransformation (Table 2).

The substances derived by fungal action were used in comparative studies of biological activity. Earlier, we showed the species-specific features of the antibacterial effect against *Cms* of metal-containing biocomposites obtained from cultures of different genera and species of fungi [16]. In the present work studying metal-containing preparations of fungal origin applied to plant specimens, we selected biocomposites from those studied previously, which were characterized by a noticeable antibacterial effect against *Cms*. The control treatment consisted of biopolymer substances obtained from the same fungus but which did not contain any metal (see Table 2). In studies of the effects of metal(II) cations, inorganic metal salts were added to the growth medium.

Trace-metal elements are essential for well-known biological processes and are therefore vital to living systems, but become toxic when their concentration exceeds certain limits. It is argued that the biocomposites studied are safe because they are composed of trace elements at concentrations

of the order of 10^{-4} mol/l. The concentration is further reduced when the treatment dose is diluted in the nutrient media. The content of microelements in plants is $1 \cdot 10^{-3}$ – $1 \cdot 10^{-5}\%$ [19], and on average, the molar mass of the microelements studied is 60 g/mol. In nature by comparison, plants can contain up to 0.17 mmol/kg mass, which is the equivalent of more than 0.1 mmol/l in the prepared biocomposites before dosing.

One of the antimicrobial effects of drugs developed to combat bacterial plant pathogens is their ability to counteract the formation of biofilms by phytopathogens [20]. The formation of biofilms by *Cms* in the vascular system of the plant is the main cause of the wilting of potato leaves [21]. Therefore, it was necessary to study the effect of metal-containing biocomposites on *Cms* biofilm formation. The greatest anti-biofilm-forming effect was observed in preparations based on *G. lucidum* (Fig. 1).

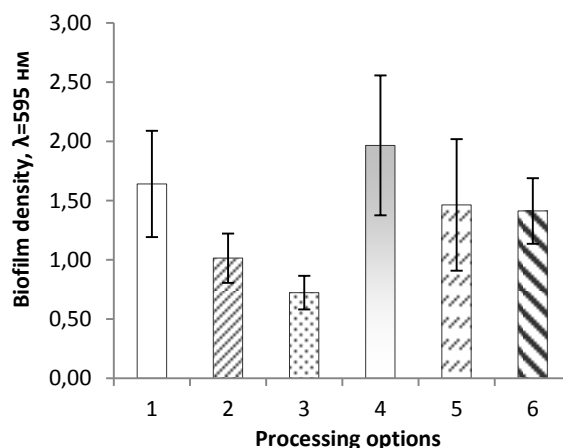


Fig. 1. Anti-biofilm-forming efficiency of biocomposites based on *Ganoderma lucidum* (4), containing Fe (2), Co (3), Cu (5), Zn (6), compared to *Cms* (1)

Рис. 1. Антибиопленкообразующая эффективность биокомпозитов на основе *Ganoderma lucidum* (4), содержащих Fe (2), Co (3), Cu (5), Zn (6), в отношении *Cms* (1)

Table 2. Biocomposites of fungal origin used in the work

Таблица 2. Биокомпозиты грибного происхождения, использованные в работе

Laboratory sample code	Sample characteristic	Addition of the compound to the liquid medium upon obtaining the sample	Concentration of metal (II)s in the sample, mol/L
1K	Composite based on <i>Pleurotus ostreatus</i> HK352	none	0
1Co	Composite based on <i>Pleurotus ostreatus</i> HK352	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1·10 ⁻⁴
2K	Composite based on <i>Ganoderma lucidum</i> 1315	none	0
2Cu	Composite based on <i>Ganoderma lucidum</i> 1315	CuSO ₄ ·5H ₂ O	2·10 ⁻⁴
4K	Composite based on <i>Grifola umbellata</i> 1622	none	0
4Zn	Composite based on <i>Grifola umbellata</i> 1622	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2·10 ⁻⁴
5K	Composite based on <i>Laetiporus sulphureus</i> 120707	none	0
5Fe	Composite based on <i>Laetiporus sulphureus</i> 120707	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2·10 ⁻⁴

Iron-containing and especially cobalt-containing biocomposites inhibited the formation of *Cms* biofilms by 40–50% (see Fig. 1). The fungal preparations incorporating metal(II) cause a significant reduction in biofilm-forming ability, whereas the fungal preparation in the absence of metal(II) (Fig. 1, option 4) enhance biofilm-forming ability (by 15%). The biochemical action of fungus *G. lucidum* made a significant contribution to the anti-biofilm-forming efficiency of the biocomposites. The growing interest in the creation of nutraceuticals and functional products was the impetus to study the species *Ganoderma* from various geographical origins to facilitate the identification of natural compounds with pronounced antibacterial, antioxidant, medical and other useful properties [22]. A distinctive feature of the pool of metabolites from fungi of this genus are triterpenes, including ganoderic acids [23], which have antimicrobial properties and are important in biotechnology. Due to their ability to form complexes of Co (II), which adversely affect *Cms* biofilm formation, these low molecular weight compounds formed by *G. lucidum* are considered to be promising substances.

Various growth parameters of potato plants provided quantitative measures of the strength of action of these substances of fungal origin (Fig. 2).

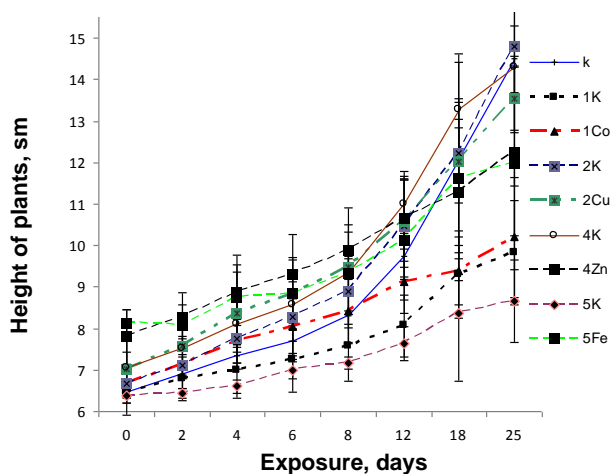


Fig. 2. Dependence of the height of potato plants *In vitro* (k) on the presence of biocomposites derived from *Pleurotus ostreatus* (1K), *Ganoderma lucidum* (2K), *Grifola umbellata* (4K), *Laetiporus sulphureus* (5K) containing Co (1Co), Cu (2Cu), Zn (4Zn), Fe (5Fe)

Рис. 2. Зависимость высоты растений картофеля *In vitro* (k) от присутствия биокомполитов на основе *Pleurotus ostreatus* (1K), *Ganoderma lucidum* (2K), *Grifola umbellata* (4K), *Laetiporus sulphureus* (5K), содержащих Co (1Co), Cu (2Cu), Zn (4Zn), Fe (5Fe)

Plant growth was reduced by 36 and 50% by metabolites produced by *P. ostreatus* (Fig. 2, 1K, 1Co) and *L. sulphureus* (Fig. 2, 5K), respectively, compared to the control substances. It is known that oyster mushroom and sulphur polypore are basidiomycetes with pronounced antimicrobial properties [24, 25]. Therefore, it is likely that the effect of me-

tabolites from these fungi had an antibiotic effect on potato plants with subsequent growth inhibition. There was no observed adverse effect on the growth of potatoes *in vitro* during the entire observation period (25 days) in the presence of the remaining biocomposites investigated from cultures of *L. sulphureus* (Fig. 2, 5Fe), *Gr. umbellata* (Fig. 2, 4K, 4Zn) and *G. lucidum* (Fig. 2, 2K, 2Cu).

When considering a choice of suitable biometal (II)s to study in conjunction with the fungi, it should be noted that only cobalt has an adverse effect on the height of potato plants (Fig. 2, 1Co). In fungi, cobalt is also relatively toxic [26]. This sensitivity to Co-containing substances is not unexpected because only at relatively low concentrations is this trace element necessary for growth, development and the activity of various enzymes in both potato plants and basidiomycetes [27]. The fungal cultures used to form biocomposites respond to the presence of Co (II) by activating various biochemical reactions producing metabolites, which in turn, contribute to the inhibition of plant growth.

A number of morphometric parameters of plants (length of internodes, number of leaves) remained practically unchanged when exposed to biocomposites of fungal origin. The length of internodes in plants was not affected by any of the investigated agents; therefore "stretching" of the plants was not observed. Treatment of potatoes with preparations based on *P. ostreatus* or *L. sulphureus* contributed to the shortening of internodes in plants. None of the observed effects was considered to be adverse.

None of the composites in the study had a significant effect on the number of new leaves in the potato plants during the study (Table 3).

Preparations of fungal origin were shown to affect the colour of the leaves of potato plants. In the presence of Cu-containing composite based on *G. lucidum*, the colour of the leaves became more saturated (Fig. 3, 2Cu). This is probably due to the inclusion of copper ions, in the form of a coenzyme, in the photosynthetic processes of the plant [19].

Pale green leaves and a thinner collet of potato stems were observed with composites, both containing iron and in the absence of iron, based on *L. sulphureus* (Fig. 3, 5K, 5Fe). This is probably the result of both an excess of iron in the plant growth medium and the contribution of the biological properties of *L. sulphureus*, in particular, the high antioxidant activity of the sulphur polypore [28].

It is well known that the coordinated action of reactive oxygen species (ROS) and phytohormones regulates plant growth, development and stress tolerance [29]. ROS are multifunctional plant signalling molecules contributing to the adaptive capacity of any plant species [30]. It was also shown that antioxidant compounds exhibiting a pronounced antioxidant effect might impede the development of oxidative stress in potato plants [31]. Agents with antioxidant properties, for example biocomposites

Table 3. Effect of biocomposites on the number of leaves in potato plants *in vitro*
Таблица 3. Влияние биокомпозитов на количество листьев у растений картофеля *in vitro*

Laboratory sample code	Duration of cultivation, days					
	0	2	6	12	18	25
K	12,3±1,2	12,7±1,5	14,3±2,1	16,0±1,0	17,0±0,4	19,0±1,0
1K	12,0±2,7	12,0±2,7	11,7±1,5	14,7±2,3	18,0±3,6	21,0±4,6
1Co	12,7±2,5	12,7±2,5	13,0±3,0	15,7±1,5	17,3±2,1	20,7±2,5
2K	11,0±2,7	11,3±2,3	12,7±2,9	15,0±1,0	16,7±2,5	21,3±4,0
2Cu	13,3±3,1	13,3±3,1	15,3±2,5	14,3±1,5	15,7±2,3	17,3±2,9
4K	11,3±0,6	11,7±0,6	13,3±0,6	14,0±0,4	16,0±1,0	19,0±1,0
4Zn	12,0±1,7	12,3±1,2	13,0±1,0	15,0±2,7	15,7±2,3	18,0±2,7
5K	13,7±1,5	13,7±1,5	13,0±1,7	14,0±1,7	14,3±4,9	16,7±1,5
5Fe	15,3±5,1	15,3±5,1	16,7±4,0	17,7±3,8	20,0±2,7	20,0±1,7

Note. K – control potato plants (without treatment with biocomposites).

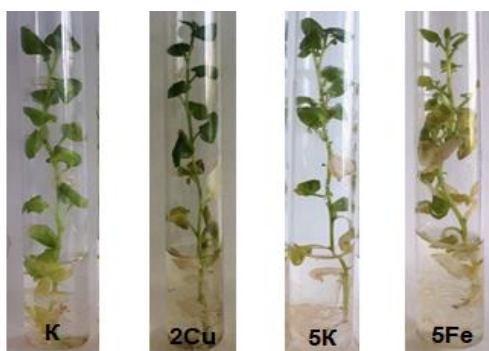


Fig. 3. Change in colour of leaves of potato plants *in vitro* (K) under the influence of biocomposites based on *Ganoderma lucidum* (2Cu), *Laetiporus sulphureus* (5K, 5Fe)

Рис. 3. Изменение окраски листьев растений картофеля *in vitro* (K) под влиянием биокомпозитов на основе *Ganoderma lucidum* (2Cu), *Laetiporus sulphureus* (5K, 5Fe)

derived from *L. sulphureus*, counteract the action of ROS thereby having an effect on the biochemical processes of potato plants (see Fig. 3). This could serve as one of the reasons for the decrease in growth rates (see Fig. 2) by obviating the need for the plant's stress-dependent activation of certain antioxidant enzymes. The elevated level of exogenous antioxidant substances from another basidiomycete, oyster mushroom (Fig. 2, 1K), had the same effect on the reduction of the growth of potato plants, but this was less pronounced than that caused by the sulphur polypore (Fig. 2, 5K).

The biochemical properties of the fungi from which the biocomposites were derived, including the antioxidant activity of fungi, were not considered to be the predominant source of action on potato plants, despite the ability for enhanced bioproduction of antioxidant compounds [28] commonly found in *P. ostreatus* and *L. sulphureus*. In particular, in an experiment to determine the mass of roots of potato plants using the biocomposite based on *P. ostreatus* (Fig. 4, 1K), no significant increase in mass was observed compared to the control of untreated plants, although it was noted that a positive effect due to a compound derived from *L. sulphureus* was one of the most pronounced (Fig. 4, 5K).

By contrast, the cobalt-containing agent produced a noticeable increase in the biomass of the roots of potato plants (Fig. 4, 1Co). This increase, when taken into account with the suppression of the formation of *Cms* biofilms discussed above (see Fig. 1), forms the rationale for the recommendation to use Co-containing precursors for biocomposites of fungal origin.

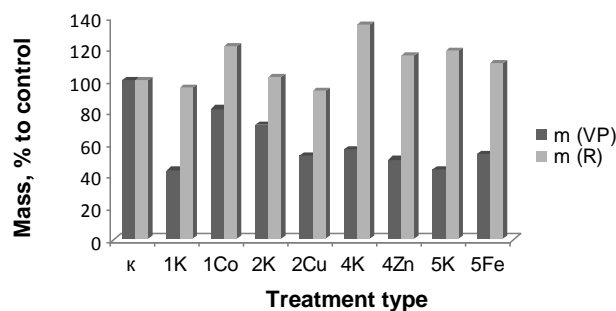


Fig. 4. Mass of vegetative part (VP) and roots (R) of potato plants *in vitro* (K) under the influence of biocomposites based on *Pleurotus ostreatus* (1K), *Ganoderma lucidum* (2K), *Grifola umbellata* (4K), *Laetiporus sulphureus* (5K), containing Co (1Co), Cu (2Cu), Zn (4Zn), Fe (5Fe)

Рис. 4. Масса вегетативной части (VP) и корней (R) растений картофеля *in vitro* (K) под влиянием биокомпозитов на основе *Pleurotus ostreatus* (1K), *Ganoderma lucidum* (2K), *Grifola umbellata* (4K), *Laetiporus sulphureus* (5K), содержащих Co (1Co), Cu (2Cu), Zn (4Zn), Fe (5Fe)

As a general observation of the results of the experiments, the biomass and length of roots either did not change compared to those of the control plants or increased in the range 10–20%. This result is important because the tubers are the most valuable part of the potato which is an important agricultural crop, although it was noted that the mass of the vegetative part of the plants decreased (see Fig. 4). A prerequisite for increasing the yield and quality of cultivated product is the stimulation of the physiological processes of the underground part of the plant which is formed of complex features that consist of many structural elements; the yield is not solely dependent on the morphometric parameters of the aboveground part of plants. Additionally it is of great

importance to increase the resistance of plants to unfavourable actors and boost their immunity.

Although the 2Cu biocomposite experiment showed no effect on the increase in mass of plant roots (see Table 2), this preparation based on *G. lucidum* had a moderate bactericidal and bacteriostatic effect on the causative agent of potato ring rot and demonstrated anti-biofilm-forming efficacy against *Cms* (see Fig. 1), without a negative effect on the biometric characteristics of the plants (Fig. 2, 2Cu; 3, 2Cu; Table 3). A study of the phytotoxicity of this biocomposite in the potato plant was carried out prior to recommending its use in biotechnology (Fig. 5).

In the absence of bacteria (Fig. 5, 2) or in the presence of both *Cms* and the biological product under investigation (Fig. 5, 1), the plants looked healthy after the first hour. The first symptoms of the disease (withering of leaves, wilt) in MS medium were noted after the first hour of incubation in the presence of *Cms* in specimen number 3 (Fig. 5). A slight wilting of plants was noted in all specimens 4 h from the start of the experiment. After 6 hours of

observation, almost all leaves of plants in the experiment "Cms without biocomposite" had wilted (Fig. 5, 3), whereas in the specimen "Cms with biocomposite" (Fig. 5, 1) no more than 40% of the leaves had wilted. This effect continued to be observed after 21 h. The results demonstrate that the biological product being studied had a clear positive effect on the plant's ability to fight infection. It is known that plant growth effectors can induce resistance to various phytopathogens [32, 33]. Resistance to infectious diseases is "turned on" in plants in response not only to their local infection, but also to treatment with substances from a large group of structurally diverse organic and inorganic compounds, which do not induce pathogen resistance. This immunity is a result of changes in plant metabolism, which have an adverse effect on the nutrition, growth, development and reproduction of phytopathogenic organisms. Substances derived from the biocomposites proposed in this work potentially effect similar changes in plant metabolism but may be considered environmentally friendly due to their natural origin and effectiveness at low doses.

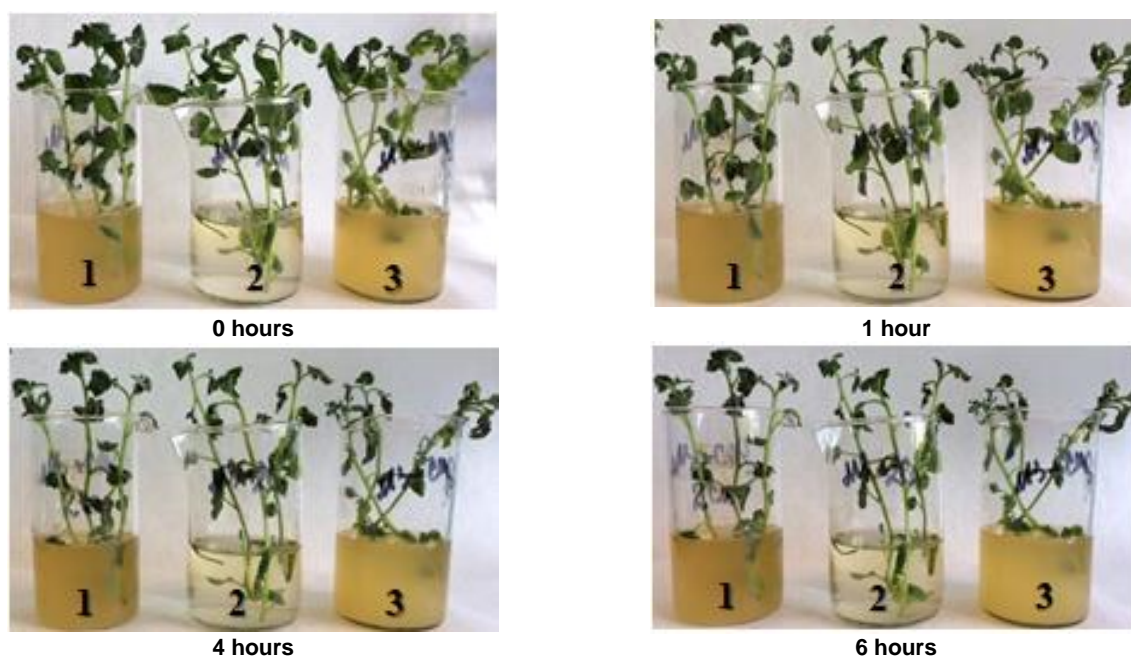


Fig. 5. Study of phytotoxicity of Cu-containing biocomposite derived from *Ganoderma lucidum* in relation to potato plants, grown on MS medium (1, 2, 3) with *Cms* suspension (1, 3) and biocomposite (1, 2)

Рис. 5. Исследование фитотоксичности Си-содержащего биокомпозита на основе *Ganoderma lucidum* по отношению к растениям картофеля, выращенным на среде MS (1, 2, 3) с суспензией *Cms* (1, 3) и биокомпозитом (1, 2)

CONCLUSIONS

The following conclusions can be deduced from the results of this study of the viability and response of potato plants *in vitro* to the presence of metal (II) containing composites synthesized as extracellular metabolites of basidiomycetes *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola umbellata* and *Laetiporus sulphureus*.

1. Metal-containing biocomposites based on *G. lucidum* have the highest anti-biofilm-forming efficacy against the *Cms* bacteria, the pathogen of potato ring rot. Fe- and Co-containing biopreparations inhibit the formation of *Cms* biofilms by 40–50%.

2. When exposed to biocomposites of fungal origin, virtually no change was observed in a num-

ber of morphometric parameters in the Lukyanovsky variety potato plants, which are susceptible to *Cms*. The composites studied do not have a significant effect on the number of leaves, do not lead to excessive lengthening of the plant stem, and in most cases, do not have a negative effect on the growth of potatoes *in vitro*. The biomass and length of roots either do not change or increase by 10–20% under the influence of these biocomposites.

3. Plant height is adversely affected not only by composites derived from *L. sulphureus* and *P. ostreatus* in the absence of metal (II), but also by one Co-containing preparation derived from *P. ostreatus*. This effect may be associated with the increased antimicrobial and antioxidant activity of exometabolites from these basidiomycetes, as well as with the antibiotic properties of cobalt.

4. It is recommended to use cobalt compounds to obtain biocomposites based on basidiomycetes because the Co-containing agent is associated with

a noticeable increase in the biomass of the roots of potato plants combined with the suppression of the formation of biofilms *Cms*.

5. A copper-containing preparation derived from *G. lucidum* is associated with a moderate bactericidal and bacteriostatic effect on the causative agent of potato ring rot, demonstrates anti-biofilm-forming efficacy against *Cms*, does not have an adverse effect on any of the plant biometric parameters studied, does not exhibit phytotoxic action against plants and enhances potato resistance to *Cms*.

6. It is recommended to study the effect of treatment with biocomposites from metabolites of higher fungi on the whole plant and tubers of potatoes in the field. This study is a prerequisite to their introduction as an environmentally safe treatment against bacterial infection in potatoes. This would be a valuable new treatment given increasing resistance of phytopathogens to pesticides of chemical origin.

REFERENCES

1. Eljounaidi K, Lee SK, Bae H. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects. *Biological Control*. 2016;103:62–68. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.07.013>
2. Boyarkina SV, Omelichkina YuV, Shafikova TN. Generation of hydrogen peroxide in potato plants and potato cell cultures under their infection with *Pectobacterium carotovorum* ssp. *Carotovorum*. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2018;9(1):67–74. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-1-67-74>
3. Van der Wolf JM, Van Beckhoven JRCM, Hukkanen A, Karjalainen R, Muller P. Fate of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, the causal organism of bacterial ring rot in potato, in weeds and field crops. *Journal of Phytopathology*. 2005;153(6): 358–365. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.00985.x>
4. Li X, Tambong J, Yuan KX, Chen W, Xu H, Lévesque CA, et al. Re-classification of *Clavibacter michiganensis* subspecies on the basis of whole-genome and multi-locus sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2018;68(1):234–240. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002492>
5. Van der Wolf JM, Elphinstone JG, Stead DE, Metzler M, Müller P, Hukkanen A, et al. *Epidemiology of Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus in relation to control of bacterial ring rot*. Plant Research International, Wageningen, The Netherlands. 2005. 38 p.
6. Żaczek A, Struś K, Sokołowska A, Parniewski P, Wojtasik A, Dziadek J. Differentiation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* using PCR melting profile and variable number of tandem repeat meth-
- ods. *Letters in Applied Microbiology*. 2019;68(1):24–30. <https://doi.org/10.1111/lam.13081>
7. Boyarkina SV, Omelichkina YuV, Volkova OD, Enikeev AG, Verkhoturov VV, Shafikova TN. Response of nicotiana tabacum on the impact of biotroph *Clavibacter michiganensis* and necrotroph *Pectobacterium carotovorum*. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2016;6(3):42–49. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2016-6-3-42-49>
8. Kirgizova IV, Gajimuradova AM, Omarov RT. Accumulation of antioxidant enzymes in potato plants under the conditions of biotic and abiotic stress. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2018;8(4):42–54. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2018-8-4-42-54>
9. Lin D, Xing B. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*. 2007;150(2):243–250. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.016>
10. Lee W-M, An Y-J, Yoon H, Kweon H-S. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 2008;27(9):1915–1921. <https://doi.org/10.1897/07-481.1>
11. Lee CW, Mahendra S, Zodrow K, Li D, Tsai Y-C, Braam J, et al. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 2010;29(3):669–675. <https://doi.org/10.1002/etc.58>
12. Benn TM, Westerhoff P. Nanoparticle silver

released into water from commercially available sock fabrics. *Environmental Science & Technology*. 2008;42(11):4133–4139. <https://doi.org/10.1021/es7032718>

13. Tsivileva OM, Perfilova AI. Selenium compounds biotransformed by mushrooms: not only dietary sources, but also toxicity mediators. *Current Nutrition & Food Science*. 2017;13(2):82–96. <https://doi.org/10.2174/1573401313666170117144547>

14. Romanenko AS, Riffel AA, Graskova IA, Rachenko MA. The role of extracellular pH-homeostasis in potato resistance to ring rot pathogen. *Journal of Phytopathology*. 1999;147(11-12):679–686. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.1999.00450.x>

15. Omelichkina YuV, Boyarkina SV, Shafikova TN. Effector-activated immune responses in potato and tobacco cell cultures caused by phytopathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. *Fiziologiya rastenii*. 2017;64(3):204–212. (In Russian). <https://doi.org/10.7868/S0015330317020099>

16. Tsivileva OM, Perfilova AI, Ivanova AA, Pavlova AG. Biopolymeric composites of fungal origin against the bacterial phytopathogen. *Biomics*. 2018;10(2):210–213. (In Russian). <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2018-30>

17. Avetisyan LR, Shaginyan IA, Chernukha MYu. The basic mechanisms of the formation of epidemically significant nosocomial bacterial clones. *Uspekhi Sovremennoi Biologii*. 2016;136(1):41–52. (In Russian)

18. Akintokun AK, Ojesola CO, Akintokun PO, Oloyede AR. Antagonistic effect of *Bacillus thuringiensis* for the control of bacterial wilt of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Nigerian Journal of Biotechnology*. 2019;36(1):94–102. <https://doi.org/10.4314/njb.v36i1.13>

19. Eliseeva OV, Eliseev AF. Some microelements content in overground parts of radish (*Raphanus sativus* L.). *Izvestiya Timiryazevskoi sel'skokozyajstvennoi akademii = Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 2011;2:56–68. (In Russian).

20. Sabo VA, Knezevic P. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. plant extracts and essential oils: A review. *Industrial Crops and Products*. 2019;132:413–429. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.051>

21. Eichenlaub R, Gartemann KH. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 2011;49:445–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095258>

22. Tsivileva OM, Nguyen TP, Vu LN, Chernyshova MP, Yurasov NA, Petrov AN, et al. Lipidic components of pigmented and submerged mycelium of *Ganoderma* from different climatic zones. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied*

Chemistry and Biotechnology. 2015;3:37–47. (In Russian).

23. Liang C, Tian D, Liu Y, Li H, Zhu J, Li M, et al. Review of the molecular mechanisms of *Ganoderma lucidum* triterpenoids: Ganoderic acids A, C2, D, F, DM, X and Y. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;174:130–141. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.04.039>

24. Ikon GM, Udobre EA, Etang UE, Ekanemesang UM, Ebana RU, Edet UO. Phytochemical screening, proximate composition and antibacterial activity of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* collected from Etim Ekpo in Akwa Ibom state, Nigeria. *Asian Food Science Journal*. 2019;6(2):1–10. <https://doi.org/10.9734/AFSJ/2019/45956>

25. Younis AM, Yosri M, Stewart JK. *In vitro* evaluation of pleiotropic properties of wild mushroom *Laetiporus sulphureus*. *Annals of Agricultural Sciences*. 2019;64(1):79–87. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2019.05.001>

26. Matute RG, Serra A, Figlas D, Curvetto N. Copper and zinc bioaccumulation and bioavailability of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Medicinal Food*. 2011;14(1):1273–1279. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0206>

27. Glukhova LB, Frank YA, Danilova EV, Avakyan MR, Banks D, Tuovinen OH, et al. Isolation, characterization, and metal response of novel, acid-tolerant *Penicillium* spp. from extremely metal-rich waters at a mining site in Transbaikal (Siberia, Russia). *Microbial Ecology*. 2018;76(4):911–924. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1186-0>

28. Čilerdžić J, Galić M, Vukojević J, Stajic M. *Pleurotus ostreatus* and *Laetiporus sulphureus* (Agaricomycetes): possible agents against Alzheimer and Parkinson diseases. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2019;21(3):275–289. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2019030136>

29. Xia X-J, Zhou Y-H, Shi K, Zhou J, Foyer CH, Yu J-Q. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66(10):2839–2856. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv089>

30. Milanović J, Oklestkova J, Novák O, Mihaljević S. Effects of potato spindle tuber viroid infection on phytohormone and antioxidant responses in symptomless *Solanum laxum* plants. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2019;38(1):325–332. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9842-7>

31. Efimova MV, Kolomeichuk LV, Boyko EV, Malofii MK, Vidershpan AN, Plyusnin IN, et al. Physiological mechanisms of *Solanum tuberosum* L. plants' tolerance to chloride salinity. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2018;65(3):394–403. <https://doi.org/10.1134/S1021443718030020>

32. Poliksenova VD. Induced plant resistance to pathogens and abiotic stress factors on the

example of the tomato. *Vestnik Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya 2. Khimiya. Biologiya. Geografiya.* 2009;1:48–60. (In Russian)

33. Karasov TL, Chae E, Herman JJ, Bergel-

son J. Mechanisms to mitigate the trade-off between growth and defense. *The Plant Cell.* 2017;29(4):666–680. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00931>

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Eljounaidi K., Lee S.K., Bae H. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects // *Biological Control.* 2016. Vol. 103. P. 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.07.013>

2. Бояркина С.В., Омеличкина Ю.В., Шафикова Т.Н. Генерация пероксида водорода в растениях и культурах клеток картофеля при инфицировании *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.* 2019. Т. 9. N 1. С. 67–74. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-1-67-74>

3. Van der Wolf J.M., Van Beckhoven J.R.C.M., Hukkanen A., Karjalainen R., Muller P. Fate of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, the causal organism of bacterial ring rot in potato, in weeds and field crops // *Journal of Phytopathology.* 2005. Vol. 153. Issue 6. P. 358–365. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.00985.x>

4. Li X., Tambong J., Yuan K.X., Chen W., Xu H., Lévesque C.A., et al. Re-classification of *Clavibacter michiganensis* subspecies on the basis of whole-genome and multi-locus sequence analyses // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2018. Vol. 68. Issue 1. P. 234–240. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002492>

5. Van der Wolf J.M., Elphinstone J.G., Stead D.E., Metzler M., Müller P., Hukkanen A., Karjalainen R. Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot. Plant Research International, Wageningen, The Netherlands. 2005. 38 p.

6. Żaczek A., Struś K., Sokołowska A., Parniewski P., Wojtasik A., Dziadek J. Differentiation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* using PCR melting profile and variable number of tandem repeat methods // *Letters in Applied Microbiology.* 2019. Vol. 68. Issue 1. P. 24–30. <https://doi.org/10.1111/lam.13081>

7. Бояркина С.В., Омеличкина Ю.В., Волкова О.Д., Еникеев А.Г., Верхотуров В.В., Шафикова Т.Н. Ответные реакции растений табака на воздействие биотрофа *Clavibacter michiganensis* и некротрофа *Pectobacterium carotovorum* // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.* 2016. Т. 6. N 3. С. 42–49. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2016-6-3-42-49>

8. Киргизова И.В., Гаджимурадова А.М., Омаров Р.Т. Особенности накопления антиоксидантных ферментов у растений картофеля в условиях биотического и абиотического стрессов // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.* 2018. Т. 8. N 4. С. 42–54. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2018-8-4-42-54>

9. Lin D., Xing B. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth // *Environmental Pollution.* 2007. Vol. 150. Issue 2. P. 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.016>

10. Lee W.-M., An Y.-J., Yoon H., Kweon H.-S. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles // *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal.* 2008. Vol. 27. N 9. P. 1915–1921. <https://doi.org/10.1897/07-481.1>

11. Lee C.W., Mahendra S., Zodrow K., Li D., Tsai Y.-C., Braam J., et al. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana* // *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal.* 2010. Vol. 29. Issue 3. P. 669–675. <https://doi.org/10.1002/etc.58>

12. Benn T.M., Westerhoff P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics // *Environmental Science & Technology.* 2008. Vol. 42. Issue 11. P. 4133–4139. <https://doi.org/10.1021/es7032718>

13. Tsvileva O.M., Perfilova A.I. Selenium compounds biotransformed by mushrooms: not only dietary sources, but also toxicity mediators // *Current Nutrition & Food Science.* 2017. Vol. 13. Issue 2. P. 82–96. <https://doi.org/10.2174/1573401313666170117144547>

14. Romanenko A.S., Riffel A.A., Graskova I.A., Rachenko M.A. The role of extracellular pH-homeostasis in potato resistance to ring rot pathogen // *Journal of Phytopathology.* 1999. Vol. 147. Issue 11-12. P. 679–686. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.1999.00450.x>

15. Омеличкина Ю.В., Бояркина С.В., Шафикова Т.Н. Реакции эффектор-активируемого иммунитета в культурах клеток картофеля и табака при действии фитопатогена *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* // *Физиология растений.* 2017. Т. 64. N 3. С. 204–212. <https://doi.org/10.7868/S0015330317020099>

16. Цивилева О.М., Перфильева А.И., Иванова А.А., Павлова А.Г. Биополимерные композиты грибного происхождения против бактериального фитопатогена // *Биомика.* 2018. Т. 10. N 2. С. 210–213. <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2018-30>

17. Аветисян Л.Р., Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. Основные механизмы формирования эпидемически значимых госпитальных клонов бактерий // *Успехи современной биологии.* 2016. Т. 136. N 1. С. 41–52.

18. Akintokun A.K., Ojesola C.O., Akintokun P.O., Oloyede A.R. Antagonistic effect of *Bacillus thuringiensis* for the control of bacterial wilt of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) // Nigerian Journal of Biotechnology. 2019. Vol. 36. Issue 1. P. 94–102. <https://dx.doi.org/10.4314/njb.v36i1.13>
19. Елисеева О.В., Елисеев А.Ф. Содержание некоторых микроэлементов в вегетативных органах редьки (*Raphanus sativus* L.) // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. ТСХА. 2011. N 2. С. 59–68.
20. Sabo V.A., Knezevic P. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. plant extracts and essential oils: A review // Industrial Crops and Products. 2019. Vol. 132. P. 413–429. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.051>
21. Eichenlaub R., Gartemann K.H. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens // Annual Review of Phytopathology. 2011. Vol. 49. P. 445–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095258>
22. Цивилева О.М., Нгуен Т.Ф., Ву Л.Н., Чернышова М.П., Юрасов Н.А., Петров А.Н. [и др.]. Липидные компоненты пигментированного и глубокого мицелия *Ganoderma* разных климатических зон // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2015. N 3. С. 37–47.
23. Liang C., Tian D., Liu Y., Li H., Zhu J., Li M., et al. Review of the molecular mechanisms of *Ganoderma lucidum* triterpenoids: Ganoderic acids A, C2, D, F, DM, X and Y // European Journal of Medicinal Chemistry. 2019. Vol. 174. P. 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.04.039>
24. Ikon G.M., Udobre E.A., Etang U.E., Ekanemesang U.M., Ebana R.U., Edet U.O. Phytochemical screening, proximate composition and antibacterial activity of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* collected from Etim Ekpo in Akwa Ibom state, Nigeria // Asian Food Science Journal. 2019. Vol. 6. Issue 2. P. 1–10. <https://doi.org/10.9734/AFSJ/2019/45956>
25. Younis A.M., Yosri M., Stewart J.K. *In vitro* evaluation of pleiotropic properties of wild mushroom *Laetiporus sulphureus* // Annals of Agricultural Sciences. 2019. Vol. 64. Issue 1. P. 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2019.05.001>
26. Matute R.G., Serra A., Figlas D., Curvetto N. Copper and zinc bioaccumulation and bioavailability of *Ganoderma lucidum* // Journal of Medicinal Food. 2011. Vol. 14. Issue 10. P. 1273–1279. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0206>
27. Glukhova L.B., Frank Y.A., Danilova E.V., Avakyan M.R., Banks D., Tuovinen O.H., et al. Isolation, characterization, and metal response of novel, acid-tolerant *Penicillium* spp. from extremely metal-rich waters at a mining site in Transbaikal (Siberia, Russia) // Microbial Ecology. 2018. Vol. 76. Issue 4. P. 911–924. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1186-0>
28. Čilerdžić J., Galić M., Vukojević J., Stajic M. *Pleurotus ostreatus* and *Laetiporus sulphureus* (Agaricomycetes): possible agents against Alzheimer and Parkinson diseases // International Journal of Medicinal Mushrooms. 2019. Vol. 21. Issue 3. P. 275–289. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2019030136>
29. Xia X.-J., Zhou Y.-H., Shi K., Zhou J., Foyer C.H., Yu J.-Q. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance // Journal of Experimental Botany. 2015. Vol. 66. Issue 10. P. 2839–2856. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv089>
30. Milanović J., Oklestkova J., Novák O., Mihaljević S. Effects of potato spindle tuber viroid infection on phytohormone and antioxidant responses in symptomless *Solanum laxum* plants // Journal of Plant Growth Regulation. 2019. Vol. 38. Issue 1. P. 325–332. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9842-7>
31. Efimova M.V., Kolomeichuk L.V., Boyko E.V., Malofii M.K., Vidershpan A.N., Plyusnin I.N., et al. Physiological mechanisms of *Solanum tuberosum* L. plants' tolerance to chloride salinity // Russian Journal of Plant Physiology. 2018. Vol. 65. Issue 3. P. 394–403. <https://doi.org/10.1134/S1021443718030020>
32. Поликсенова В.Д. Индуцированная устойчивость растений к патогенам и абиотическим стрессовым факторам (на примере томата) // Вестник Белорусского государственного университета. Серия 2. Химия. Биология. География. 2009. N 1. С. 48–60.
33. Karasov T.L., Chae E., Herman J.J., Bergelson J. Mechanisms to mitigate the trade-off between growth and defense // The Plant Cell. 2017. Vol. 29. Issue 4. P. 666–680. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00931>

Contribution

Olga M. Tsvileva, Alla I. Perfilova, Antonina G. Pavlova carried out the experimental work, on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. Authors have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Кратерии авторства

Цивилева О.М., Перфильева А.И., Павлова А.Г. выполнили экспериментальную работу, на основании полученных результатов провели обобщение и написали рукопись. Авторы имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Conflict of 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.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Olga M. Tsivileva,

Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher,
Institute of Biochemistry and Physiology
of Plants and Microorganisms, RAS,
13, Entuziastov Ave., Saratov, 410049,
Russian Federation,
✉ e-mail: tsivileva@ibppm.ru

Alla I. Perfileva,

Cand. Sci. (Biology), Senior Scientist,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry, Russian Academy
of Sciences, Siberian Branch,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: alla.light@mail.ru

Antonina G. Pavlova,

Student,
Irkutsk State University,
1, K. Marks St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: pavlovaantonina2013@yandex.ru

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Цивилева Ольга Михайловна,

д.б.н., ведущий научный сотрудник,
Институт биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов РАН,
410049, г. Саратов, пр-т Энтузиастов, 13,
Российская Федерация,
✉ e-mail: tsivileva@ibppm.ru

Перфильева Алла Иннокентьевна,

к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии и
биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
Российская Федерация,
e-mail: alla.light@mail.ru

Павлова Антонина Гавриловна,

студент,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
e-mail: pavlovaantonina2013@yandex.ru



Evolution of views on plant immunity: from Flor's "gene-for-gene" theory to the "zig-zag model" developed by Jones and Dangl

© Tatyana N. Shafikova, Yuliya V. Omelichkina

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS,
Irkutsk, Russian Federation

Abstract. The study of plant defence mechanisms in response to pathogens in the mid-20th century resulted in Harold Flor's gene-for-gene interaction hypothesis, which became recognised as central to the study of phytoimmunity. According to this theory, the outcome of interactions in plant – pathogen phytopathosystems – i.e. compatibility or incompatibility – is controlled genetically in interacting organisms and determined by the presence of specific genes in both pathogen and plant: resistance genes in the plant and avirulence genes in pathogen. The latest achievements in phytoimmunology, obtained with the help of modern molecular biology and bioinformatics methods, have made a significant contribution to the classical understanding of plant immunity and provided grounds for a modern concept of phytoimmunity consisting in the "zig-zag model" developed by Jonathan Jones and Jefferey Dangl. Plant immunity is currently understood as being determined by an innate multi-layer immune system involving various structures and mechanisms of specific and non-specific immunity. Recognition by plant membrane receptors of conservative molecular patterns associated with microorganisms, as well as molecules produced during cell wall disruption by pathogen hydrolytic enzymes forms a basic non-specific immune response in the plant. Detection of pathogen effector molecules by plant intra-cellular receptors triggers a specific effector-triggered immunity, resulting in the development of the hypersensitive response, systemic resistance and immune memory of the plant. Virulence factors and pathogen attack strategies on the one hand, and mechanisms of plant immune protection on the other, are the result of one form of constant co-evolution, often termed an "evolutionary arms race". This paper discusses the main principles of Flor's classical "gene-for-gene interaction" theory as well as the molecular-genetic processes of plant innate immunity, their mechanisms and participants in light of contemporary achievements in phytoimmunology.

Keywords: plant innate immunity; molecular patterns; effectors; receptors; pattern-triggered immunity; effector-triggered immunity

Information about the article: Received October 21, 2019; accepted for publication August 31, 2020; available online September 30, 2020.

For citation: Shafikova TN, Omelichkina YuV. Evolution of views on plant immunity: from Flor's "gene-for-gene" theory to the "zig-zag model" developed by Jones and Dangl. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):424–438. (In English) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-424-438>

УДК 581.1

Эволюция взглядов на иммунитет растений: от закона Н.Н. Флор «ген-на-ген» до «зигзаг модели» J. Jones и J. Dangl

Т.Н. Шафикова, Ю.В. Омеличкина

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск, Российская Федерация

Резюме: Изучение защитных механизмов растения в ответ на воздействие патогена привело к созданию в середине прошлого века концепции «ген-на-ген взаимодействия» (Н.Н. Флор), которая на сегодняшний день признана классической теорией фитоиммунитета. Согласно данной теории, исход взаимоотношений в фитопатосистеме «растение – патоген» – совместимость или несовместимость, находится под генетическим контролем взаимодействующих организмов и определяется наличием специфических генов патогена и растения-хозяина. Достижения последних лет в области фитоиммунологии, полученные благодаря новейшим методам молекулярной биологии и

биоинформатики, существенно дополнили и углубили классические взгляды на иммунитет растений и обосновали современную концепцию фитоиммунитета «зигзаг модель» (J. Jones и J. Dangl). Согласно современным воззрениям, защита растительного организма от воздействий патогена определяется функционированием многоуровневой врожденной иммунной системы с участием различных структур и механизмов специфического и неспецифического врожденного иммунитета. Распознавание мембранными растительными рецепторами консервативных молекулярных паттернов, ассоциированных с микроорганизмами, а также молекул, возникающих вследствие атаки гидролитическими ферментами патогена клеточных стенок хозяина, определяет базовый неспецифический иммунитет растения. Детекция эффекторных молекул патогена внутриклеточными рецепторами растения запускает специфический эффектор-индуцируемый иммунитет, включающий развитие реакции сверхчувствительности, системной устойчивости и иммунной памяти растения. Факторы вирулентности и стратегии нападения патогенов, с одной стороны, и участники, и механизмы иммунной системы растений, с другой, являются результатом постоянного совместного эволюционирования, что напоминает «гонку вооружения и обороны» между противоборствующими сторонами. В статье обсуждаются молекулярно-генетические процессы врожденного иммунитета растений, их механизм и участники в свете современных достижений фитоиммунологии.

Ключевые слова: врожденный иммунитет растений, молекулярные паттерны, эффекторы, рецепторы, паттерн-активируемый иммунитет, эффектор-индуцируемый иммунитет

Информация о статье: Дата поступления 21 октября 2019 г.; дата принятия к печати 31 августа 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2020 г.

Для цитирования: Шафикова Т.Н., Омеличкина Ю.В. Эволюция взглядов на иммунитет растений: от закона Н.Н. Флор «ген-на-ген» до «зигзаг модели» J. Jones и J. Dangl. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 3. С. 424–438. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-424-438>

INTRODUCTION

In natural habitats, plants have to co-exist with a large variety of microorganisms, many of which are pathogenic. In order to survive, a plant must quickly recognise a pathogen and activate relevant defence mechanisms. Together, these myriad defences activated following microbiological attack constitute an integrated plant immune system – phytoimmunity.

In the middle of the 20th century Harold Flor advanced the “gene-for-gene interaction” hypothesis, which postulated that the outcome of host-pathogen interactions in a phytopathosystem – i.e. in terms of compatibility or incompatibility – falls under the genetic control of interacting organisms and determined by the presence of specific genes in both parasite and plant [1]. A more thorough understanding of the molecular-genetic mechanisms of plant immunity has only recently become possible due to the introduction of innovative methods of molecular biology and bioinformatics into phytoimmunology. The modern science of plant resistance represents many of the classical concepts of Flor’s theory, while at the same time introducing new concepts and broadening the scope of phytoimmunology following the successes of more recent studies. The key immunological achievements of the late 20th – early 21st century include Charles Janeway’s Pattern Recognition Principle, describing innate recognition by multicellular organisms of conservative structures (patterns) associated with microorganisms [2]. Innate recognition is based on detection by membrane receptors of “alien” molecular structures, which are inherent to microorganisms, but are

absent from the host plant. These receptors, known as Pattern-Recognising Receptors (PRRs), have been found in all multicellular organisms from invertebrates (sponges, insects) and plants through to mammals (mice, humans) [3]. Thus, C. Janeway’s principle of pattern recognition is universal and characteristic of innate immunity in all multicellular organisms. The molecules recognised by PRR are invariant and conservative for each class of microorganisms and are denoted in respect to their origin either as Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP) or Damage-Associated Molecular Patterns (DAMP). Their detection results in the activation of a series of basic, non-specific plant defence responses (Pattern-Triggered Immunity – PTI): generation of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO), synthesis of phytoalexins, lignification of cell walls and callose deposition, as well as a number of other mechanisms [4].

The evolution of pathogens in response to basic immune defences resulted in the emergence of protein effectors (products of avirulence genes – *Avr*-genes), as well as systems for facilitating their transport directly into the cell; via Type III secretion systems acting through the “molecular syringe” principle, the effectors are delivered to the cytoplasm, bypassing the cell wall and membrane in order to block PTI development. The evolution of plants, in its turn, gave way to the emergence of intracellular or cytoplasmic Nucleotide Binding Domain Leucine-Rich Repeat Domain-containing Receptors (NLRs) [5] (products of resistance genes – *R*-genes), which detect specific protein effectors,

directly or indirectly, allowing for the induction of Effector-Triggered Immunity (ETI). In ETI “gene-for-gene” interaction is implemented; a specific protein effector correlates with an R-gene product – a complementary NLR. Modern concepts of plant immunity are summarised in the “zig-zag” model proposed in 2006 by Jonathan Jones and Jeffery Dangl [6]. This model, as an addition to Harold Flor's classical “gene-for-gene” theory, puts together multi-level plant immunity responses of differing specificity and amplitude and highlights continuous evolutionary adaptation of partners in the course of plant-microbial interactions.

CLASSICAL THEORY OF PHYTOIMMUNITY

The study of plant defence mechanisms in response to pathogens in the middle of the 20th century resulted in the formation of phytoimmunity theory, which has been recognised as central to the study of plant immunity. According to this theory, the outcome of interactions in phytopathosystems is under genetic control [7]. This means that during co-evolution, the host plant and its parasite develop complementary gene pairs: resistance (*R*) gene in the plant and avirulence (*Avr*) gene in the parasite. The study of these genes in flax rust prompted American phytopathologist Harold Flor to develop the aforementioned “gene-for-gene” concept. He found that the linen plant's (*Linum usitatissimum* L.) resistance to pathogen *Melampsora lini* is a consequence of the interaction of specific host and pathogen genes and arises only in the presence of a dominant *R*-gene allele in the plant and a dominant *Avr*-gene allele in the pathogen. All other combinations of these genes, for instance loss or alteration of the respective gene by one of the partners, do not prevent the development of the disease [8]. This type of resistance is monogenetically controlled, with the pathogen and its host typically possessing the same geographical centers of origin and evolving in parallel. The “gene-for-gene” theory informed the prominent Russian botanist Nikolai Vavilov's studies into the conjugated evolution of plant and parasite in their joint habitat [9]. The most frequently cited biochemical explanation of “gene-for-gene” theory is advanced by Peter Albersheim, who proposed that dominant alleles of resistance genes control synthesis of receptor proteins on the cell wall or membrane of host plants, whereas dominant alleles of avirulence genes code for the synthesis of glycosyltransferase enzymes, which produce hydrocarbon chains or elicitors on the surface of the pathogen cell wall [10]. Four types of factors were described in the “gene-for-gene” theory: 1) avirulence genes and their products (elicitors) 2) resistance genes and their products (receptors) 3) signal transducers carrying the information to the genome; 4) immune response genes and their products (PR-proteins, phytoalexins, lignin, etc.). The former two groups are specific; the latter ones are

non-specific [1]. Thus, in compliance with the classical view of plant immunity, the interaction of products of *R*- and *Avr*-genes, receptors and elicitors, results in the development of the hypersensitive response (HR) and determines plant resistance to the pathogen. Flor's classical theory of “gene-for-gene interaction” illustrates the *Pseudomonas syringae* – tomato (*Solanum lycopersicum* L.) phytopathosystem. The *Avr*-gene of pathogen *P. syringae* is the *AvrPtoB* gene; the *R*-gene of the tomato plant is the *Pto* gene. Plant species with a dominant *R*-gene are resistant to pathogen strains with a dominant *Avr*-gene; when the *Avr/R* pair interacts, the hypersensitive response develops, and the host and pathogen are incompatible. Should any component of the *Avr/R* pair be absent or altered, they become compatible and the disease develops [11].

MODERN CONCEPT OF PLANT INNATE IMMUNITY

The application of innovative methods of molecular biology and genetics, which in many respects predicted success in recent studies of phytoimmunology, made a significant contribution to our understanding of defence mechanisms, thus supporting the modern concept of plant immunity. According to this concept, plant immunity is the result of a multi-layer innate immune system having various structures and mechanisms of both specific and non-specific immunity.

When plant and microorganism interact, the latter needs to first overcome the plant's constitutive defences, such as a powerful wax layer and rigid cell wall, as well as defence compounds including cuticular lipids, antimicrobial enzymes and secondary metabolites [12]. The next barrier in the way of a pathogen is the plant's innate immunity system; to overcome it, the pathogen has to either avoid recognition by the plant or suppress the defence response of the host. In order to recognise pathogens and their metabolites, plants use a conservative method, which is found in animal organisms as well – membrane receptors. Receptors detect specific molecular ligands, which are conservative and characteristic of pathogens, but are alien to plants. These molecules, as mentioned above, were identified for the first time by Charles Janeway and termed Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) [13]. In reality, PAMPs are inherent to all microorganisms, regardless of their pathogenicity, thus the term MAMP (Microbial-Associated Molecular Pattern) is often used interchangeably [14]. Plants are also capable of detecting fragments formed through damage by microbial lysis of such plant structures as the cuticle or cell wall. Such products fall within the Damage Associated Molecular Pattern (DAMP) classification [15]. Detection of molecular patterns – PAMP and DAMP – is performed by Pattern Recognition Receptors (PRRs), which trigger immune signaling.

This process results in the activation of a number of defence responses leading to the prevention of disease progression. This immunity mechanism, known as Pattern-Triggered Immunity (PTI) [6, 16] presents the first level of plant innate immunity. virulent pathogen strains can suppress defence responses elicited by PRRs via the triggering of effectors, which act as virulence factors for susceptible hosts [17]. Subsequently, detection of these effectors forms the second level of innate phytoimmunity – Effector-Triggered Immunity (ETI) [6].

Basic, non-specific resistance is conferred through PTI (the first level of resistance), while the second level, ETI, induces immunity characterised by the development of the hypersensitive reaction and resulting in systemic resistance. The development of systemic resistance provides long-term protection against a wide variety of pathogens [18]. Plants may also utilise trans-generational immune memory; that is, stress caused by disease acting on one generation could bring about effective adaptation of the next generation to the same stress [19].

Pattern-Triggered Immunity – PTI

Microbial patterns or PAMPs are conservative molecular structures, which are characteristic of practically all classes of microorganism, regardless of their pathogenicity. In addition to pathogens, symbionts and endophytes also display PAMPs, resulting in an initial recognition as “alien” by the plant, which subsequently triggers an innate immune response [4, 6]. Findings suggest that the presence of both human and plant enterobacteria pathogens can activate the non-specific immune response in plants. Based on these data the authors presume that such atypical plant microorganisms have PAMPs that can be recognised by plants [20, 21]. Distinct groups of microorganisms exhibit different PAMPs: flagellin and elongation factor are found in bacteria, chitin in fungi and virulence factor NSP (Nuclear Shuttle Protein) in viruses [22-24].

PRR receptors, which specifically recognise PAMPs, include Receptor-Like Kinases (RLKs) and Receptor-Like Proteins (RLPs). RLKs are transmembrane receptors containing an Extracellular Domain (ECD), transmembrane domain and intracellular serine/threonine kinase domain. The extra-cellular domains are highly variable, providing the means to recognise a wide range of PAMPs including lipopolysaccharides, peptides and polysaccharides. The transmembrane sector is characterised by an α -spiral fragment, which permeates the membrane only once. The cytoplasmic domain formed by the C-terminal sector contains a kinase fragment, where the residues of serine and threonine are auto-phosphorylated with the formation of a dimer complex following receptor activation by a ligand. Plants have a large number of RLKs. For example, in *Arabidopsis*, there are more than 410, and more than 640 in rice [25]. Plant RLKs are structurally similar to

animal Receptor-Tyrosine Kinases (RTKs) [26].

RLP receptors contain only extracellular and transmembrane domains. Since they lack an intracellular activation domain, they need to interact with adaptor molecules to transfer the signal. RLPs are close in structure to Toll-Like Receptors (TLR), which recognise MAMPs in animal cells [27]. Animal TLRs, with the help of adaptor proteins, activate IRAK (Interleukin-1 Receptor Associated Kinase) or RIP (Receptor-Interacting Protein), which trigger the expression of antimicrobial defence molecules [28]. These kinases, which belong to the same class of non-RD kinases as plant kinases, are linked to innate immune reactions in representatives of both kingdoms [29]. The number of RLPs in plants is much lower than RLKs – in *Arabidopsis* there are about 170, while in rice the equivalent figure is 90 [25].

RLPs and RLKs can be classified into different subfamilies according to domains or motifs in their ECDs. The N-terminal domain of Leucine-Rich Repeats (LRRs) is mainly involved in the recognition of proteins and peptides found in bacteria and viruses.

Currently, a large number of pathogenic molecular patterns and corresponding receptors are known, but three ligand-receptor pairs are characterised in detail. The investigation into pattern-recognising receptors began with the discovery of the Xa21 protein, which was found in rice (*Oryza sativa* L.) and the respective molecular pattern of bacterial phytopathogen *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (Xoo). This receptor specifically binds to Ax21, a sulphated 17-amino-acid peptide of the N-sector of proteins secreted by a given pathogen [30]. A well-known pair is receptor FLS2 (Flagellin-Sensitive 2) which is found in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., tomato (*S. lycopersicum*) and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and interacts with the 22-amino-acid peptide of the N-terminal segment of flagellin – flg22 [23]. Another well studied pair of PRR-MAMPs is EFR (EF-Tu Receptor) and prokaryotic elongation factor EF-Tu. The epitope of this molecular pattern is formed by the first 18 amino-acids of the N-terminal (elf18) [31].

The lysine domain (LysM) is present in receptors that recognise bacterial peptidoglycan and fungal chitin [16]. An example of a kinase that participates in the recognition of fungal ligands is *Arabidopsis* CERK1 (Chitin Elicitor Receptor Kinase 1) with three extracellular LysM domains [32], LYP4 and rice LYP6 [33].

The Lectin RLK family includes receptors with a lectin domain, the presence of which allows recognition of bacterial lipopolysaccharides [34]. Another family of PRRs is represented by receptors containing the Epidermal Growth Factor (EGF) -like domain, whose presence determines the detection of oligogalacturonides [35].

Besides PAMPs, DAMPs – damage associated molecular patterns – may also signal the attack of a

pathogen. They include oligogalacturonides formed as a result of the influence of pectolytic enzymes of phytopathogens on pectin in the plant cell wall. Destruction of plant cell walls by microbial enzymes results in the formation of oligomers with a specific and constant structure [36]. DAMPs are detected by membrane receptor kinases and interact with the plant cell wall – WAK (Wall Associated Kinases) [37]. Kinases in this family were shown to determine the integrity of oligogalacturonides produced from plant cell walls and in the case of their integrity distortion are able to activate signal cascades and the transcription of resistance genes [35].

Association of receptor and ligand is known to cause changes in the conformation of receptor molecules, which fosters enhancement of affinity between receptor molecules. As receptor kinases laterally diffuse along the membrane, they quickly and readily form dimer complexes, and in some cases, form complexes with co-receptors. At the expense of the approximation of two receptors, kinase centers are activated, and receptor molecules begin to phosphorylate each other using serine and threonine residues in the area of the kinase center. Phosphorylation results in the formation of the active site – a platform serving to interact with further components of the signal chain. Thus, in the course of interaction, the flg22:FLS2 kinase domain of the FLS2 receptor is quickly phosphorylated when stimulated by the flg22 peptide and phosphorylated FLS2 is immediately dimerised with BAK1 kinase (Brassinosteroid Intensive 1 (BRI1)-Associated Kinase – BAK1) [38]. The crystal structure of the FLS2 ectodomain was determined in combination with flg22 and BAK1: the FLS2 ectodomain was found to have 28 LRR; binding to flg22 occurs in LRR3-16, and with BAK1 in the region of LRR23-26 [39]. It should be noted that BAK1 kinase participates in the perception of signals and the regulation of many other PRRs, as well as playing an important role in the regulation of the plant immune response. The phosphorylation of kinase BAK1 has been shown to occur in different amino acid residues [40]. The importance of BAK1 is reinforced by the fact that often this kinase acts as a target for some pathogen effectors, for example, AvrPto and AvrPtoB [41]. Following BAK1 inhibition via these effectors, pattern-triggered immunity is suppressed.

To further transduce the signal, another important component of the PRR complex is activated – Receptor-Like Cytoplasmic Kinase (RLCK) BIK1 (Botrytis-Induced Kinase 1). Mutual trans-phosphorylation of kinase domains BIK1 and FLS2/BAK1, which takes place within 30–60s of signal perception, results in conformational changes; in the long run, phosphorylated BIK1 is released to activate further signal components [42]. Moreover, BIK1 has been shown to trigger a cascade of reactions from several receptor

complexes. Along with FLS2 / BAK1, BIK1 receives the signal from EFR and CERK1 [43].

In *Arabidopsis*, BIK1 induces two synchronous cascades of activation in mitogen activated protein-kinases, which contain MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 and MEKK1/MKK1/MKK2-MPK4 [44, 45]. These cascades induce the activation of transcription factors in the WRKY family [46]. WRKY family proteins have a DNA-associating domain of about 60 amino-acids and a conservative region WRKYGQK with a unique zinc-finger domain, with residues of cysteine and histidine. The presence of a DNA-associating domain allows these WRKY trans-factors to interact with cis-elements of the W-box (TTGACC/T motif), which is present in the promoter of defence reaction genes [47]. WRKY transcription factors are involved in the activation of the expression of RBOH-NADPH oxidase providing an oxidative burst in *Nicotiana benthamiana* [48]. Transcription factors, which are under control of WRKY family genes, are found in many plants. They participate in the formation of reactions providing resistance to biotic [49] and abiotic stressors, low temperatures and dehydration in particular [50, 51].

Signal transduction following pathogen stress activates the following defence mechanisms: change in calcium ion concentration, ROS and NO production, expression of defence enzyme genes and production of antimicrobial molecules, such as phytoalexins. At the same time, as part of PTI development, the biosynthesis of Salicylic Acid (SA) or Jasmonic Acid (JAC) and ethylene can be triggered, depending on the type of nutrition and the attack strategies of the pathogen [52].

It should be noted that the mechanism of the first non-specific level of innate immunity accounts for the development in plants of a response to the presence of symbionts and endophytes, as these microorganisms also possess PAMPs/MAMPs.

Recent studies in the field of plant immunity highlight the important role of Post-Translational Modifications of proteins (PTMs) in the processes of rapid cell reprogramming and the regulation of defence responses to the perception of PAMPs [53]. The activity of kinases BAK1 and BIK1 decreases following the action of phosphatases PP2A and PP2C38, which leads to a decrease in the intensity of ROS production [54, 55]. In addition, the activity of kinase complexes in the perception of PAMPs and signal transmission can be regulated with E3 ubiquitin ligases. It is assumed that ubiquitination of receptor kinases is necessary with a prolonged PAMP stimulus to “restart” the cell signaling [56, 57].

Effector-Triggered Immunity – ETI

The second level of plant protection is specific effector-triggered immunity (ETI), which corresponds to the classical theory of “gene-for-gene interaction”. This immunity is conferred through the activity of plant R-proteins, which

recognise a number of pathogen effectors (Avr-proteins) and activate the hypersensitive response, which is fundamentally different from defence reactions in PTI [6, 58].

During evolution, plant pathogens, in their attempts to suppress the immunity of host plant, developed the ability to secrete specific protein molecules – effectors – which are transported directly to the cell through a universal Type 3 Secretion System (TTSS). Effectors of one pathogen are numerous and, presumably, functionally interchangeable. The effectors' target is most often plant kinases, which participate in the perception of molecular patterns and/or signal transfer. Thus, in *Pseudomonas syringae*, effectors AvrPto and AvrPtoB were detected, each targeting the FLS2–BAK1 complex, whose function is described above [59]. Another studied effector, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 – tyrosine phosphatase HopAO1, acts in plant cells on the kinase domains of FLS2 and EFR, suppressing the development of PTI [60]. It was experimentally established that the activity of effectors may be directed at receptor-like kinases containing a lysine motif (LysM-RK), thus, two tomato kinases – Bti-9 and SILyk1 – are targets for the AvrPtoB effector [61]. Effectors may also target other defence mechanisms in the plant – the effector Pep1 was shown to exert an effect on apoplastic peroxidase in maize plants, reducing the generation of ROS [62].

Effectors (Avr-gene products) are recognised by receptors (products of *R*-genes), which are intracellular nucleotide binding domain leucine-rich repeat domain-containing receptors (NLRs) [5]. Their structure is similar to that of Nod-like receptors in mammals [63] recognising microbial molecular patterns. Both receptors, plant and animal, are intracellular proteins containing central nucleotide-associating domains involved in activation and multimerisation, as well as LRR domains [16]. The group of scientists headed by Y. Kadota demonstrated that R-proteins of mammalian Nod-like receptors and plant NLRs, along with structural similarity, perform analogous functions. It was also established that the stability of these receptors, both in plants and in animals, is regulated by a chaperone complex containing HSP90 (Heat Shock Protein 90) and SGT1 (Suppressor of G-Two Allele of Skp1) [64]. Both NLRs in plants and in animals are classified in accordance with the architecture of the N-terminal domain. Two major classes of cytoplasmic NLRs are described: CC-type NLRs (CNLs) contain coiled coil motifs and TIR-type NLRs (TNLs) possess N-terminal homology with the intracellular TIR-domain. Homology between the TIR in plant protein receptors and Toll proteins in *Drosophila* and IL-1R (receptor of interleukin-1) in mammals allows the presumption of a universal execution of mechanisms and immune signal transmission pathways for all multicellular

organisms. This is one more in a number of pieces of evidence proving the existence of homologous structures and mechanisms in animals and plants, thereby confirming the conservative nature and significance of these processes in the immunity of all organisms.

In plants, effectors may be “recognised” via immediate association with NLRs or indirectly, via adaptor proteins. Such indirect recognition is accounted for by the guard hypothesis, which holds that NLRs are associated with adaptor-proteins acting as targets for microbial effectors. Interaction of effector with adaptor-protein modifies the latter, and as a result is recognised by an R-protein, which in its turn induces the activation of ETI defence reactions [65]. In *Arabidopsis*, the ETI activation system was explored, which confirmed the guard hypothesis. Effectors AvrRpt2, AvrRpm1 and AvrB, products of relevant Avr-genes of bacteria *P. syringae* pv. *tomato* and *P. syringae* pv. *maculicola*, modify target protein RIN4 (RPM1-Interacting Protein4) in *Arabidopsis*. AvrRpm1 and AvrB modify RIN4 via phosphorylation, and AvrRpt2 via proteolysis. Conformation of the RIN4 protein is checked by receptor proteins RPS2 (Resistance to *Pseudomonas Syringae* 2) and RPM1 (Resistance to *Pseudomonas Syringae* pv. *Maculicola* 1) – products of respective *R*-genes. Therefore, phosphorylation and proteolysis of adaptor proteins, respectively, defines their recognition by receptors and activates RPM1- and RPS2-dependent immunity in ETI [66].

Within the framework of the “guard” hypothesis another scenario is probable – the so-called “decoy” model – whereby a mediator protein acts not as a target for a pathogen effector, but only as its structural analogue, which competes for association with the effector [67]. This situation is illustrated with the Prf protein, intracellular receptor of tomato plants of NLRs type, which forms a complex with mediator protein kinase Pto. Pto kinase has a structural analogy with kinase domains FLS2 and CERK1, which act as targets for AvrPto and AvrPtoB [68].

In addition to this, there is one more model of interaction between effectors and specific receptors activating ETI – the “bait-and-switch” model. NLRs may associate effectors only after they have formed a complex with a mediator protein. This may be accompanied by dramatic enhancement of the affinity of the “plant mediator protein /effector to R-protein” complex [69].

The mechanisms of further signal transfer conveyed by NLRs have not been completely studied, but the following signal transduction model is proposed: activated NLRs move to the nucleus and immediately interact with transcription factors to trigger the expression of defence genes – NLRs such as tobacco N-protein, barley MLA10 protein (*Hordeum vulgare* L.) and protein RPS4 *Arabidopsis*

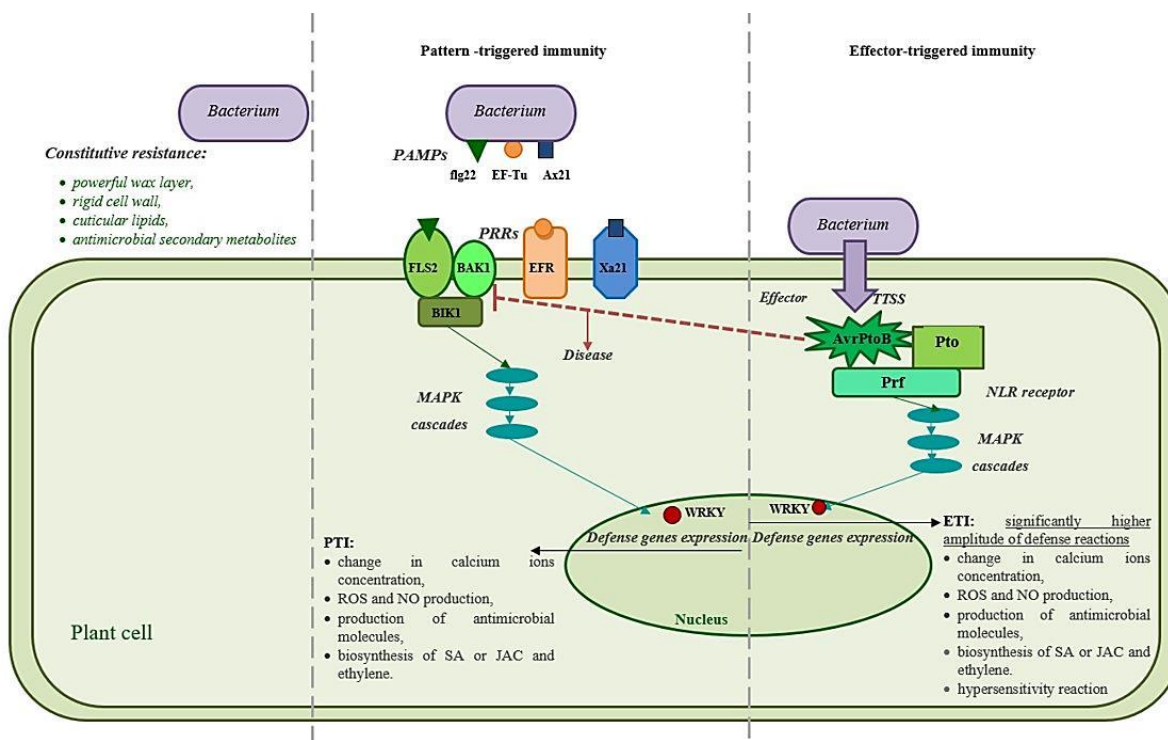
are synthesised in the cell cytoplasm, but in order to function and activate plant defence genes, they need to accumulate in the nucleus [70, 71].

Following NLR activation, effector-activated immunity reactions partially correspond with the reactions of non-specific immunity, including the activation of subsequent MAPK cascades and WRKY transcription factors. This stage of signal transduction can also be a target for effectors; for example, the bacterial effector PopP2 is capable of acetylating certain transcription factors of WRKY, which disrupts their ability to bind to promoters of defence genes [72]. During normal activation of WRKY factors, further molecular events occur, such as a change in ion streams, ROS and NO accumulation in addition to the activation of a transcription of the group of genes that produce PR proteins, for biosynthesis of salicylic and jasmonic acids, as well as ethylene, resulting in the activation of the hypersensitive response and development of systemic resistance [73]. It is important to note that the intensity of analogous molecular events in PTI and ETI differs considerably [74]. Effector-triggered immunity is characterised by a significantly higher amplitude in the development of immune response defence reactions, which, according to some researchers, proves that quantitative differences are more significant for hypersensitive response induction than qualitative differences [6].

The “Zig-zag model” proposed by Jones and Dangl in 2006 reflects a continuous process of improvement in pathogen “attack” strategies and the mechanisms of the plant immune response as a result of evolutionary adaptation during plant-microbe interactions. The model was put forward as an illustration of evolution in the relations within the “*P. syringae* – tomato plant” phytopathosystem (Picture). Perception of bacterial molecular patterns (in this case – flg22) is carried out by a pattern-recognising receptor (FLS2), which is accompanied by its interaction with BAK1 kinase and brings about the development of non-specific pattern-triggered immunity (PTI). In the course of joint evolution, the phytopathogen acquires the ability to secrete effectors into plant cells (in the case of *P. syringae* – AvrPtoB). An important role in this process is played by the type-3 secretion system, which ensures effectors are delivered directly into the cytoplasm, bypassing the cell wall and membrane. It may be assumed that the emergence in pathogens of such a system is conditioned by the necessity to transport effectors directly into the cell to suppress pattern-triggered immunity.

As mentioned above, the AvrPtoB effector is targeted at FLS2–BAK1 complex, which leads to the suppression of pattern-triggered immunity and fosters disease development. In the course of further co-evolution the necessity to survive resulted in emergence in plants of effector detection

“Zig-zag model” of innate immunity system



Evolution in the relations plant-microbe interactions within phytopathosystem
 “*P. syringae* – tomato plant”

Эволюция растительно-микробных взаимоотношений в фитопатосистеме
 «*P. syringae* – растение томата»

systems. Emergence in plants of *R*-genes, whose products are able to recognise the effector and activate defence reactions results in a second specific level of immunity. Resistant tomato plants possessing the product of *R*-genes (Prf kinase) recognise bacterial effectors with the help of an intermediate (Fen kinase) to induce enhanced protection (ETI). To counteract this, *P. syringae* acquires new functions in AvrPtoB, at the expense of developing the E3 ligase domain, which marks Fen for degrading, again resulting in the development of disease. In turn, tomato plants generate a new intermediate protein – Pto kinase – which is resistant to degradation and triggers ETI inducing the hypersensitive response.

It should be noted that long-term joint evolution of plant and pathogen resulted in the development of diverse alternative interaction strategies in both parties. As mentioned above, bacteria are characterised by large effector sets, while plants have “side tracks” both on the level of detection (Fen kinase and Pto kinase), and on the level of signal transduction. The WRKY domain in the NLR RRS1 (Resistance to *Ralstonia Solanacearum* 1) was shown to be acetylated by the bacterial effector Pop2P, along with the WRKY transcription factors. The authors of the study suggested that during evolution, the WRKY domain was inserted into the protein RRS1 as “bait” for recognising effector activity and subsequently inducing ETI [75].

CONCLUSION

The analysis of contemporary scientific publications in this area, which presents and discusses diverse molecular-genetic aspects of plant immunity taking into account evolution processes, allowed the authors to infer the following. Successful colonisation of plants requires the pathogen, after overcoming the constitutive barriers, to combat the two-layer innate immunity of the plant. The first level is non-specific innate immunity (PTI), based on recognition of PAMPs/DAMPs using PRR. Patterns of plant immune response formed as a result of plant cell wall attack by hydrolytic enzymes of the pathogen. PAMPs are invariant and conservative for a given class of microbes and their changes in the course of evolution seem unlikely as the vast majority are structural elements of the organisms (cell walls, flagella). Therefore, PAMP modifications in the course of evolution may negatively affect pathogen survivability. However, a

small number of changes which do not disturb cell structure do exist, giving the pathogen a chance to avoid recognition by the plant via PAMPs.

An important evolutionary acquisition in pathogen strategy is the development of effectors. In order to suppress PRR-mediated defence reactions and PTI some pathogens developed the ability to synthesise effectors and deliver them directly to the plant cell cytoplasm via Type III secretion. Significant modifications of effectors or elimination of one or even several of them will pose no threat to the vital functions of the microbe, as it synthesises a large number of effectors, which are functionally interchangeable and often derived from older effectors

Plants, through the course of their own evolution, developed the ability to detect pathogen effector proteins (or effector-induced changes in the structure/function of their own proteins) via cytoplasmic receptors, triggering effector-activated specific resistance – ETI – which is the second level of innate immunity characterised by faster and more intense defence reactions to pathogens, as well as development of the hypersensitive response, systemic resistance and immune memory.

The above discussion prompts the conclusion that pathogen virulence factors and plant resistance mechanisms have confronted each other throughout their evolution and are being constantly improved as a result: enhancement of plant resistance to pathogens is a result of pathogens successfully modifying their virulence factors or acquiring the ability to avoid immune detection. In its turn, enhancement of plant resistance to pathogens is a result of successful plant evolution in respect to their ability to recognise the “opponent”, involving various additional molecules and alternative mechanisms (adaptor proteins, co-receptors, ubiquitination mechanisms, etc.). Thus, the plant provides an effective defence response in a timely and adequate manner. Evolutionary processes of plant and pathogen take place together and react to one another. Following testing for feasibility of structures and mechanisms they become permanent during the evolution and are used by various organs even under stresses of a different nature. A detailed study of all the links and elements of the relationship, which determines the establishment of innate immunity, is far from complete. This is particularly true for in plants especially. Studies addressing these issues will be conducted in the near future.

REFERENCE

1. Flor HH. Inheritance of reaction to rust in flax. *Journal of Agricultural Research*. 1947;74:241–262.
2. Janeway C, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*. 2002;20:197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
3. Lebedev KA, Ponyakina ID. *Immunology of image-recognizing receptors. Integral immunology*. Moscow: URSS; 2009. 253 p. (In Russian)
4. Zhang J, Zhou J-M. Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. *Molecular Plant*. 2010;3(5):783–793. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq035>
5. Jones JDG, Vance RE, Dangl JL. Intracellular

- innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science*. 2016;354(6316):aaf6395. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6395>
6. Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. *Nature*. 2006;444(7117):323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
 7. D'yakov YT. Fifty years of “gene-for-gene” theory. *Uspekhi sovremennoi biologii = Advances in Current Biology*. 1996;116:293-305. (In Russian)
 8. Staskawicz B, Ausubel E, Baker B, Ellis JG, Jones JD. Molecular genetic of plant disease resistance. *Science*. 1995;268(5211):661–666. <https://doi.org/10.1126/science.7732374>
 9. Vavilov NI. *Plant immunity to infection diseases*. Moscow: Nauka; 1986. 519 p. (In Russian)
 10. Albersheim P, Anderson-Proyty AJ. Carbohydrates, proteins, cell surfaces, and the biochemistry of pathogenesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1975;26:31–52. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.26.060175.000335>
 11. Robatzek S, Saijo Y. Plant immunity from A to Z. *Genome Biology*. 2008;9(4). Article 304. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-4-304>
 12. Bednarek P. Chemical warfare or modulators of defense responses—the function of secondary metabolites in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*. 2012;15(4):407–414. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.03.002>
 13. Janeway CA. Autoimmune disease: immunotherapy by peptides? *Nature*. 1989;341(6242):482–483. <https://doi.org/10.1038/341482a0>
 14. Staal J, Dixelius C. Tracing the ancient origins of plant innate immunity. *Trends Plant Science*. 2007;12(8):334–342. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.014>
 15. Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, et al. The grateful dead: damage associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunological Reviews*. 2007;220(1):60–81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00579.x>
 16. Couto D, Zipfel C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology*. 2016;16:537–552. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.77>
 17. Vance RE, Isberg RR, Portnoy DA. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host Microbe*. 2009;6(1):10–21. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.06.007>
 18. Durrant WE, Dong X. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 2004;42:185–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
 19. Slaughter A, Daniel X, Flors V, Luna E, Hohn B, Mauch-Mani B. Descendants of primed Arabidopsis plants exhibit enhanced resistance to biotic stress. *Plant Physiology*. 2012;158:835–843. <https://doi.org/10.1104/pp.111.191593>
 20. Omelichkina YV, Shafikova TN, Alekseyenko AL, Markova YA, Yenikejev AG, Rikhvanov EG. Response of tobacco plants and cell cultures to infection by *Clavibacter michiganensis* ssp. *Sepedonicus*. *V mire nauchnykh otkrytii = In the World of Scientific Achievements*. 2010;1-4:89–94. (In Russian)
 21. Markova YA, Savilov ED, Anganova EV, Voinikov VK. *Natural environment as a potential habitat of pathogenic and potentially pathogenic enterobacteria*. Irkutsk: State Medical Academy of Postgraduate Education; 2013. 144 p. (In Russian)
 22. Dow M, Newman MA, von Roepenack E. The induction and modulation of plant defense response by bacterial lipopolysaccharides. *Annual Review of Phytopathology*. 2000;38:241–261. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.241>
 23. Nicaise V, Roux M, Zipfel C. Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant physiology*. 2009;150:1638–1647. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139709>
 24. Sakamoto T, Deguchi M, Brustolini O, Santos A, Silva F, Fontes E. The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRR-RLK subfamily in antiviral defense. *BMC Plant Biology*. 2012;12:229. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-229>
 25. Li L, Yu Y, Zhou Z, Zhou JM. Plant pattern-recognition receptors controlling innate immunity. *Science China Life Sciences*. 2016;59:878–888. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-0115-2>
 26. Shiu SH, Bleecker AB. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2001;98(19):10763–10768. <https://doi.org/10.1073/pnas.181141598>
 27. Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*. 2003;15(4):396–401. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(03\)00080-3](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(03)00080-3)
 28. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*. 2010;11:373–384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>
 29. Dardick C, Ronald P. Plant and animal pathogen recognition receptors signal through non-RD kinases. *PLoS Pathogens*. 2006;2(1):0014–0028. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020002>
 30. Lee S-W, Han S-W, Sriyanyan M, Park C-J, Seo Y-S, Ronald PC. A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity. *Science*. 2009;326(5954):850–853. <https://doi.org/10.1126/science.1173438>
 31. Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell*. 2004;16:3496–3507. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026765>
 32. Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y,

- Ichimura K, Shirasu K, et al. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signalling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2007;104(49):19613–19618. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705147104>
33. Liu B, Li J-F, Ao Y, Qu J, Li Z, Su J, et al. Lysin motif-containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity. *Plant Cell*. 2012;24:3406–3419. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.102475>
34. Ranf S, Gisch N, Schäffer M, Illig T, Westphal L, Knirel YA, et al. A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Immunology*. 2015;16(4):426–433. <https://doi.org/10.1038/ni.3124>
35. Brutus A, Sicilia F, Maccone A, Cervone F, De Lorenzo G. A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2010;107(20):9452–9457. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000675107>
36. Forrest RS, Lyon GD. Substrate degradation patterns of polygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* and *Bacillus polymyxa* and release of phytoalexin-eliciting oligosaccharides from potato cell walls. *Journal of Experimental Botany*. 1990;41(4):481–488. <https://doi.org/10.1093/jxb/41.4.481>
37. Anderson CM, Wagner TA, Perret M, He Z-H, He D, Kohorn BD. WAKs: cell wall-associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix. *Plant Molecular Biology*. 2001;47:197–206. <https://doi.org/10.1023/A:1010691701578>
38. Schulze B, Mentzel T, Jehle AK, Mueller K, Beeler S, Boler T, et al. Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(13):9444–9451. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.096842>
39. Sun Y, Li L, Macho AP, Han Z, Hu Z, Zipfel C, et al. Structural basis for flg22-induced activation of the *Arabidopsis* FLS2-BAK1 immune complex. *Science*. 2013;342(6158):624–628. <https://doi.org/10.1126/science.1243825>
40. Wang Y, Li Z, Liu D, Xu J, Wei X, Yan L, et al. Assessment of BAK1 activity in different plant receptor-like kinase complexes by quantitative profiling of phosphorylation patterns. *Journal of Proteomics*. 2014;108:484–493. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.06.009>
41. Shan L, He P, Li J, Heese A, Peck SC, Nürnberger T, et al. Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host Microbe*. 2008;4(1):17–27. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.05.017>
42. Belkhadir Y, Jaillais Y, Epple P, Balsemao-Pires E, Dangl JL, Chory J. Brassinosteroids modulate the efficiency of plant immune responses to microbe-associated molecular patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2012;10(1):297–302. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112840108>
43. Liu J, Ding P, Sun T, Nitta Y, Dong O, Huang X, et al. Heterotrimeric G proteins serve as a converging point in plant defense signaling activated by multiple receptor-like kinases. *Plant Physiology*. 2013;161:2146–2158. <https://doi.org/10.1104/pp.112.212431>
44. Ren D, Liu Y, Yang K-Y, Han L, Mao G, Glazebrook J, et al. A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2008;105(14):5638–5643. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711301105>
45. Bi G, Zhou J-M. MAP kinase signaling pathways: a hub of plant-microbe interactions. *Cell Host and Microbe*. 2017;21(3):270–273. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.02.004>
46. Pandey SP, Somssich IE. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiology*. 2009;150(4):1648–1655. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138990>
47. Ishihama N, Yoshioka H. Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*. 2012;15(4):431–437. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.02.003>
48. Adachi H, Nakano T, Miyagawa N, Ishihama N, Yoshioka M, Katou Y, et al. WRKY transcription factors phosphorylated by MAPK regulate a plant immune NADPH oxidase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*. 2015;27(9):2645–2663. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00213>
49. Dong J, Chen C, Chen Z. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Molecular Biology*. 2003;51:21–37. <https://doi.org/10.1023/A:1020780022549>
50. Talanova VV, Titov AF, Topchiyeva LV, Malysheva IE, Venzhik YV, Frolova SA. Expression of genes of WRKY transcription factor and stress proteins in wheat plants under cold hardening and ABA impact. *Fiziologiya rastenii = Plant Physiology*. 2009;56(5):776–782. (In Russian) <https://doi.org/10.1134/S102144370>
51. Wei W, Zhang Y, Han L, Guan Z, Chai T. A novel WRKY transcriptional factor from *Thlaspi caerulescens* negatively regulates the osmotic stress tolerance of transgenic tobacco. *Plant Cell Reports*. 2008;27:795–803. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0499-0>
52. Tsuda K, Sato M, Glazebrook J, Cohen JD, Katagiri F. Interplay between MAMP triggered and SA-mediated defense responses. *The Plant Journal*. 2008;53:763–775. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03369.x>
53. Withers J, Dong X. Post-translational regulation of plant immunity. *Current Opinion in Plant Biol-*

- ogy. 2017;38:124–132. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.05.004>
54. Segonzac C, Macho AP, Sanmartin M, Ntoukakis V, Sanchez-Serrano JJ, Zipfel C. Negative control of BAK1 by protein phosphatase 2A during plant innate immunity. *The EMBO Journal*. 2014;33(18):2069–2079. <https://doi.org/10.15252/embj.201488698>
55. Couto D, Niebergall R, Liang X, Bucherl CA, Sklenar J., Macho AP, et al. The *Arabidopsis* protein phosphatase PP2C38 negatively regulates the central immune kinase BIK1. *PLoS Pathogens*. 2015;12:1005811. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005811>
56. Zhou J, Lu D, Xu G, Finlayson SA, He P, Shan L. The dominant negative ARM domain uncovers multiple functions of PUB13 in *Arabidopsis* immunity, flowering, and senescence. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66(11):3353–3366. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv148>
57. Smith JM, Salamango DJ, Leslie ME, Collins CA, Heese A. Sensitivity to Flg22 is modulated by ligand-induced degradation and de novo synthesis of the endogenous flagellin-receptor FLAGELLIN-SENSING2. *Plant Physiology*. 2014;164:440–454. <https://doi.org/10.1104/pp.113.229179>
58. Katagiri F, Tsuda K. Understanding the plant immune system. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2010;23(12):1531–1536. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-10-0099>
59. Zhang J, Shao F, Cui H, Chen L, Li H, Zou Y, et al. A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe*. 2007;1(3):175–185. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.03.006>
60. Macho AP, Schwessinger B, Ntoukakis V, Brutus A, Segonzac C, Roy S, et al. A bacterial tyrosine phosphatase inhibits plant pattern recognition receptor activation. *Science*. 2014;343(6178):1509–1512. <https://doi.org/10.1126/science.1248849>
61. Zeng L, Velasquez AC, Munkvold KR, Zhang J, Martin GB. A tomato LysM receptor-like kinase promotes immunity and its kinase activity is inhibited by AvrPtoB. *The Plant Journal*. 2012;69:92–103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2011.04773.x>
62. Hemetsberger C, Herrberger C, Zechmann B, Hillmer M, Doehlemann G. The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLOS Pathogens*. 2012;8:e1002684. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002684>
63. Lukasik E, Takken F.L. STANDING strong, resistance proteins instigators of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*. 2009;12(4):427–436. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.03.001>
64. Kadota Y, Shirasu K, Guerois R. NLR sensors meet at the SGT1-HSP90 crossroad. *Trends in Biochemical Sciences*. 2010;35(4):199–207. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.12.005>
65. Dangl JL, Jones JGD. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. 2001;411:826–833. <https://doi.org/10.1038/35081161>
66. Wilton M, Subramaniam R, Elmore J, Felsensteiner C, Coaker G, Desveaux D. The type III effector HopF2_{Pto} targets *Arabidopsis* RIN4 protein to promote *Pseudomonas syringae* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2010;107(5):2349–2354. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904739107>
67. Van der Hoorn RA, Kamoun S. From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell*. 2008;20:2009–2017. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060194>
68. Gutierrez JR, Balmuth AL, Ntoukakis V, Mucyn TS, Gimenez-Ibanez S, Jones A, et al. Prf immune complexes of tomato are oligomeric and contain multiple Pto-like kinases that diversify effector recognition. *The Plant Journal*. 2009;61(3):507–518. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2009.04078.x>
69. Collier SM, Moffett P. NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens. *Trends in Plant Sciences*. 2009;14(10):521–529. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.08.001>
70. Wirthmueller L, Zhang Y, Jones JD, Parker JE. Nuclear accumulation of the *Arabidopsis* immune receptor RPS4 is necessary for triggering EDS1-dependent defense. *Current Biology*. 2007;17(23):2023–2029. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.042>
71. Bai S, Liu J, Chang C, Zhang L, Maekawa T, Wang Q, et al. Structure-function analysis of barley NLR immune receptor MLA10 reveals its cell compartment specific activity in cell death and disease resistance. *PLoS Pathogens*. 2012;8(6):e1002752. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002752>
72. Sarris PF, Duxbury Z, Huh SU, Ma Y, Segonzac C, Sklenar J, et al. A plant immune receptor detects pathogen effectors that target WRKY transcription factors. *Cell*. 2015;161(5):1089–1100. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.024>
73. Mur LA, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E. The hypersensitive response: the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany*. 2008;59(3):501–520. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm239>
74. Jwa N-S, Hwang BK. Convergent evolution of pathogen effectors toward reactive oxygen species signaling networks in plants front. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:1687. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01687>
75. Le Roux C, Huet G, Jauneau A, Camborde L, Tremousaygue D, Kraut A, et al. A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. *Cell*. 2015;161(5):1074–1088. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.025>

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Flor H.H. Inheritance of reaction to rust in flax // *Journal of Agricultural Research*. 1947. Vol. 74. P. 241–262.
2. Janeway C., Medzhitov R. Innate immune recognition // *Annual Review of Immunology*. 2002. Vol. 20. P. 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
3. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунология образраспознающих рецепторов. Интегральная иммунология. М.: URSS, 2009. 253 с.
4. Zhang J., Zhou J.-M. Plant immunity triggered by microbial molecular signatures // *Molecular Plant*. 2010. Vol. 3. Issue 5. P. 783–793. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp035>
5. Jones J.D.G., Vance R.E., Dangl J.L. Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals // *Science*. 2016. Vol. 354. Issue 6316. aaf6395. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6395>
6. Jones J.D.G., Dangl J.L. The plant immune system // *Nature*. 2006. Vol. 444. Issue 7117. P. 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
7. Дьяков Ю.Т. Пятьдесят лет теории «ген-наген» // *Успехи современной биологии*. 1996. Т. 116. С. 293–305.
8. Staskawicz B., Ausubel E., Baker B., Ellis J.G., Jones J.D. Molecular genetic of plant disease resistance // *Science*. 1995. Vol. 268. Issue 5211. P. 661–666. <https://doi.org/10.1126/science.7732374>
9. Вавилов Н.И. Иммунитет растений к инфекционным заболеваниям. М.: Наука, 1986. 519 с.
10. Albersheim P., Anderson-Proyty A.J. Carbohydrates, proteins, cell surfaces, and the biochemistry of pathogenesis // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1975. Vol. 26. P. 31–52. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.26.060175.000335>
11. Robatzek S., Saijo Y. Plant immunity from A to Z // *Genome Biology*. 2008. Vol. 9. Issue 4. Article 304. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-4-304>
12. Bednarek P. Chemical warfare or modulators of defense responses—the function of secondary metabolites in plant immunity // *Current Opinion in Plant Biology*. 2012. Vol. 15. Issue 4. P. 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.03.002>
13. Janeway C.A. Autoimmune disease: immunotherapy by peptides? // *Nature*. 1989. Vol. 341. Issue 6242. P. 482–483. <https://doi.org/10.1038/341482a0>
14. Staal J., Dixelius C. Tracing the ancient origins of plant innate immunity // *Trends Plant Science*. 2007. Vol. 12. Issue 8. P. 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.014>
15. Lotze M.T., Zeh H.J., Rubartelli A., Sparvero L.J., Amoscato A.A., Washburn N.R., et al. The grateful dead: damage associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity // *Immunological Reviews*. 2007. Vol. 220. Issue 1. P. 60–81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00579.x>
16. Couto D., Zipfel C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants // *Nature Reviews Immunology*. 2016. Vol. 16. P. 537–552. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.77>
17. Vance R.E., Isberg R.R., Portnoy D.A. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system // *Cell Host Microbe*. 2009. Vol. 6. Issue 1. P. 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.06.007>
18. Durrant W.E., Dong X. Systemic acquired resistance // *Annual Review of Phytopathology*. 2004. Vol. 42. P. 185–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
19. Slaughter A., Daniel X., Flors V., Luna E., Hohn B., Mauch-Mani B. Descendants of primed Arabidopsis plants exhibit enhanced resistance to biotic stress // *Plant Physiology*. 2012. Vol. 158. P. 835–843. <https://doi.org/10.1104/pp.111.191593>
20. Омеличкина Ю.В., Шафикова Т.Н., Алексеенко А.Л., Маркова Ю.А., Еникеев А.Г., Рихванов Е.Г. Ответные реакции растений и культуры клеток табака на заражение *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* // *В мире научных открытий*. 2010. N. 1-4. С. 89–94.
21. Маркова Ю.А., Савилов Е.Д., Анганова Е.В., Войников В.К. Природная среда как потенциальное местообитание патогенных и условно-патогенных энтеробактерий. Иркутск: Изд-во РИО ИГМАПО, 2013. 144 с.
22. Dow M., Newman M.A., von Roepenack E. The induction and modulation of plant defense response by bacterial lipopolysaccharides // *Annual Review of Phytopathology*. 2000. Vol. 38. P. 241–261. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.241>
23. Nicaise V., Roux M., Zipfel C. Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm // *Plant physiology*. 2009. Vol. 150. P. 1638–1647. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139709>
24. Sakamoto T., Deguchi M., Brustolini O., Santos A., Silva F., Fontes E. The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRR-II-RLK subfamily in antiviral defense // *BMC Plant Biology*. 2012. Vol. 12. P. 229. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-229>
25. Li L., Yu Y., Zhou Z., Zhou J.M. Plant pattern recognition receptors controlling innate immunity // *Science China Life Sciences*. 2016. Vol. 59. P. 878–888. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-0115-2>
26. Shiu S.H., Bleecker A.B. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2001. Vol. 98. Issue 19. P. 10763–10768. <https://doi.org/10.1073/pnas.181141598>
27. Kopp E., Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors // *Current Opinion in Immunology*. 2003. Vol. 15. Issue 4. P.

396–401. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(03\)00080-3](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(03)00080-3)

28. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors // *Nature Immunology*. 2010. Vol. 11. P. 373–384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>

29. Dardick C., Ronald P. Plant and animal pathogen recognition receptors signal through non-RD kinases // *PLoS Pathogens*. 2006. Vol. 2. Issue 1. P. 0014–0028. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020002>

30. Lee S.-W., Han S.-W., Sriyanyum M., Park C.-J., Seo Y.-S., Ronald P.C. A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity // *Science*. 2009. Vol. 326. Issue 5954. P. 850–853. <https://doi.org/10.1126/science.1173438>

31. Kunze G., Zipfel C., Robatzek S., Niehaus K., Boller T., Felix G. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants // *Plant Cell*. 2004. Vol. 16. P. 3496–3507. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026765>

32. Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K., Shirasu K., et al. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signalling in *Arabidopsis* // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2007. Vol. 104. Issue 49. P. 19613–19618. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705147104>

33. Liu B., Li J.-F., Ao Y., Qu J., Li Z., Su J., et al. Lysin motif-containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity // *Plant Cell*. 2012. Vol. 24. P. 3406–3419. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.102475>

34. Ranf S., Gisch N., Schäffer M., Illig T., Westphal L., Knirel Y.A., et al. A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana* // *Nature Immunology*. 2015. Vol. 16. Issue 4. P. 426–433. <https://doi.org/10.1038/ni.3124>

35. Brutus A., Sicilia F., Maccone A., Cervone F., De Lorenzo G. A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2010. Vol. 107. Issue 20. P. 9452–9457. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000675107>

36. Forrest R.S., Lyon G.D. Substrate degradation patterns of polygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* and *Bacillus polymyxa* and release of phytoalexin-eliciting oligosaccharides from potato cell walls // *Journal of Experimental Botany*. 1990. Vol. 41. Issue 4. P. 481–488. <https://doi.org/10.1093/jxb/41.4.481>

37. Anderson C.M., Wagner T.A., Perret M., He Z.-H., He D., Kohorn B.D. WAKs: cell wall-associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix // *Plant Molecular Biology*. 2001. Vol. 47. P. 197–206. <https://doi.org/10.1023/A:1010691701578>

38. Schulze B., Mentzel T., Jehle A.K., Mueller K., Beeler S., Boler T., et al. Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1 // *Journal of Biological Chemistry*. 2010. Vol. 285. Issue 13. P. 9444–9451. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.096842>

39. Sun Y., Li L., Macho A.P., Han Z., Hu Z., Zipfel C., et al. Structural basis for flg22-induced activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 immune complex // *Science*. 2013. Vol. 342. Issue 6158. P. 624–628. <https://doi.org/10.1126/science.1243825>

40. Wang Y., Li Z., Liu D., Xu J., Wei X., Yan L., et al. Assessment of BAK1 activity in different plant receptor-like kinase complexes by quantitative profiling of phosphorylation patterns // *Journal of Proteomics*. 2014. Vol. 108. P. 484–493. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.06.009>

41. Shan L., He P., Li J., Heese A., Peck S.C., Nürnberger T., et al. Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity // *Cell Host Microbe*. 2008. Vol. 4. Issue 1. P. 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.05.017>

42. Belkhadir Y., Jaillais Y., Epple P., Balsemao-Pires E., Dangl J.L., Chory J. Brassinosteroids modulate the efficiency of plant immune responses to microbe-associated molecular patterns // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2012. Vol. 109. Issue 1. P. 297–302. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112840108>

43. Liu J., Ding P., Sun T., Nitta Y., Dong O., Huang X., et al. Heterotrimeric G proteins serve as a converging point in plant defense signaling activated by multiple receptor-like kinases // *Plant Physiology*. 2013. Vol. 161. P. 2146–2158. <https://doi.org/10.1104/pp.112.212431>

44. Ren D., Liu Y., Yang K.-Y., Han L., Mao G., Glazebrook J., et al. A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2008. Vol. 105. Issue 14. P. 5638–5643. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711301105>

45. Bi G., Zhou J.-M. MAP kinase signaling pathways: a hub of plant-microbe interactions // *Cell Host and Microbe*. 2017. Vol. 21. Issue 3. P. 270–273. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.02.004>

46. Pandey S.P., Somssich I.E. The role of WRKY transcription factors in plant immunity // *Plant Physiology*. 2009. Vol. 150. Issue 4. P. 1648–1655. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138990>

47. Ishihama N., Yoshioka H. Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity // *Current Opinion in Plant Biology*. 2012. Vol. 15. Issue 4. P. 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.02.003>

48. Adachi H., Nakano T., Miyagawa N., Ishihama N., Yoshioka M., Katou Y., et al. WRKY

transcription factors phosphorylated by MAPK regulate a plant immune NADPH oxidase in *Nicotiana benthamiana* // *Plant Cell*. 2015. Vol. 27. Issue 9. P. 2645–2663. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00213>

49. Dong J., Chen C., Chen Z. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response // *Plant Molecular Biology*. 2003. Vol. 51. P. 21–37. <https://doi.org/10.1023/A:1020780022549>

50. Таланова В.В., Титов А.Ф., Топчиева Л.В., Малышева И.Е., Венжик Ю.В., Фролова С.А. Экспрессия генов транскрипционного фактора WRKY и стрессовых белков у растений пшеницы при холодом закаливании и действии АБК // *Физиология растений*. 2009. Т. 56. N 5. С. 776–782. <https://doi.org/10.1134/S102144370>

51. Wei W., Zhang Y., Han L., Guan Z., Chai T. A novel WRKY transcriptional factor from *Thlaspi caerulescens* negatively regulates the osmotic stress tolerance of transgenic tobacco // *Plant Cell Reports*. 2008. Vol. 27. P. 795–803. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0499-0>

52. Tsuda K., Sato M., Glazebrook J., Cohen J.D., Katagiri F. Interplay between MAMP triggered and SA-mediated defense responses // *The Plant Journal*. 2008. Vol. 53. P. 763–775. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03369.x>

53. Withers J., Dong X. Post-translational regulation of plant immunity // *Current Opinion in Plant Biology*. 2017. Vol. 38. P. 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.05.004>

54. Segonzac C., Macho A.P., Sanmartin M., Ntoukakis V., Sanchez-Serrano J.J., Zipfel C. Negative control of BAK1 by protein phosphatase 2A during plant innate immunity // *The EMBO Journal*. 2014. Vol. 33. Issue 18. P. 2069–2079. <https://doi.org/10.15252/embj.201488698>

55. Couto D., Niebergall R., Liang X., Bucherl C.A., Sklenar J., Macho A.P., et al. The *Arabidopsis* protein phosphatase PP2C38 negatively regulates the central immune kinase BIK1 // *PLoS Pathogens*. 2016. Vol. 12. e1005811. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005811>

56. Zhou J., Lu D., Xu G., Finlayson S.A., He P., Shan L. The dominant negative ARM domain uncovers multiple functions of PUB13 in *Arabidopsis* immunity, flowering, and senescence // *Journal of Experimental Botany*. 2015. Vol. 66. Issue 11. P. 3353–3366. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv148>

57. Smith J.M., Salamango D.J., Leslie M.E., Collins C.A., Heese A. Sensitivity to Flg22 is modulated by ligand-induced degradation and de novo synthesis of the endogenous flagellin-receptor FLAGELLIN-SENSING2 // *Plant Physiology*. 2014. Vol. 164. P. 440–454. <https://doi.org/10.1104/pp.113.229179>

58. Katagiri F., Tsuda K. Understanding the plant immune system // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2010. Vol. 23. Issue 12. P. 1531–1536. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-10-0099>

59. Zhang J., Shao F., Cui H., Chen L., Li H., Zou Y., et al. A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants // *Cell Host Microbe*. 2007. Vol. 1. Issue 3. P. 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.03.006>

60. Macho A.P., Schwessinger B., Ntoukakis V., Brutus A., Segonzac C., Roy S., et al. A bacterial tyrosine phosphatase inhibits plant pattern recognition receptor activation // *Science*. 2014. Vol. 343. Issue 6178. P. 1509–1512. <https://doi.org/10.1126/science.1248849>

61. Zeng L., Velasquez A.C., Munkvold K.R., Zhang J., Martin G.B. A tomato LysM receptor-like kinase promotes immunity and its kinase activity is inhibited by AvrPtoB // *The Plant Journal*. 2012. Vol. 69. P. 92–103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04773.x>

62. Hemetsberger C., Herrberger C., Zechmann B., Hillmer M., Doehlemann G. The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity // *PLOS Pathogens*. 2012. Vol. 8. e1002684. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002684>

63. Lukasik E., Takken F.L. STANDING strong, resistance proteins instigators of plant defence // *Current Opinion in Plant Biology*. 2009. Vol. 12. Issue 4. P. 427–436. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.03.001>

64. Kadota Y., Shirasu K., Guerois R. NLR sensors meet at the SGT1-HSP90 crossroad // *Trends in Biochemical Sciences*. 2010. Vol. 35. Issue 4. P. 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.12.005>

65. Dangl J.L., Jones J.D.G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection // *Nature*. 2001. Vol. 411. P. 826–833. <https://doi.org/10.1038/35081161>

66. Wilton M., Subramaniam R., Elmore J., Felsensteiner C., Coaker G., Desveaux D. The type III effector HopF2_{Pto} targets *Arabidopsis* RIN4 protein to promote *Pseudomonas syringae* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2010. Vol. 107. Issue 5. P. 2349–2354. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904739107>

67. Van der Hoorn R.A., Kamoun S. From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors // *Plant Cell*. 2008. Vol. 20. P. 2009–2017. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060194>

68. Gutierrez J.R., Balmuth A.L., Ntoukakis V., Mucyn T.S., Gimenez-Ibanez S., Jones A., et al. Prf immune complexes of tomato are oligomeric and contain multiple Pto-like kinases that diversify effector recognition // *The Plant Journal*. 2009. Vol. 61. Issue 3. P. 507–518. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04078.x>

69. Collier S.M., Moffett P. NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens // *Trends in Plant Sciences*. 2009. Vol. 14. Issue 10. P. 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.08.001>

70. Wirthmueller L., Zhang Y., Jones J.D., Par-

ker J.E. Nuclear accumulation of the Arabidopsis immune receptor RPS4 is necessary for triggering EDS1-dependent defense // *Current Biology*. 2007. Vol. 17. Issue 23. P. 2023–2029. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.042>

71. Bai S., Liu J., Chang C., Zhang L., Maekawa T., Wang Q., et al. Structure-function analysis of barley NLR immune receptor MLA10 reveals its cell compartment specific activity in cell death and disease resistance // *PLoS Pathogens*. 2012. Vol. 8. Issue 6. e1002752. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002752>

72. Sarris P.F., Duxbury Z., Huh S.U., Ma Y., Segonzac C., Sklenar J., et al. A plant immune receptor detects pathogen effectors that target WRKY transcription factors // *Cell*. 2015. Vol. 161. Issue 5. P. 1089–1100. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.024>

024

73. Mur L.A., Kenton P., Lloyd A.J., Ougham H., Prats E. The hypersensitive response: the centenary is upon us but how much do we know? // *Journal of Experimental Botany*. 2008. Vol. 59. Issue 3. P. 501–520. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm239>

74. Jwa N.-S., Hwang B.K. Convergent evolution of pathogen effectors toward reactive oxygen species signaling networks in plants front // *Frontiers in Plant Science*. 2017. Vol. 8. P. 1687. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01687>

75. Le Roux C., Huet G., Jauneau A., Camborde L., Tremousaygue D., Kraut A., et al. A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity // *Cell*. 2015. Vol. 161. Issue 5. P. 1074–1088. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.025>

Contribution

Tat'yana N. Shafikova, Yuliya V. Omelichkina carried out the experimental work. The authors on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. All authors have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict of interests

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

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

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Tat'yana N. Shafikova,
Cand. Sci. (Biology), Senior Scientist,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ e-mail: t-shafikova@yandex.ru

Yuliya V. Omelichkina,
Cand. Sci. (Biology), Leading Engineer,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: omelichkina@yandex.ru

Критерии авторства

Шафикова Т.Н., Омеличкина Ю.В. выполнили экспериментальную работу. Авторы совместно обобщили результаты, написали рукопись, имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Шафикова Татьяна Николаевна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
✉ e-mail: t-shafikova@yandex.ru

Омеличкина Юлия Викторовна,
к.б.н., ведущий инженер,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
e-mail: omelichkina@yandex.ru

Оригинальная статья / Original article

УДК 664.6, 577.151

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-439-449>



Влияние низкотемпературной обработки на активность протеолитических ферментов различных видов муки

© С.В. Китаевская, О.А. Решетник

Казанский национальный исследовательский технологический университет,
г. Казань, Российская Федерация

Резюме: Целью работы являлось изучение влияния низкотемпературной обработки на активность протеолитических ферментов различных видов и сортов муки. Настоящее исследование позволило более глубоко представить комплекс механизмов, вызывающих изменение биотехнологических процессов в тестовых полуфабрикатах при низкотемпературном хранении. Результаты исследования по влиянию длительного низкотемпературного воздействия на активность протеолитических ферментов различных видов муки показали, что исследуемый параметр зависит от pH среды, а также видовой принадлежности муки. При низкотемпературном хранении наблюдается тенденция к понижению активности кислых протеаз как традиционных, так и нетрадиционных для хлебопечения видов муки в среднем на 10%. Активность слабокислых и слабощелочных протеаз под действием отрицательных температур при хранении зависит от вида исследуемой муки. По мере увеличения продолжительности низкотемпературного воздействия протеолитическая активность полбяной, пшеничной и гречневой муки при pH=5,5 снижается в среднем на 20, 12,5 и 18% соответственно, тогда как ржаной и овсяной, напротив, увеличивается на 12 и 28% соответственно. Под влиянием замораживания и в ходе низкотемпературного хранения происходит приrost активности слабощелочных протеаз всех исследуемых видов и сортов муки на 15,9%, за исключением гречневой, протеолитическая активность которой по мере хранения снижается в 1,5–2 раза. Установлено, что наибольшую стойкость к длительному хранению в замороженном виде проявляют протеолитические ферменты кукурузной муки. Знание о степени влияния низкотемпературной обработки на активность протеолитических ферментов позволит прогнозировать реологические свойства тестовых полуфабрикатов, структурно-механические и органолептические характеристики готовой продукции, а также более грамотно подойти к разработке рецептур и технологических параметров тестоприготовления нового ассортимента хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов как из традиционных, так и нетрадиционных для хлебопечения видов муки.

Ключевые слова: мука, замороженные полуфабрикаты, низкотемпературное хранение, протеолитическая активность, хлебобулочные изделия

Информация о статье: Дата поступления 6 декабря 2019 г.; дата принятия к печати 31 августа 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2020 г.

Для цитирования: Китаевская С.В., Решетник О.А. Влияние низкотемпературной обработки на активность протеолитических ферментов различных видов муки. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 3. С. 439–449. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-439-449>

Effects of low-temperature treatment on the activity of proteolytic enzymes in various flour types

Svetlana V. Kitaevskaya, Olga A. Reshetnik

Kazan National Research Technological University, Kazan, Russian Federation

Abstract: This work was aimed at investigating effects of low-temperature processing on the activity of proteolytic enzymes in various flour types. This study allowed an improved understanding of the mechanisms that change biotechnological processes in semi-finished dough products during low-temperature storage. The study of the effect of long-term low-temperature exposure on the activity of proteolytic enzymes in various flour types showed that this parameter depends on the medium pH, as well as on the flour type. During low-temperature storage, the activity of acid proteases tend to decrease by, on average, 10% in both traditional and non-traditional types of flour used for baking. The activity of weakly acidic and weakly alkaline proteases under the influence of low temperatures during storage depends on the flour type. At pH = 5.5, an increase in the duration of low-temperature exposure leads to a decrease in the proteolytic activity of spelt,

wheat and buckwheat flour by, on average, 20, 12.5, and 18%, respectively. Conversely, this parameter increases in rye and oat flour by 12 and 28%, respectively. Under the influence of freezing and during low-temperature storage, the activity of weakly alkaline proteases in all studied flour types increases by 15.9%, except for buckwheat, the proteolytic activity of which decreases by 1.5–2 times during storage. It was established that proteolytic enzymes of corn flour exhibit the greatest resistance to long-term storage in a frozen form. Knowledge of the effect of low-temperature processing on the activity of proteolytic enzymes is important for predicting the rheological properties of semi-finished dough products and structural-mechanical and organoleptic characteristics of finished products. In addition, this knowledge facilitates the development of recipes and technological parameters for producing new bakery products based on frozen semi-finished products from traditional and non-traditional flour types.

Keywords: flour, frozen semi-finished products, low-temperature storage, proteolytic activity, bakery products

Information about the article: Received December 6, 2019; accepted for publication August 31, 2020; available online September 30, 2020.

For citation: Kitaevskaya SV, Reshetnik OA. Effects of low-temperature treatment on the activity of proteolytic enzymes in various flour types. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):439–449. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-439-449>

ВВЕДЕНИЕ

Большое внимание сегодня уделяется промышленному использованию достижений криотехнологии в производстве продуктов питания, при этом значительная доля рынка замороженных продуктов приходится на тестовые полуфабрикаты. Во всем мире выпускается широкий ассортимент замороженных полуфабрикатов из пшеничной муки, в нашей стране ведутся исследования по разработке и совершенствованию криотехнологии ржаных и ржано-пшеничных изделий [1–3].

Как отмечают специалисты, при использовании криотехнологии в хлебопечении возникает ряд проблем, которые связаны с нарушением хода биотехнологических процессов, протекающих на стадиях замеса и брожения теста. Длительное воздействие процессов замораживания и хранения тестовых полуфабрикатов в замороженном виде приводит к снижению качества дефростированных полуфабрикатов и готовых изделий из них [4–11]. Многие отечественные и зарубежные исследователи в данной области связывают это с гибелью дрожжей и молочнокислых бактерий – основных участников процесса брожения [4–6, 12–15], в связи с чем предлагаются различные биотехнологические решения названной проблемы [1, 2, 14, 16–21]. Однако в основе процессов брожения теста и формирования качественных показателей хлебобулочных изделий лежат также каталитические превращения компонентов муки под воздействием ферментов протеолитического и амилолитического действия. Протеолитические ферменты муки играют важную роль в процессах созревания тестовых полуфабрикатов, в частности, оказывают влияние на протекание биохимических процессов при брожении теста, определяют его реологические свойства, структурно-механические и органолептические характеристики хлебобулоч-

ных изделий.

Протеиназы пшеничной и ржаной муки расщепляют белки по пептидным связям, их относят к протеолитическим ферментам типа папаиназ, для которых характерна способность активироваться соединениями восстанавливающего действия, например, соединениями, содержащими сульфгидрильную группу – SH (цистеин, глутатион), и инактивироваться окислителями, такими как бромат калия, перекись водорода, кислород воздуха и др. [20].

Начальной формой действия протеиназы является дезагрегация белка, нарушение его четвертичной и третичной структур. Действие протеиназы на клейковину и тесто приводит к сильному их разжижению, понижению упругости и увеличению текучести. Принято считать, что протеиназа зерен пшеницы имеет зону оптимума кислотности в пределах pH = 4–5,5 и температурный оптимум около 45 °С. Однако существенную роль могут играть и нейтральные протеиназы с оптимумом pH = 6,75. Оптимальные значения pH для действия протеиназы ржаной муки лежат в пределах 4,0–5,0 [20].

В настоящее время достаточно хорошо изучен белково-протеиназный комплекс пшеничной и ржаной муки, проводятся исследования по изучению фракционного состава белков и определению активности протеаз овсяной, полбяной, кукурузной, ячменной, тритикалевой и других видов муки. Интерес ученых к данным нетрадиционным для хлебопечения видам муки вызван их высокой пищевой ценностью. Особое внимание исследователей привлекают цельнозерновые виды муки, которые отличаются высоким содержанием пищевых волокон, витаминов, минеральных веществ и аминокислот.

Низкотемпературное воздействие на тестовые полуфабрикаты вызывает укрепление их клейковинного каркаса, при этом тесто теряет эластич-

ность и становится малорастяжимым. Однако при длительном хранении тестовых полуфабрикатов в замороженном виде может произойти и перекристаллизация льда, приводящая к механическому разрушению и ослаблению структуры клейковины. Таким образом, криообработка тестовых полуфабрикатов отрицательно влияет на реологические характеристики теста, что в свою очередь приводит к снижению качественных показателей готовых изделий, в частности, ухудшаются структурно-механические свойства мякиша, снижается пористость и удельный объем хлеба [4–9].

В научно-технической литературе практически отсутствует информация о влиянии отрицательных температур на активность ферментов муки и тестовых полуфабрикатов, вырабатываемых на основе криотехнологии, за исключением работ отечественных ученых, где представлены данные об изменении активности протеолитических ферментов в замороженных полуфабрикатах для булочных изделий из пшеничной муки. Настоящее исследование восполняет этот пробел и позволяет более глубоко представить комплекс механизмов, приводящих к изменению биотехнологических процессов в тестовой среде после криообработки. Целью настоящей работы явилось исследование влияния низкотемпературной обработки на активность протеолитических ферментов различных видов и сортов муки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования служили традиционные и нетрадиционные для массового производства хлебобулочных изделий виды и сорта муки, характеристика которых приведена в табл. 1.

Муку перемешивали с водой комнатной температуры и замешивали модельное тесто влажностью 40%, после замеса тесто сразу же разделяли на куски массой 100 г и подвергали низкотемпературной обработке в шкафу шоковой заморозки марки Arach SH03 при температуре минус 25–30 °С. Образцы теста в замороженном виде хранили в течение 4-х недель. Дефростацию про-

водили при комнатной температуре до достижения температуры в центре образцов 18 °С.

Для выделения протеаз из опытных образцов использовали физиологический раствор с концентрацией NaCl 1%, для чего 10 г теста помещали в керамическую ступку и тщательно растирали с добавлением солевого раствора, а после перемещали в колбу объемом 100 мл. Введение раствора проводили порционно, учитывая при этом потерю влаги заготовками во время замораживания и дефростации, а также содержание влаги в заготовках. Суспензию тщательно перемешивали и выдерживали при температуре 4 °С в течение одного часа для экстракции ферментов. Осадок отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 7000 об./мин. Полученную надосадочную жидкость использовали для определения суммарной протеолитической активности объектов исследования. Активность протеаз оценивали методом Ансона, о протеолитической активности судили по количеству высвободившегося тирозина, накопившегося за 1 ч под действием протеаз муки в расчете на 1 мг белка. В качестве субстрата для кислых протеаз использовали 2%-й раствор альбумина на 0,2 М ацетатном буфере, pH = 3,0 и pH = 5,5; для щелочных – 2%-й раствор казеина на 0,2 М фосфатном буфере, pH = 8,0.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Активность протеолитических ферментов муки во многом зависит от вида зерна, из которого она получена, способа получения, сорта муки, значений pH среды, наличия в тесте активаторов и ингибиторов и др. [20, 21]. Результаты исследования активности протеаз анализируемых видов и сортов муки в зависимости от значений pH среды приведены в табл. 2.

Полбяная мука вырабатывается из зерна полбы – полудикой культуры пшеницы. Вследствие данного родства проводится много изысканий, направленных на изучение химического состава зерен полбы, а также полбяной муки в

Таблица 1. Характеристика объектов исследования

Table 1. Characteristics of research objects

Вид и сорт муки	Производитель	Влажность, %	Содержание белка, г/100 г	Содержание белка, г/100 г СВ
Пшеничная высшего сорта	ОАО «Казаньзернопродукт»	13,6	9,94	11,50
Пшеничная 1 сорта	ОАО «Казаньзернопродукт»	14,2	10,12	11,79
Пшеничная обойная	ПАО «Петербургский мельничный комбинат»	14,0	10,20	11,86
Пшеничная цельнозерновая	ПАО «Петербургский мельничный комбинат»	12,8	11,45	13,13
Ржаная обойная	ОАО «Казаньзернопродукт»	13,4	10,29	11,88
Ржаная обдирная	ОАО «Казаньзернопродукт»	14,0	9,17	10,66
Ржаная цельнозерновая	ООО «Гарнец»	13,2	11,06	12,74
Полбяная цельнозерновая	ООО «Гарнец»	11,6	14,32	16,20
Овсяная	ООО «Гарнец»	14,2	12,91	15,05
Кукурузная	ООО «Гарнец»	12,0	9,15	10,40
Гречневая	ООО «Гарнец»	12,6	13,43	15,37

сравнении с пшеничной мукой. Авторами работы [22] показано, что сумма белковых спирторастворимых и щелочерастворимых фракций в полбяной муке почти на 20% меньше аналогичной суммы в пшеничной муке, что может оказать существенное влияние на активность протеаз в тесте. Установлено, что активность протеолитических ферментов полбяной муки увеличивается на 18,5% при повышении значений pH среды от 3,0 до 8,0.

Протеолитические ферменты ржаной муки проявляют большую активность по сравнению с протеазами пшеничной муки высшего и первого сортов. Следует отметить, что активность протеаз в ржаной муке из цельного зерна выше на 14,5% по сравнению с обойной и обдирной. При этом активность протеолитических ферментов ржаной муки зависит от pH среды, наиболее высокую активность протеазы проявляют в кислой среде. В тесте из ржаной муки вследствие способности ее белков неограниченно набухать и переходить в коллоидный раствор, а также высокого содержания альбуминов и глобулинов, атакуемость белков протеолитическими ферментами значительно возрастает [20].

Среди нетрадиционных для хлебопечения видов муки значительно высокую активность проявляют протеолитические ферменты гречневой муки, активность протеаз колеблется в диапазоне 2,624–2,738 мкмоль тирозина/ч и существенно не зависит от pH среды. В кукурузной муке выявлен относительно невысокий уровень активности протеолитических ферментов (0,762 мкмоль тирозина/ч) по сравнению с другими исследуемыми образцами, при этом зависимости значений протеолитической активности кукурузной муки от pH среды не обнаружено. Активность протеаз овсяной муки лежит в диапазоне 1,049–1,174 мкмоль тирозина/ч, при этом активность протеолитических ферментов в слабощелочной среде на 12% больше, чем в кислой.

Таким образом, результаты исследования показали, что кислые протеазы наиболее активны у ржаной и овсяной муки, щелочные – у пше-

ничной, полбяной, кукурузной и гречневой. Наиболее чувствительными к изменению pH среды являются следующие виды муки: пшеничная обойная, пшеничная цельнозерновая и полбяная. При разработке рецептур из данных сортов муки возможна корректировка активности протеолитических ферментов, что позволит регулировать качественные показатели готовой продукции и выпекать изделия с нужными реологическими характеристиками.

С целью изучения влияния низкотемпературной обработки на активность протеолитических ферментов муки тестовые заготовки замораживали и хранили в замороженном виде в течение 1 мес. Результаты исследования низкотемпературного воздействия (от -25 до -30 °C) на активность протеаз пшеничной и ржаной муки в зависимости от pH среды представлены на рис. 1.

Установлено, что после низкотемпературного хранения теста из пшеничной муки в течение 1 недели отмечается снижение протеолитической активности у всех исследуемых образцов вне зависимости от сортовой принадлежности. Наибольшее понижение активности протеолитических ферментов наблюдается у пшеничной обойной муки в слабощелочной среде (выявлено понижение активности на 30%). Дальнейшее увеличение продолжительности замораживания не приводит к существенным изменениям активности протеолитических ферментов пшеничной муки в кислой среде при значениях pH = 3,0 и 5,5. Однако по мере увеличения хранения полуфабрикатов в замороженном виде отмечается прирост активности слабощелочных протеаз пшеничной обойной муки.

При изучении влияния отрицательных температур на протеолитическую активность сортов ржаной муки установлено, что активность кислых протеаз в обойной и обдирной муке снижается в среднем на 5–10%, тогда как в слабокислой и слабощелочной реакциях среды отмечается увеличение активности на 12,5 и 8,5% соответственно. При дальнейшем увеличении длительности хранения теста в замороженном виде в

Таблица 2. Протеолитическая активность муки, мкмоль тирозина за 1 ч в расчете на 1 мг белка

Table 2. Proteolytic activity of flour, μmol of tyrosine for 1 hour per 1 mg of protein

Объект исследования	Активность протеаз при pH		
	3,0	5,5	8,0
Пшеничная высшего сорта	0,382±0,018	0,378±0,014	0,386±0,020
Пшеничная 1 сорта	0,571±0,022	0,615±0,017	0,698±0,013
Пшеничная обойная	1,447±0,024	1,510±0,019	1,616±0,021
Пшеничная цельнозерновая	1,511±0,017	1,566±0,020	1,694±0,016
Ржаная обойная	1,575±0,019	1,559±0,022	1,469±0,022
Ржаная обдирная	1,556±0,021	1,513±0,015	1,475±0,019
Ржаная цельнозерновая	1,792±0,023	1,759±0,018	1,733±0,019
Полбяная цельнозерновая	1,215±0,016	1,424±0,013	1,442±0,016
Овсяная	1,049±0,029	1,087±0,021	1,174±0,027
Кукурузная	0,748±0,017	0,763±0,022	0,777±0,025
Гречневая	2,624±0,066	2,720±0,034	2,738±0,054

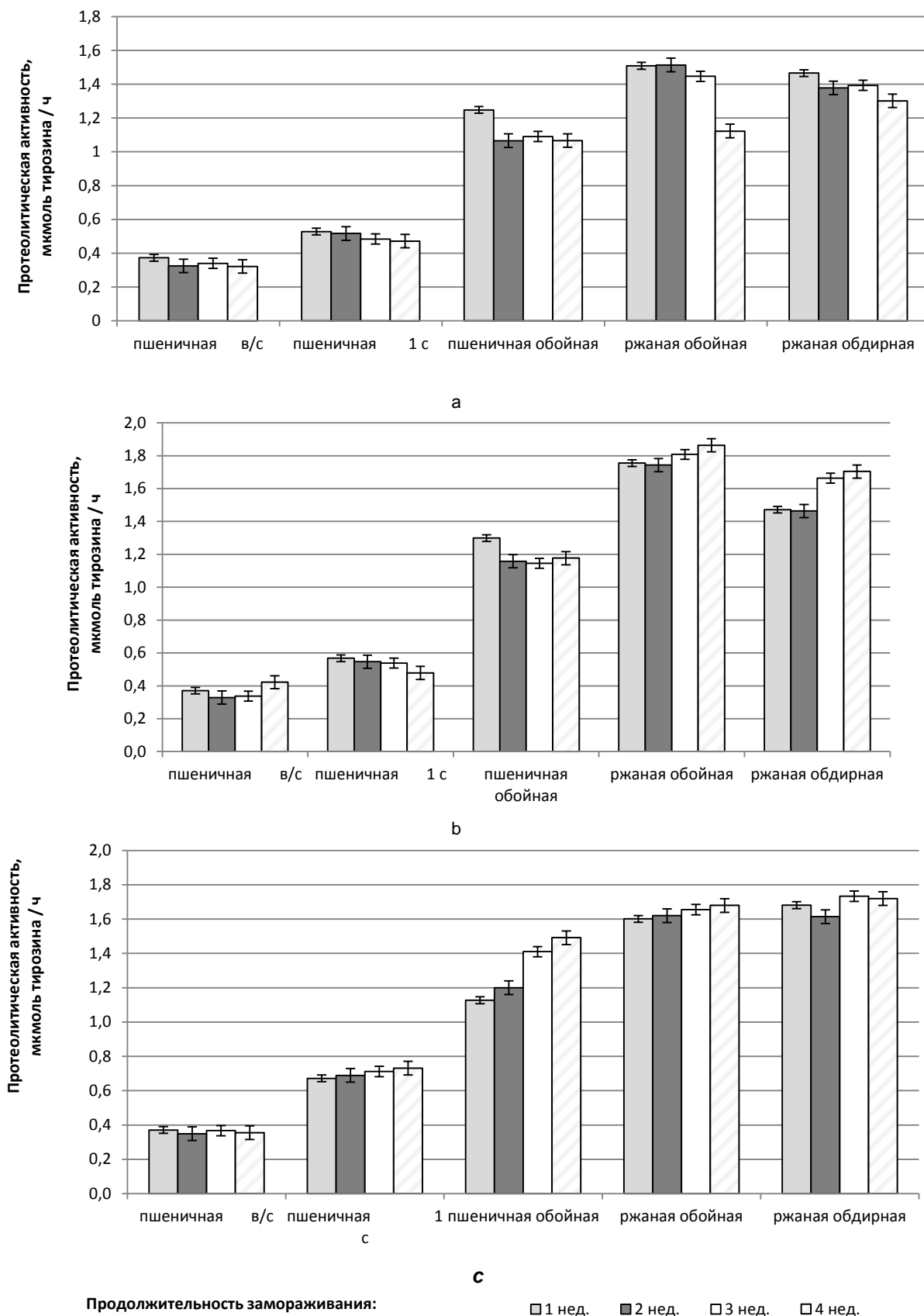


Рис. 1. Влияние процессов замораживания и хранения на активность протеаз пшеничной и ржаной муки различных сортов при pH: 3,0 (а), 5,5 (б), 8,0 (с)

Fig. 1. Effect of freezing and frozen storage on the proteases activity of various varieties of wheat and rye flour at pH: 3,0 (a), 5,5 (b), 8,0 (c)

образцах из ржаной муки происходит постепенное снижение активности протеаз в кислой среде на 26–28%, в слабокислой и слабощелочной средах наблюдается прирост ферментативной активности (увеличение содержания в пробах продуктов гидролиза белков при pH = 5,5 и 8,0 составляет: для ржаной обойной муки – 19,3 и 14,3% соответственно, для обдирной – 12,6 и 16,5%).

Таким образом, на активность протеолитических ферментов пшеничной и ржаной муки после низкотемпературной обработки значительное влияние оказывает pH среды.

Следует отметить, что низкотемпературная обработка образцов из цельнозерновых видов пшеничной и ржаной муки приводит к несущественному снижению активности протеолитических ферментов при низких значениях pH среды (рис. 2). При хранении образцов в замороженном виде наблюдается снижение активности в слабокислой среде (при pH = 5,5) у пшеничной муки на 15,9%, тогда как у образцов из цельнозерновой ржаной муки отмечается прирост активности слабокислых протеаз в процессе хранения образцов в замороженном виде на 13,2%.

Известно, что оптимум активности протеолитических ферментов зерна пшеницы и ржи лежит в слабокислой среде в диапазоне pH = 4,0–5,5 и существенно зависит от наличия в среде активаторов или ингибиторов реакции протеолиза. По-видимому, в процессе низкотемпературного хранения ржаной цельнозерновой муки происходит высвобождение веществ – активаторов протеолиза, чем и объясняется прирост протеолитической активности данных образцов в слабокислой среде.

В присутствии соединений восстанавливающего действия, в частности, содержащих сульфгидрильную группу (SH), например, таких как цистеин, глутатион, активность протеолитических ферментов муки возрастает. Следует отметить, что данные соединения содержатся преимущественно в периферической части зерна и зародыше, которые не удаляются при помоле зерна при получении цельнозерновой муки в отличие от других рассматриваемых сортов.

В ходе исследований не подтвердился предполагаемый прирост активности при изучении влияния низкотемпературных воздействий на активность протеиназ пшеничной муки из цельного зерна при оптимальных значениях pH среды. По-видимому, процессы дезагрегации и дегидратирования молекулы фермента, а также механическое разрушение его структуры крупными кристаллами льда, образующимися при длительном хранении образцов из пшеничной цельнозерновой муки в замороженном виде, преобладают над процессами высвобождения соединений – активаторов протеолиза, в результате чего наблюдается снижение активности

протеаз на протяжении всего периода исследований [5, 6].

Результаты исследования показали, что щелочные протеазы пшеничной и ржаной цельнозерновой муки демонстрируют стабильность к низкотемпературному воздействию. Установлено, что показатель активности протеолитических ферментов данных видов муки при pH = 8,0 существенно не зависит от продолжительности хранения образцов в замороженном виде.

Среди цельнозерновых видов муки наибольшее изменение активности протеолитических ферментов во время хранения отмечается у гречневой муки: вне зависимости от pH среды активность протеаз в гречневой муке после однедельного хранения образцов резко падает (в кислой среде активность снижается на 23,4%, в слабокислой – на 6%, а в слабощелочной – на 20,4%). Следует отметить, что при увеличении низкотемпературной обработки опытных образцов из гречневой муки до четырех недель протеолитическая активность муки снижается в 1,5–2 раза от первоначальных значений.

Выявлено, что при замораживании образцов из полбяной муки происходит снижение активности протеаз как в кислой, так и в слабощелочной среде в среднем на 15–20%. По мере хранения экспериментальных образцов отмечается прирост ферментативной активности при всех исследуемых значениях pH, при этом протеолитическая активность муки после продолжительного хранения образцов в замороженном виде достигает практически исходных значений.

В результате проведенных исследований было установлено, что активность протеаз овсяной цельнозерновой муки при pH = 3,0 под воздействием отрицательных температур существенно не изменяется в течение всего эксперимента. Однако в слабокислой и слабощелочной средах отмечается увеличение ферментативной активности в образцах из овсяной цельнозерновой муки на 31,9 и 43,7% соответственно.

Установлено, что наибольшую устойчивость к длительному низкотемпературному хранению проявляют протеазы кукурузной муки: протеолитическая активность данного вида муки колеблется в диапазоне 0,724–0,824 мкмоль тирозина/ч и не зависит ни от pH среды, ни от продолжительности низкотемпературной обработки.

Понижение активности протеаз при низкотемпературной обработке может быть вызвано несколькими причинами, одной из которых является денатурация белковых молекул муки, а также декстринизация и деструкция крахмала при низкотемпературном хранении, вследствие чего происходит накопление низкомолекулярных сахаристых веществ и декстринов, которые увеличивают эффект ингибирования активности протеолитических ферментов [16].

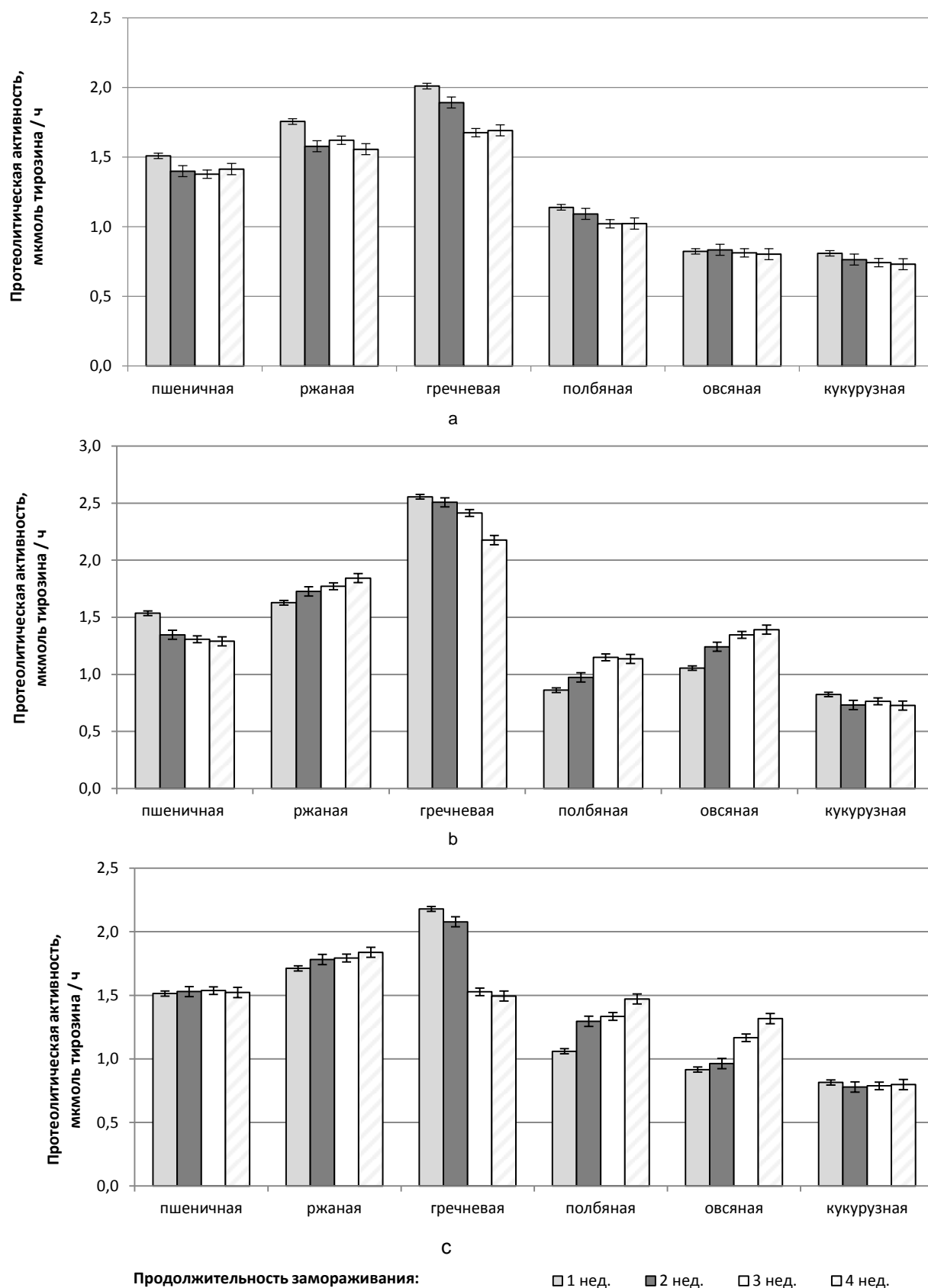


Рис. 2. Зависимость активности протеолитических ферментов цельнозерновых видов муки от продолжительности их низкотемпературной обработки при pH: 3,0 (а); 5,5 (б); 8,0 (в)

Fig. 2. Changes in the proteases activity during frozen storage of various varieties of whole grain flour at pH: 3,0 (a), 5,5 (b), 8,0 (c)

Характер и степень изменения активности протеаз в муке при низкотемпературной обработке могут быть обусловлены также гидролитическим расщеплением белков и разрушением отдельных аминокислот. Известно, что во время замораживания и дефростации тестовых полуфабрикатов происходит денатурация белка, наблюдается декарбоксилирование и дезаминирование свободных аминокислот [4–6]. Данное обстоятельство может привести к повышению кислотности в тесте, что и обуславливает электростатическую неустойчивость белков. Кроме того, замораживание тестовых заготовок приводит к дезагрегации и дегидратированию белковых компонентов муки, в том числе и ферментов [5, 6].

В течение длительного хранения кристаллы льда со временем могут претерпевать рекристаллизацию (оствальдовское созревание) [4, 6], вследствие чего образуются более крупные кристаллы, которые способны механически нарушать целостность белков, что может привести к изменению конформации молекулы фермента, вследствие чего его активность резко снижается.

Повышение активности протеолитических ферментов муки под воздействием отрицательных температур можно объяснить обратимостью денатурации протеаз в слабокислой и слабощелочной средах [10, 11], а также накоплением в тесте при длительном хранении в замороженном виде веществ восстановительного действия – активаторов протеолиза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Протеолитические ферменты муки активно воздействуют на клейковину, тем самым уменьшают вязкость теста, увеличивают его пластичность и эластичность, в связи с чем сокращается продолжительность замеса тестовых полуфабрикатов для формирования оптимальных реоло-

гических свойств. Снижение активности протеаз приводит к укреплению клейковинного каркаса, тесто становится плотным, плохо разрыхляется, что приводит в конечном итоге к снижению удельного объема и пористости готовых изделий из пшеничной муки и смеси ее с другими видами муки.

Несмотря на отсутствие в гречневой и кукурузной муке клейковины, в данном сырье отмечается высокое содержание белка и, как показали проведенные нами исследования, достаточный уровень активности собственных протеолитических ферментов. Следует отметить, что данные виды муки находят широкое применение при производстве безглютеновых хлебобулочных изделий, а также при выпечке продукции из смеси их с пшеничной и ржаной мукой. И поскольку протеолиз может оказывать существенное влияние на набухаемость белков при формировании теста, необходимо учитывать активность протеолитических ферментов при выработке замороженных полуфабрикатов из смеси разных видов муки.

Учитывая важность влияния протеаз на ход биохимических процессов, происходящих при созревании теста и обуславливающих структурно-механические и органолептические свойства готовых изделий, необходимы глубокие знания о степени низкотемпературного воздействия на активность протеолитических ферментов муки.

Результаты исследования влияния криообработки на активность протеолитических ферментов различных видов муки показали, что исследуемый параметр зависит от pH среды и от видовой принадлежности муки, что необходимо учитывать при разработке новых рецептур и внедрении технологии хлебобулочных изделий на основе замороженных полуфабрикатов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Герасимова Э.О., Лабутина Н.В. Криогенные технологии в хлебопечении // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2019. N 1. С. 6–9.
2. Китаевская С.В., Романова Н.К., Попова Е.В., Камартидинова Д.Р. Оптимизация рецептурного состава ржано-пшеничного хлеба, выработанного на основе замороженных полуфабрикатов // XXI век: Итоги прошлого и проблемы настоящего плюс. 2019. Т. 8. N 4. С. 171–176.
3. Козловская А.Э., Лабутина Н.В., Суворов О.А. Влияние хлебопекарных свойств ржаной обдирной муки на теплофизические характеристики ржано-пшеничных полуфабрикатов при замораживании и дефростации // Пищевая промышленность. 2017. N 4. С. 55 - 59.
4. Feng W., Ma S., Wang X. Quality deterioration and improvement of wheat gluten protein in frozen dough // Grain & Oil Science and Technology. 2020. Vol. 3. Issue 1. P. 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2020.02.001>
5. Wang P., Xu L., Nikoo M., Ocen D., Wu F., Yang N., et al. Effect of frozen storage on the conformational, thermal and microscopic properties of gluten: Comparative studies on gluten-, glutenin- and gliadin-rich fractions // Food Hydrocolloids. 2014. Vol. 35. P. 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.05.015>
6. Wang P., Chen H., Mohanad B., Xu L., Ning Y., Xu J., et al. Effect of frozen storage on physicochemistry of wheat gluten proteins: Studies on gluten-, glutenin- and gliadin-rich fractions // Food Hydrocolloids. 2014. Vol. 39. P. 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.009>
7. Giannou V., Tzia C. Frozen dough bread: Quality and textural behavior during prolonged storage e prediction of final product characteristics // Journal of Food Engineering. 2007. Vol. 79. Issue 3. P. 929–934. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.03.013>

8. Gaikwad S., Arya S.S. Influence of frozen storage on quality of multigrain dough, par baked and ready to eat thalipeeth with additives // *LWT – Food Science and Technology*. 2018. Vol. 96. P. 350–356. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.057>
9. Ban C., Yoon S., Han J.W., Sang Oh Kim, Han J.S., Lim S., et al. Effects of freezing rate and terminal freezing temperature on frozen croissant dough quality // *LWT – Food Science and Technology*. 2016. Vol. 73. P. 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.045>
10. Jia C., Yang W.-D., Yang Z., Ojobi O.J. Study of the mechanism of improvement due to waxy wheat flour addition on the quality of frozen dough bread // *Journal of Cereal Science*. 2017. Vol. 75. P. 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.03.007>
11. Frauenlob J., Moriano M.E., Innerkofler U., D'Amico S., Lucisano M., Schoenlechner R. Effect of physicochemical and empirical rheological wheat flour properties on quality parameters of bread made from pre-fermented frozen dough // *Journal of Cereal Science*. 2017. Vol. 77. P. 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.06.021>
12. Meziani S., Jasniewski J., Ribotta P.D., Arab-Tehrany E., Muller J.-M., Ghoul M., et al. Influence of yeast and frozen storage on rheological, structural and microbial quality of frozen sweet dough // *Journal of Food Engineering*. 2012. Vol. 109. P. 538–544. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.026>
13. Китаевская С.В. Исследование резистентности молочнокислых бактерий к низкотемпературной обработке // *Вестник Казанского технологического университета*. 2014. N 17. N 23. С. 214–217.
14. Luo W., Sun D.-W., Zhu Z., Wang Q.-J. Improving freeze tolerance of yeast and dough properties for enhancing frozen dough quality – A review of effective methods // *Trends in Food Science & Technology*. 2018. Vol. 72. P. 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.017>
15. Белявская И.Г., Лабутина Н.В., Балыхин М.Г., Юркина К.С., Никифорова Д.С., Матвеева И.В. Технологические аспекты криогенных технологий хлебобулочных изделий с использованием *Carbo activatus* // *Пищевая промышленность*. 2019. N 3. С. 40–44.
16. Wang X., Pei D., Teng Y., Liang J. Effects of enzymes to improve sensory quality of frozen dough bread and analysis on its mechanism // *Journal Food Science & Technology*. 2018. Vol. 55. Issue 1. P. 389–398. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2950-8>
17. Laaksonen T.J., Roos Y.H. Thermal and dynamic-mechanical properties of frozen wheat doughs with added sucrose, NaCl, ascorbic acid and their mixtures // *International Journal of Food Properties*. 2001. Vol. 4. Issue 2. P. 201–213. <https://doi.org/10.1081/JFP-100105187>
18. Матвеева И.В., Гаццола Д., Страхан С. Биотехнологические решения для замороженных полуфабрикатов и хлебобулочных изделий // *Хлебопродукты*. 2011. N 9. С. 30–32.
19. Tao H., Han T., Xiao Y., Wu F., Xu X. Optimization of additives and their combination to improve the quality of refrigerated dough // *LWT – Food Science and Technology*. 2018. Vol. 89. P. 482–488. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.028>
20. Пучкова Л.И., Поландова Р.Д., Матвеева И.В. *Технология хлеба; 4-е изд., перераб. и доп.* СПб.: ГИОРД, 2005. 259 с.
21. Гридина С.Б., Зинкевич Е.П., Владимирцева Т.А., Забусова К.А. Ферментативная активность зерновых культур // *Вестник КрасГАУ*. 2014. N 8. С. 57–60.
22. Астахов И.Ю., Курочкин П.П., Игнатов Д.Д. Химический состав и технологические свойства полбяной муки // *Инновационная техника и технология*. 2015. N 1. С. 59–62.

REFERENCES

1. Gerasimova EO, Labutina NV. Cryogenic technologies in bakery. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii Pishhevaya tehnologiya = News of Institutes of Higher Education. Food Technology*. 2019;1:6–9. (In Russian)
2. Kitaevskaya SV, Romanova NK, Popova EV, Kamartdinova DR. Optimisation of composition rye bread that was produced from frozen dough. *XXI vek: Itogi proshlogo i problemy nastoyashchego plus = XXI Century: Resumes of the Past and Challenges of the Present plus*. 2019;8(4):171–176. (In Russian)
3. Kozlovskaya AE, Labutina NV, Suvorov OA. Influence of rye flaked flour baking properties on the thermophysical characteristics of rye-wheat semifinished products during freezing and defrosting. *Pishchevaya promyshlennost' = Food Industry*. 2017;4:55–59. (In Russian)
4. Feng W, Ma S, Wang X. Quality deterioration and improvement of wheat gluten protein in frozen dough. *Grain & Oil Science and Technology*. 2020;3(1):29–37. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2020.02.001>
5. Wang P, Xu L, Nikoo M, Ocen D, Wu F, Yang N, et al. Effect of frozen storage on the conformational, thermal and microscopic properties of gluten: Comparative studies on gluten-, glutenin- and gliadin-rich fractions. *Food Hydrocolloids*. 2014;35:238–246. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.05.015>
6. Wang P, Chen H, Mohanad B, Xu L, Ning Y, Xu J, et al. Effect of frozen storage on physicochemistry of wheat gluten proteins: Studies on gluten-, glutenin- and gliadin-rich fractions. *Food Hydrocolloids*. 2014;39:187–194. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.009>
7. Giannou V, Tzia C. Frozen dough bread:

Quality and textural behavior during prolonged storage and prediction of final product characteristics. *Journal of Food Engineering*. 2007;79(3):929–934. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.03.013>

8. Gaikwad S, Arya SS. Influence of frozen storage on quality of multigrain dough, par baked and ready to eat thalipeeth with additives. *LWT – Food Science and Technology*. 2018;96:350–356. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.057>

9. Ban C, Yoon S, Han JW, Sang Oh Kim, Han JS, Lim S, et al. Effects of freezing rate and terminal freezing temperature on frozen croissant dough quality. *LWT – Food Science and Technology*. 2016;73:219–225. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.045>

10. Jia C, Yang W-D, Yang Z, Ojobi OJ. Study of the mechanism of improvement due to waxy wheat flour addition on the quality of frozen dough bread. *Journal of Cereal Science*. 2017;75:10–16. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.03.007>

11. Frauenlob J, Moriano ME, Innerkofler U, D'Amico S, Lucisano M, Schoenlechner R. Effect of physicochemical and empirical rheological wheat flour properties on quality parameters of bread made from pre-fermented frozen dough. *Journal of Cereal Science*. 2017;77:58–65. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.06.021>

12. Meziani S, Jasniewski J, Ribotta PD, Arab-Tehrany E, Muller J-M, Ghoul M, et al. Influence of yeast and frozen storage on rheological, structural and microbial quality of frozen sweet dough. *Journal of Food Engineering*. 2012;109:538–544. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.026>

13. Kitaevskaya SV. Low temperature processing resistance of lactic acid bacteria. *Vestnik Kazanskogo tehnologicheskogo universiteta*. 2014; 17(23):214–217. (In Russian)

14. Luo W, Sun D-W, Zhu Z, Wang Q-J. Improving freeze tolerance of yeast and dough properties for enhancing frozen dough quality – A review of effective methods. *Trends in Food Science & Technology*. 2018;72:25–33. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.017>

2017.11.017

15. Belyavskaya IG, Labutina NV, Balyhin MG, Yurkina KS, Nikiforova DS, Matveeva IV. Technological aspects of cryogenic technologies of bakery products using Carbo activatus. *Pishchevaya promyshlennost' = Food Industry*. 2019;3:40–44. (In Russian)

16. Wang X, Pei D, Teng Y, Liang J. Effects of enzymes to improve sensory quality of frozen dough bread and analysis on its mechanism. *Journal Food Science & Technology*. 2018;55(1):389–398. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2950-8>

17. Laaksonen TJ, Roos YH. Thermal and dynamic-mechanical properties of frozen wheat doughs with added sucrose, NaCl, ascorbic acid and their mixtures. *International Journal of Food Properties*. 2001;4(2):201–213. <https://doi.org/10.1081/JFP-100105187>

18. Matveeva IV, Gaccola D, Strahan S. Biotechnological solutions for frozen dough and bakery products. *Khleboпродукты*. 2011;9:30–32. (In Russian)

19. Tao H, Han T, Xiao Y, Wu F, Xu X. Optimization of additives and their combination to improve the quality of refrigerated dough. *LWT – Food Science and Technology*. 2018;89:482–488. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.028>

20. Puchkova LI, Polandova RD, Matveeva IV. *Bread technology*. St. Petersburg: GIOR, 2005. 559 p. (In Russian)

21. Gridina SB, Zinkevich EP, Vladimircева TA, Zabusova KA. Enzymatic activity of crops. *Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = The Bulletin of KrasGAU*. 2014;8:57–60. (In Russian)

22. Astahov IYu, Kurochkin PP, Ignatov DD. Chemical composition and technological properties of spelt flour. *Innovatsionnaya tekhnika i tekhnologiya = Innovative Machinery and Technology*. 2015;1:59–62. (In Russian)

Критерии авторства

Китаевская С.В., Решетник О.А. выполнили экспериментальную работу. Авторы совместно обобщили результаты, написали рукопись, имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Contribution

Svetlana V. Kitaevskaya, Olga A. Reshetnik carried out the experimental work. The authors on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. All authors have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

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.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Китаевская Светлана Владимировна,
к.т.н., доцент кафедры технологии пищевых
производств,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68,
Российская Федерация,
✉ e-mail: kitaevskayas@mail.ru

Решетник Ольга Алексеевна,
д.т.н., профессор,
заведующая кафедрой технологии пищевых
производств,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68,
Российская Федерация,
e-mail: roa.olga@mail.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Svetlana V. Kitaevskaya,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Department of Food Production Technology,
Kazan National Research Technological
University,
68, K. Marx St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
✉ e-mail: kitaevskayas@mail.ru

Olga A. Reshetnik,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Head of the Department of Food production
technology,
Kazan National Research Technological
University,
68, K. Marx St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
e-mail: roa.olga@mail.ru



Regulation of the activity of adenylate cyclases by hydrogen peroxide in pea root cells Infected with pathogens and a mutualist

© Olga V. Kuzakova, Lidia A. Lomovatskaya, Anatoly S. Romanenko, Alena M. Goncharova

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS,
Irkutsk, Russian Federation,

Abstract: This study examines the effect of a range of exogenous concentrations of hydrogen peroxide on the activity of transmembrane and soluble adenylate cyclases (EC 4.6.1.1) contained in root cells of pea seedlings infected with one of the following: *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *Pisi*, and *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. The results showed that the pool of intracellular H_2O_2 increased when pea roots were infected with bacteria regardless of type. The study analysed the concentration of intracellular cyclic adenosine monophosphate, a product of the adenosine triphosphate cyclization reaction catalyzed by transmembrane and soluble adenylate cyclases. The concentration of intracellular cyclic adenosine monophosphate increased when infected with either *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* or *Clavibacter michiganensis* ssp. *Sepedonicus*; however, the concentration decreased by 20% when infected with *Pseudomonas syringae* pv. *Pisi*. The *in vitro* activity of soluble and transmembrane adenylate cyclases from pea root cells inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* was H_2O_2 dose-dependent: 100 nM of H_2O_2 reduced the activity of soluble and transmembrane adenylate cyclases slightly, while 26 μ M inhibited their activity by 50–60%. When infected with *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, the reduction in the activity of soluble and transmembrane adenylate cyclases was independent of the concentrations of H_2O_2 in the range investigated. When infected with *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, 100 nM of H_2O_2 inhibited the activity of transmembrane adenylate cyclases, although enhancing the activity of soluble adenylate cyclases. On the contrary, concentrations of H_2O_2 of 2.6 and 26 μ M increased the activity of transmembrane adenylate cyclases and inhibited the activity of soluble adenylate cyclases. It can be concluded that the specific concentration of second messengers in plant cells depends on the specificity of the biotic stressor and forms, *inter alia*, by their mutual influence on the components of other plant signaling systems.

Keywords: hydrogen peroxide, soluble adenylate cyclase, transmembrane adenylate cyclase, mutualist, pathogens

Information about the article: Received February 26, 2020; accepted for publication August 31, 2020; available online September 30, 2020.

For citation: Kuzakova OV, Lomovatskaya LA, Romanenko AS, Goncharova AM. Regulation of the activity of adenylate cyclases by hydrogen peroxide in pea root cells infected with pathogens and a mutualist. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):450–458. (In English) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-450-458>

УДК 581.1

Регуляция активности аденилатциклаз клеток корня гороха пероксидом водорода при инфицировании патогенами и мутуалистом

О.В. Кузакова, Л.А. Ломоватская, А.С. Романенко, А.М. Гончарова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск, Российская Федерация,

Резюме: Целью данной работы являлось изучение влияния различных экзогенных концентраций пероксида водорода на активность трансмембранной и растворимой аденилатциклаз (КФ 4.6.1.1) в клетках корня проростков гороха, инфицированного *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *Pisi* или *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Исследования показали, что пул внутриклеточного H_2O_2 повышался при инфицировании корней гороха всеми ука-

занными бактериями. Концентрация внутриклеточного циклического аденозинмонофосфата, продукта реакции циклизации аденозинтрифосфата, катализируемой трансмембранной и растворимой аденилатциклазами, в тех же образцах при инфицировании *Rhizobium leguminosarum* bv. *Vicia* или *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* также возрастала; а под воздействием *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* снижалась на 20%. Активность трансмембранной и растворимой аденилатциклазы *in vitro* из инокулированных *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* клеток корня гороха при добавлении различных концентраций H_2O_2 изменялась дозозависимо: 100 нМ H_2O_2 незначительно снижали их активность, в то время как 26 мкМ ингибировали активность на 50–60%. На фоне инфицирования *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* добавление любой из выбранных концентраций H_2O_2 в равной степени снижало активность трансмембранной и растворимой аденилатциклазы. При инфицировании *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* 100 нМ H_2O_2 ингибировали активность трансмембранной аденилатциклазы, но оказывали активирующий эффект на растворимую аденилатциклазу. Напротив, концентрации H_2O_2 2,6 и 26 мкМ повышали активность трансмембранной аденилатциклазы и ингибировали активность растворимой аденилатциклазы. Сделан вывод о том, что определенный концентрационный статус вторичных мессенджеров в клетках растений зависит от специфичности биотического стрессора и формируется, в том числе, путем их взаимного влияния на компоненты других сигнальных систем растений.

Ключевые слова: пероксид водорода, растворимая аденилатциклаза, трансмембранная аденилатциклаза, мутуалист, патогены

Информация о статье: Дата поступления 26 февраля 2020 г.; дата принятия к печати 31 августа 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2020 г.

Для цитирования: Кузакова О.В., Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Гончарова А.М. Регуляция активности аденилатциклаз клеток корня гороха пероксидом водорода при инфицировании патогенами и мутуалистом. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 3. С. 450–458. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-450-458>

INTRODUCTION

Second messengers of signaling systems participate in the regulation of plant metabolism at all stages of development and are subject to the influence of external agents, for example in biotic stress. The adenylate cyclase signaling system is actively involved in plant stress and defense responses [1, 2]. Earlier, we showed that the degree of activity of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and adenylate cyclase in root cells changed significantly 5 minutes after infection of the root of pea seedling with various agents [1, 3], viz. different strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (*Rlv*) and phytopathogenic bacteria which differ by specialization, *Pseudomonas syringae* bv. *pisi* (*Psp*), the pathogen of peas, and *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*), a specific pathogen for potato. Moreover, the strength of activity of transmembrane adenylate cyclases (TACs) and soluble adenylate cyclases (SACs) was dependent on the infectious agent, despite the non-specific interaction; infection with *Rlv* led to the most pronounced activation of TACs and SACs in pea root cells compared with the activation following infection with *Psp* and short-term contact with *Cms* [1, 3]. Possible mechanisms for modulating the activity of both forms of adenylate cyclases (ACs) under biotic stress may include both ligand-receptor interactions [4] and the influence of calcium ions [5]. The latter can act as an intracellular second messenger, and its concentration can change rapidly following infection. It should be noted that, in the early stages of biotic stress, the concentration of H_2O_2 , another signal molecule, has already

rapidly and sharply increased in the apoplast and intracellular space of plant cells [6–8], which is likely to cause analogous changes in the activity of both forms of ACs. However, knowledge of the effect of H_2O_2 molecules on the activity of transmembrane and soluble forms of AC in plant cells is isolated to specific examples and therefore incomplete: for example, it was shown that 0.2–0.6 μM of H_2O_2 had only a minor effect on TACs and SACs from the vacuoles of beetroot parenchyma cells during various periods of root crop dormancy under long-term biotic stress [9]. Interpretation of these results was complicated by the physiological peculiarities of the beetroot crop (a biennial plant with associated dormant periods), hence it was considered more efficacious to continue the study on the root of pea seedlings. Therefore, the purpose of this study was to investigate the effect of the second messenger in the superoxide synthase signaling system (H_2O_2) on the activity of transmembrane and soluble forms of AC from pea root cells following inoculation with *Rlv*, *Psp*, and *Cms*.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

The subjects were 3-day-old pea seedlings (*Pisum sativum*, Rondo cultivar) and planktonic cultures of the following microorganisms: the symbiotic nitrogen fixer *Rlv* (effective strain RCAM 1022), the pathogen causing bacterial blight in peas *Psp* (strain 1845), and the pathogen causing potato ring rot *Cms* (strain 6889).

Bacterial cultures were grown for 3 days in a germinating chamber (in the range 23–25 °C) in

100-ml flasks filled with 50 ml of a liquid medium containing 10 g/l of yeast extract dialysate and 15 g/l of glucose, pH = 7.0. Microorganisms were grown without additional shaking. The density of the plankton culture of bacteria was determined using a tablet spectrophotometer Immunochem-2100 (High Technology Inc., USA) at a wavelength of 655 nm.

Pea seeds were sterilized and washed sequentially: 5 min in 94% ethanol, 5 min in 3% H₂O₂, and 5 min in a 5% solution of potassium permanganate. Following washing with sterile water, they were poured into a glass of hot water (60 °C) for 4 hours to allow the seeds to swell. Then, the seeds were germinated in sterile Petri dishes on moistened filter paper for 3 days in the dark at 23–25 °C. Seedlings with a root length of at least 35–40 mm were selected and washed with a sterile 0.01% solution of Nonidet (a nonionic detergent) to prevent the infusion of exogenous microflora, washed three times with sterile distilled water and inoculated with a culture of one of the bacteria in the stationary growth phase. The titer of the plankton culture of bacteria was 10⁷ c/ml. The specimens were inoculated with bacteria for 5 minutes, after which the roots of the seedlings were separated from the pea, washed in a sterile 0.01% solution of Nonidet (a detergent) to remove loosely bound bacteria, then washed three times in sterile water.

Determination of SAC and TAC activity, and cAMP concentration. To determine the activity of SACs and TACs, segments of seedling roots of length 22 mm were fixed in liquid nitrogen before enzymes were isolated following the previously developed method [9]. The roots were ground up in an isolation (germination) medium of the following composition: 0.02 M of phosphate buffer, pH = 7.2; 0.1 mM of theophylline (3',5'-cAMP of phosphodiesterase inhibitor); 1 mM of dithiothreitol (SH-group protector); 50 µg/ml of phenylmethylsulfonyl fluoride; 50 µg/ml of hydroxymercury benzoate; 1 µg/ml of leupeptin (protease inhibitor). The homogenate was centrifuged at 16,000 g for 20 min (Allegra 64 R) to remove fragments of cell walls and some organelles. The resulting supernatant was centrifuged at 105,000 g for 90 min (90 Sorvall Discovery SE).

The following parameters were analysed: the TAC activity of the sediment, which contains 70–75% of the plasmalemma [10], and both the SAC activity and the cAMP concentration in the membrane-free supernatant. Samples for cAMP determination were heated to 100 °C for 3 min to inactivate the enzymes.

The activity of both forms of AC was not measured directly but was considered to be directly proportional the cAMP concentration in the sample calculated per mg of protein/min. The cAMP concentration was determined by the enzyme-linked immunosorbent assay [11]. The cAMP concentration in cells was calculated per mg of protein; the protein in the

sample was determined by Bradford's technique.

Determination of H₂O₂ concentration. The concentration of H₂O₂ was determined in the homogenate of segments of the root of pea seedling by the FOX method, based on the change in the colour of Xylenol orange [12]. This required a reagent consisting of two solutions: the first contained 25 mM of FeSO₄, 25 mM of (NH₄)₂SO₄, and 2.5 M of H₂SO₄, the second contained 125 µM of Xylenol orange and 100 mM of sorbitol. The solutions were mixed immediately prior to analysis in a ratio of 1:100, respectively. Then, the resulting mixture was added to the plant sample in the proportion of 1:10, respectively, and incubated for 30 minutes in the dark, after which the concentration of H₂O₂ was determined by absorbance at a wavelength of 595 nm using a tablet spectrophotometer M680 (Bio-Rad, Germany). The concentration of H₂O₂ was expressed in nmol per mg of protein. The analytical sample was a 1 g portion of the root of pea seedlings.

The effect of H₂O₂ on the activity of TACs and SACs in pea root cells. Plant samples of SACs/TACs containing 100–150 µg of protein/g of raw mass in 500 µl of the germination medium described above were made up to the following concentrations of H₂O₂: 100 nM, 260 nM, 2.6 µM and 26 µM. The reaction was allowed to progress for 30 minutes at 27 °C before being stopped by boiling in a water bath for 3 minutes.

Three biological replicates were performed in all experiments and the concentrations of cAMP and H₂O₂ were calculated from eight replicate analytical determinations. The experimental results were processed statistically in the SigmaPlot 12.3 program. The Student criterion (*t*) and the significance of differences between the experience variants (*P*) were estimated. The figures give the means and standard errors.

The work was performed with equipment located in the Common Use Center "Bioanalytica" using biological collections at the Common Use Center "Bioresource Center" of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry within the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Irkutsk).

RESULTS AND DISCUSSION

The endogenous concentration of H₂O₂ and cAMP in the root of a pea seedling infected with a mutualist and pathogens. The concentration of H₂O₂ in the homogenate from uninfected pea root cells was found to be in the range of 200–270 nmol/mg of protein. The most pronounced increase in the concentration of H₂O₂ content was observed in pea seedlings infected with *Rlv*, while the smallest effect was associated with infection with *Cms*. In these samples, infection with *Rlv* increased the content of cAMP, while infection with *Psp* decreased the content of cAMP to 86%. It is interesting to note that infection with the non-specific pathogen *Cms* gave

rise to a cAMP concentration 5 times greater than in the control (Fig. 1). The means and standard errors ($n = 3$; $P \leq 0.001$) are given.

The effect of the exogenous concentration of H_2O_2 on the activity of TACs and SACs *in vitro* from the roots of pea seedlings infected with a mutualist and pathogens. In the control, i.e. in the absence of biotic stress, the activity of SACs was dependent on the concentration of H_2O_2 : SACs were slightly activated at 100 nM of H_2O_2 (110% of the control), there was virtually no observed effect at 260 nM, and there was a pronounced reduction of activity, down to 70% of the control, at micromolar concentrations (2.6 and 26 μ M). The H_2O_2 had a similar effect on TAC activity: slightly reduced enzyme activity at 100 nM, and a maximum inhibitory effect at micromolar concentrations of H_2O_2 (Fig. 2). The means and standard errors ($n = 3$; $P \leq 0.001$) are given.

The effect of the exogenous concentration of H_2O_2 on the activity of TACs and SACs *in vitro* from the roots of pea seedlings infected with a mutualist and pathogens. In the control, i.e. in the absence of biotic stress, the activity of SACs was dependent on the concentration of H_2O_2 : SACs were slightly activated at 100 nM of H_2O_2 (110% of the control), there was virtually no observed effect at 260 nM, and there was a pronounced reduction of activity, down to 70% of the control, at micromolar concentrations (2.6 and 26 μ M). The H_2O_2 had a similar effect on TAC activity: slightly reduced enzyme activity at 100 nM, and a maximum inhibitory effect at micromolar concentrations of H_2O_2 (see Fig. 2). The means and standard errors ($n = 3$; $P \leq 0.001$) are given.

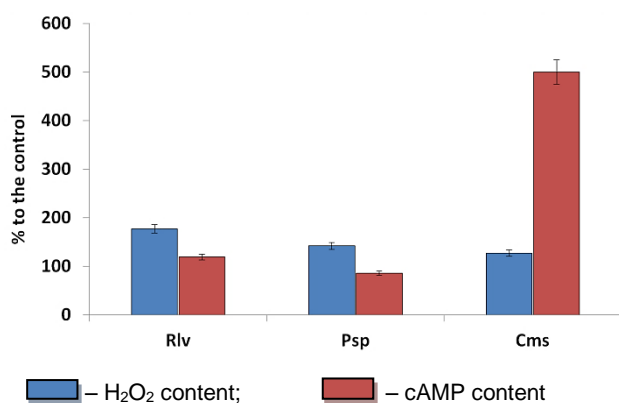


Fig. 1. Effect of infection with *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* (*Rlv*), *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*Psp*) and *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) on the content of H_2O_2 (% of control) and cAMP (% of control) in the root of pea seedlings. The control was seedlings germinated in water

Рис. 1. Влияние инфицирования *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* (*Rlv*)/*Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*Ps*)/*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) на содержание H_2O_2 (% к контролю) и цАМФ (% к контролю) в корне проростков гороха. Контролем служили проростки, инкубированные на воде

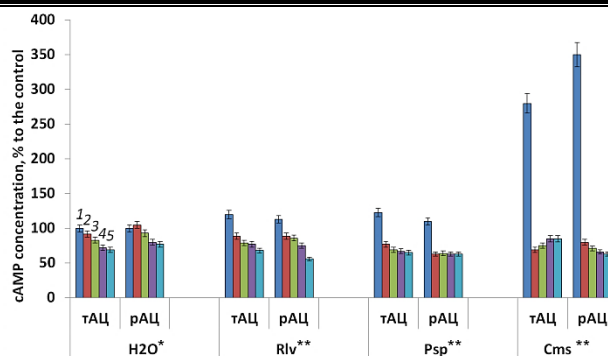


Fig. 2. Effect of various exogenous concentrations of H_2O_2 on TAC and SAC activity in the roots of pea seedlings infected with *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* (*Rlv*), *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*Psp*) and *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*): 1 – H_2O_2 ; 2 – 100 nM H_2O_2 ; 3 – 260 nM H_2O_2 ; 4 – 2,6 μ M H_2O_2 ; 5 – 26 μ M H_2O_2 . *sample 1 served as a control for samples 2–5; ***in vitro* adenylate cyclase samples isolated from uninfected pea seedlings served as a control for samples 1–5

Рис. 2. Влияние различных экзогенных концентраций H_2O_2 на активность тАЦ и рАЦ в корнях проростков гороха при инфицировании *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* (*Rlv*) / *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*Ps*)/*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*): 1 – H_2O_2 ; 2 – 100 нМ H_2O_2 ; 3 – 260 нМ H_2O_2 ; 4 – 2,6 мкМ H_2O_2 ; 5 – 26 мкМ H_2O_2 . *Контролем для образцов 2–5 служил образец 1; **контролем для образцов 1–5 служили образцы аденилатциклаз *in vitro*, выделенные из неинфицированных проростков гороха

Following a short-term, 5-min exposure to *Rlv*, the activity of SAC and TAC only slightly exceeded the activity in control specimens, 113 and 122%, respectively. The effect of infection with *Psp* had a similar effect on rhizobial infection. Following infection with *Cms*, the activity of SAC and TAC exceeded the activity in the control by 3 and 4 times, respectively (see Fig. 2).

The H_2O_2 concentration had a similar effect on the activity of SACs and TACs *in vitro*, in *Rlv*-inoculated cells of pea roots when compared with the control; however, a dose-dependent effect was observed under the following conditions: at 100 nM of H_2O_2 there was slightly reduced activity of both forms of the enzyme (90% of the control), and at 26 μ M their activity was inhibited by 50–60% (see Fig. 2). Following infection with *Psp*, there was an equivalent effect reducing the activity of SACs and TACs (68–70% of the control) at all concentrations of H_2O_2 in the study. A different effect was observed in the case of infection of pea seedlings with a non-specific pathogen, *Cms*. The lowest concentration of H_2O_2 studied (100 nM) inhibited TAC activity the most, but had an activating effect on SAC activity. On the contrary, micromolar concentrations of H_2O_2 (2.6 and 26 μ M) increased TAC activity and inhibited the activity of the soluble enzyme form (see Fig. 2).

It should be noted that the initial stages of pathogenic infection and legume-rhizobial symbiosis have many common features. One of the first non-specific protective reactions of plant cells to infection is an increase in the concentration of intracellular H_2O_2 [13, 14]. Similarly, it has been reported that the nodulation of the lateral roots of the tropical semi-aquatic plant *Sesbania rostrata* by the microsymbiont *Azorhizobium caulinodans* is accompanied by the generation of reactive oxygen species (ROS) initiated by the nod factor of the latter [15]. An increase in the concentration of H_2O_2 was detected when spring barley (*Hordeum vulgare* L.) was infected by a pathogenic strain of *Fusarium culmorum* [6]. We observed a similar effect in experiments after short-term inoculation of pea seedlings with *Rlv*, *Psp*, and *Cms* (see Fig. 1).

It is known that H_2O_2 in high concentrations can affect the lipid environment of membrane proteins, thereby affecting their functional activity [16, 17]. Millimolar concentrations of this compound can cause significant destruction of the structure of chloroplast membranes due to the very intensive peroxidation of membrane lipids [16]. In this experiment, lower, nanomolar and micromolar exogenous concentrations of H_2O_2 were studied; therefore, it is assumed that the observed effects on the activity of both forms of ACs are associated with conformational changes in the active centre of the enzyme localized outside the membrane (i.e. in the cytoplasm). This conclusion is supported by H_2O_2 concentration dependent changes in the activity of TACs and SACs, i.e. the observed dose-dependent effect (see Fig. 2). In addition, it is reported that H_2O_2 can oxidize some of the constituent amino acids (Arg, Pro, Lys, Met, Cys, Tyr, His) of enzymes leading to a change in the activity of the enzyme [18]. Although full amino acid sequencing of plant ACs has not yet been reported, the characterisation of the primary structure of protein fragments with AC activity has been reported [17, 18]. The proportion of amino acids which can be oxidized by H_2O_2 in the AC catalytic center (AtKUP71-100) in the multi-protein complex of K^+ -dependent permease 7 (AtKUP7) [19] and the AC (AtLRRAC1) in a complex with the receptor (NBS-LRR) [20] was determined to be 27 and 28% of constituent amino acids, respectively [18]. The susceptible amino acids include the amino acid pair Lys-Arg, which is responsible for the conversion of ATP to cAMP in the AC catalytic center [21]. Thus, it is highly likely that H_2O_2 affects the catalytic functions of this enzyme. Further work to provide additional supporting data has been planned to study the kinetic parameters of ACs in the presence of H_2O_2 .

It has already been shown that short-term infection of the roots of pea seedlings with *Rlv* and *Psp* led to a modulation of TAC and SAC activity and, consequently, to a change in the concentration of intracellular cAMP [3]. Thus, the enzyme activity had

already been modified when the enzymes were isolated from the infected roots of pea seedlings. In our experiments, ACs isolated from the infected tissues had already been exposed to H_2O_2 , as witnessed by an increased level of H_2O_2 in the cells of the root of pea seedlings (see Fig. 1). The observed slight decrease in the activity of ACs is probably due to the additive effect of endogenous and exogenous H_2O_2 . It is interesting to note the different effect on TACs and SACs in the experiments treated with *Rlv*+ H_2O_2 and *Psp*+ H_2O_2 , viz. similar activity levels of TACs were observed, whereas activity levels of SACs differed slightly. It can be assumed that in a very short time (5 min) the activity of TACs could be modified by nonspecific virulence factors of *Rlv* and *Psp* such as some polysaccharides and surface proteins of bacteria that are similar in nature to those of gram-negative bacteria [22]. At the same time, SAC activity can be modulated only indirectly, probably with the involvement of other second messengers. For example, the activation of SACs from beet cell vacuoles by calcium ions has been reported [9]. It can be assumed that a local increase in the concentration of H_2O_2 not only leads to a modulation of the activity of this enzyme form (see Fig. 2), but also causes a change in the concentration of other signaling molecules, and in particular, calcium ions. This is supported in the literature by reports of peroxide-dependent calcium ion channels found in many plant species, including pea [23]. It is obvious that the dynamics of the intracellular calcium pool is specific to the type of microorganism causing the infection. This dynamics is dependent on the nature of various types of ion channels, including activated cAMP. The lack of sensitivity of SACs to H_2O_2 after *Psp* infection may be related to this.

The completely different effect of infection with *Cms* followed by the addition of exogenous H_2O_2 on the activity of TACs and SACs is very interesting. *Cms* has a wide range of exopolysaccharides, which is a principal reason for its virulence. These exometabolites have a fairly acidic nature [24], which can lead to temporary, non-specific acidification of the extracellular space in plants [25]. A sharp decrease in the pH of the pericellular environment can lead to a change in the electrochemical potential of the cell membrane [26] further inducing change in the pool of various second messengers, including H_2O_2 . It can be assumed that this is the principal cause of the "preliminary" modification of the activity of AC *in vivo*, which subsequently affected the sensitivity of the AC to additional concentrations of H_2O_2 *in vitro* (see Fig. 2).

CONCLUSION

The activity of transmembrane and soluble adenylate cyclases from the root cells of pea seedlings can be dose-dependently modulated by H_2O_2 . The biotic stress phenomenon may be additionally affected by dosing with hydrogen peroxide.

REFERENCE

1. Kuzakova OV, Lomovatskaya LA, Goncharova AM., Romanenko AS. Influence of strains of different symbiotic efficacy *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* on changes in the concentration of cAMP and hydrogen peroxide in the cells of pea seedlings. *Fiziologiya rastenii*. 2019;66(5):360–366. (In Russian)
2. Jiang J, Fan LW, Wu WH. Evidences for involvement of endogenous cAMP in Arabidopsis defense responses to *Verticillium* toxins. *Cell Research*. 2005;15(8):585–592. <https://doi.org/10.1038/SJ.CR.7290328>
3. Lomovatskaya LA, Kuzakova OV, Romanenko AS, Goncharova AM. Adenylate cyclase activity and a change in cAMP concentration in pea seed root cells upon infection by mutualists and phytopathogens. *Fiziologiya rastenii*. 2018;65(4):310–320. (In Russian)
4. Bianchet C, Wong A, Quaglia M, Alqurashi M, Gehring C, Ntoukakis V, et al. An Arabidopsis thaliana leucine-rich repeat protein harbors an adenyl cyclase catalytic center and affects responses to pathogens. *Journal of Plant Physiology*. 2019;232:12–22. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.10.025>
5. Filinova NV, Lomovatskaya LA, Romanenko AS, Salyayev RK. Calcium as a modulator of adenylate cyclase activity of potato plant cells during bacterial pathogenesis. *Doklady Akademii nauk*. 2018;483(6):687–689. (In Russian) <https://doi.org/10.31857/S086956520003458-6>
6. Molodchenkova OO. The activity of NADPH oxidase, the content of hydrogen peroxide and salicylic acid in seedlings of spring barley with fusarium infection and the action of salicylic acid. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rastenii = Physiology and Biochemistry of Cultivated Plants*. 2009;41(4):321–326. (In Russian)
7. Tkachuk VA, Tyurin-Kuzmin PA, Belousov VV, Vorotnikov AV. Hydrogen peroxide as a new second messenger. *Biologicheskiye membrany*. 2012; 29(1-2):21–37. (In Russian)
8. Černý M, Habánová H, Berka M, Luklová M, Brzobohatý B. Hydrogen peroxide: its role in plant biology and crosstalk with signalling networks. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(9):2812. <https://doi.org/10.3390/ijms19092812>
9. Lomovatskaya LA, Romanenko AS, Rykun OV. Effect of Ca²⁺ and H₂O₂ on the change in cAMP level in vacuoles of beet root crops cells under biotic stress. *Biologicheskiye membrany*. 2014;31(3):194–203. (In Russian) <https://doi.org/10.7868/s0233475514020042>
10. Romanenko AS, Lomovatskaya LA, Shafikova TN, Borovskii GB, Krivolapova NV. Potato cell membrane receptors to ring rot pathogen extracellular polysaccharides. *Journal of Phytopathology*. 2003;151(1). 6 p. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00667.x>
11. Lomovatskaya LA, Romanenko AS, Filinova NV, Dudareva L.V. Determination of cAMP in plant cells by a modified enzyme immunoassay method. *Plant Cell Reports*. 2011;30(1):125–132. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0950-5>
12. Galletti R, Denoux C, Gambetta S, Dewdney J, Ausubel FM, De Lorenzo G, et al. The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in Arabidopsis is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*. 2008;148(3):1695–1706. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127845>
13. Glyan'ko AK, Vasil'eva GG. Reactive oxygen and nitrogen species in legume-rhizobial symbiosis: A review. *Applied biochemistry and microbiology*. 2010;46(1):15–22. <https://doi.org/10.1134/S00036838100010023>
14. Jamet A, Mandon K, Puppo A, Hérouart D. H₂O₂ is required for optimal establishment of the *Medicago sativa*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Journal of Bacteriology*. 2007;187(23):8741–8745. <https://doi.org/10.1128/JB.01130-07>
15. Suzuki N, Katano K. Coordination between ROS regulatory systems and other pathways under heat stress and pathogen attack. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:490. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00490>
16. Veselov AP, Chumankina EA, Markina IV. The effect of exogenous hydrogen peroxide on lipid peroxidation and antioxidant enzymes of isolated pea chloroplasts. *Vestnik of Lobachevsky University of Nizhni Novgorod*. 2001;1:164–167. (In Russian)
17. Lukatkin AS. Contribution of oxidative stress to the development of cold damage in the leaves of heat-loving plants. Damage to cell membranes during cooling of thermophilic plants. *Fiziologiya rastenii*. 2003;50(2):271–274. (In Russian)
18. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. 2003;25:207–218. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0011-2>
19. Al-Younis I, Wong A, Gehring G. The *Arabidopsis thaliana* K⁺-uptake permease 7 (AtKUP7) contains a functional cytosolic adenylate cyclase catalytic centre. *FEBS Letters*. 2015;589(24):3848–3852. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.11.038>
20. Chatukuta P, Dikobe TB, Kawadza DT, Sehlabane KS, Takundwa MM, Wong A, et al. An *Arabidopsis* clathrin assembly protein with a predicted role in plant defense can function as an adenylate cyclase. *Biomolecules*. 2018;8(2). 15 p. <https://doi.org/10.3390/biom8020015>
21. Gehring C. Adenyl cyclases and cAMP in plant signaling – past and present. *Cell Communication and Signaling*. 2010;8. 5 p. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-15>
22. Chang JH, Desveaux D, Creason AL. The ABCs and 123s of bacterial secretion systems in

plant pathogenesis. *Annual Review Phytopathology*. 2014;52:317–345. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-011014-015624>

23. Demidchik V. ROS-Activated ion channels in plants: biophysical characteristics, physiological functions and molecular nature. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(4):1263. <https://doi.org/10.3390/ijms19041263>

24. Eichenlaub R, Gartemann K-H. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens.

Annual Review Phytopathology. 2011;49:445–64. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095258>

25. Romanenko AS, Graskova IA, Rifel AA, Kopytchuk VN, Rachenko MA. Potato roots stabilization of the medium pH displaced by ring rot pathogen. *Fiziologiya rastenii*. 1996;43(5):707–712. (In Russian)

26. Pyatygin SS. Features of the signal role of action potential in higher plants. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2007;127(3):293–298. (In Russian)

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Кузакова О.В., Ломоватская Л.А., Гончарова А.М., Романенко А.С. Влияние различных по симбиотической эффективности штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* на изменение концентрации цАМФ и пероксида водорода в клетках проростков гороха // Физиология растений. 2019. Т. 66. N 5. С. 360–366. <https://doi.org/10.1134/s0015330319050129>

2. Jiang J., Fan L.W., Wu W.H. Evidences for involvement of endogenous cAMP in Arabidopsis defense responses to *Verticillium* toxins // *Cell Research*. 2005. Vol. 15. Issue 8. P. 585–592. <https://doi.org/10.1038/SJ.CR.7290328>

3. Ломоватская Л.А., Кузакова О.В., Романенко А.С., Гончарова А.М. Активность аденилатциклазы и изменение концентрации цАМФ в клетках корня проростков гороха при инфицировании мутуалистами и фитопатогенами // Физиология растений. 2018. Т. 65. N 4. С. 310–320. <https://doi.org/10.7868/S0015330318040073>

4. Bianchet C., Wong A., Quaglia M., Alqurashi M., Gehring C., Ntoukakis V., et al. An Arabidopsis thaliana leucine-rich repeat protein harbors an adenylyl cyclase catalytic center and affects responses to pathogens // *Journal of Plant Physiology*. 2019. Vol. 232. P. 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.10.025>

5. Филинова Н.В., Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Саяев Р.К. Кальций как модулятор активности аденилатциклазы клеток растений картофеля при бактериальном патогенезе // Доклады Академии наук. 2018. Т. 483. N 6. С. 687–689. <https://doi.org/10.31857/S086956520003458-6>

6. Молодченкова О.О. Активность НАДФН-оксидазы, содержание пероксида водорода и салициловой кислоты в проростках ярового ячменя при фузариозной инфекции и действии салициловой кислоты // Физиология и биохимия культурных растений. 2009. Т. 41. N 4. С. 321–326.

7. Ткачук В.А., Тюрин-Кузьмин П.А., Белоусов В.В., Воротников А.В. Пероксид водорода как новый вторичный посредник // Биологические мембраны. 2012. Т. 29. N 1-2. С. 21–37.

8. Černý M., Habánová H., Verka M., Luklová M., Brzobohatý V. Hydrogen peroxide: its role in plant biology and crosstalk with signalling networks // *International Journal of Molecular Sciences*. 2018.

Vol. 19. Issue 9. P. 2812. <https://doi.org/10.3390/ijms19092812>

9. Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Рыкун О.В. Влияние Ca²⁺ и H₂O₂ на изменение уровня цАМФ в вакуолях клеток корнеплодов столовой свеклы при биотическом стрессе // Биологические мембраны. 2014. Т. 31. N 3. С. 194–203. <https://doi.org/10.7868/s0233475514020042>

10. Romanenko A.S., Lomovatskaya L.A., Shafigova T.N., Borovskii G.B., Krivolapova N.V. Potato cell membrane receptors to ring rot pathogen extracellular polysaccharides // *Journal of Phytopathology*. 2003. Vol. 151. Issue 1. 6 p. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00667.x>

11. Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Filinova N.V., Dudareva L.V. Determination of cAMP in plant cells by a modified enzyme immunoassay method // *Plant Cell Reports*. 2011. Vol. 30. Issue 1. P. 125–132. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0950-5>

12. Galletti R., Denoux C., Gambetta S., Dewdney J., Ausubel F.M., De Lorenzo G., et al. The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in Arabidopsis is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea* // *Plant Physiology*. 2008. Vol. 148. Issue 3. P. 1695–1706. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127845>

13. Glyan'ko A.K., Vasil'eva G.G. Reactive oxygen and nitrogen species in legume-rhizobial symbiosis: A review // *Applied biochemistry and microbiology*. 2010. Vol. 46. Issue 1. P. 15–22. <https://doi.org/10.1134/S0003683810010023>

14. Jamet A., Mandon K., Puppo A., Hérouart D. H₂O₂ is required for optimal establishment of the *Medicago sativa*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis // *Journal of Bacteriology*. 2007. Vol. 187. Issue 23. P. 8741–8745. <https://doi.org/10.1128/JB.01130-07>

15. Suzuki N., Katano K. Coordination between ROS regulatory systems and other pathways under heat stress and pathogen attack // *Frontiers in Plant Science*. 2018. Vol. 9. P. 490. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00490>

16. Веселов А.П., Чуманкина Е.А., Маркина И.В. Влияние экзогенного пероксида водорода на липопероксидацию и ферменты антиоксидантной защиты изолированных хлоропластов гороха // Вестник Нижегородского университета

им. Н.И. Лобачевского. 2001. N 1. С.164–167.

17. Лукаткин А.С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. Повреждение клеточных мембран при охлаждении теплолюбивых растений // Физиология растений. 2003. Т. 50. N 2. С. 271–274.

18. Stadtman E.R., Levine R.L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins // Amino Acids. 2003. Vol. 25. P. 207–218. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0011-2>

19. Al-Younis I., Wong A., Gehring G. The *Arabidopsis thaliana* K⁺-uptake permease 7 (AtKUP7) contains a functional cytosolic adenylate cyclase catalytic centre // FEBS Letters. 2015. Vol. 589. Issue 24 (Pt B). P. 3848–3852. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.11.038>

20. Chatukuta P., Dikobe T.B., Kawadza D.T., Sehlabane K.S., Takundwa M.M., Wong A., et al. An *Arabidopsis* clathrin assembly protein with a predicted role in plant defense can function as an adenylate cyclase // Biomolecules. 2018. Vol. 8. N 2. 15 p. <https://doi.org/10.3390/biom8020015>

21. Gehring C. Adenyl cyclases and cAMP in plant signaling – past and present // Cell Communication and Signaling. 2010. Vol. 8. 5 p. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-15>

org/10.1186/1478-811X-8-15

22. Chang J.H., Desveaux D., Creason A.L. The ABCs and 123s of bacterial secretion systems in plant pathogenesis // Annual Review Phytopathology. 2014. Vol. 52. P. 317–345. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-011014-015624>

23. Demidchik V. ROS-Activated ion channels in plants: biophysical characteristics, physiological functions and molecular nature // International Journal of Molecular Sciences. 2018. Vol. 19. Issue 4. P.1263. <https://doi.org/10.3390/ijms19041263>

24. Eichenlaub R., Gartemann K.-H. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens // Annual Review Phytopathology. 2011. Vol. 49. P. 445–64. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095258>

25. Романенко А.С., Граскова И.А., Рифель А.А., Копытчук В.Н., Раченко М.А. Стабилизация корнями картофеля рН среды, смещаемого возбудителем кольцевой гнили // Физиология растений. 1996. Т. 43. N 5. С. 707–712.

26. Пятагин С.С. Особенности сигнальной роли потенциала действия у высших растений // Успехи современной биологии. 2007. Т. 127. N 3. С. 293–298.

Contribution

Olga V. Kuzakova, Lidia A. Lomovatskaya, Anatoly S. Romanenko, Alena M. Goncharova carried out the experimental work. The authors on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. All authors have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict interests

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

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

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Olga V. Kuzakova,
Cand. Sci. (Biology), Junior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry, SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ e-mail: titanic87@list.ru

Lidia A. Lomovatskaya,
Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry, SB RAS,

Критерии авторства

Кузакова О.В., Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Гончарова А.М. выполнили экспериментальную работу. Авторы совместно обобщили результаты, написали рукопись, имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Кузакова Ольга Васильевна,
к.б.н., младший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
✉ e-mail: titanic87@list.ru

Ломоватская Лидия Арнольдовна,
д.б.н., ведущий научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,

132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: lidal@sifibr.irk.ru

Anatoly S. Romanenko,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Chief Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry, SB RAS
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: rom@sifibr.irk.ru

Alena M. Goncharova,
Leading Engineer,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry, SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: alvlad87@mail.ru

664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
e-mail: lidal@sifibr.irk.ru

Романенко Анатолий Сидорович,
д.б.н., профессор,
главный научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
e-mail: rom@sifibr.irk.ru

Гончарова Алена Михайловна,
ведущий инженер,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
e-mail: alvlad87@mail.ru



Impact of cultivation conditions on xylanase production and growth in *Paenibacillus mucilaginosus*

© Dung T. Ha*, Albert V. Kanarsky*, Zosia A. Kanarskaya*,
Andrei V. Shcherbakov**, Elena N. Shcherbakova**, Andrey V. Pranovich***

*Kazan National Research Technological University, Kazan, Russian Federation

**All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

***Abo Academy, Finland

Abstract: Xylanase is an enzyme that hydrolyses β -1,4 bonds in plant xylan. This enzyme is applied in the bioconversion of agro-industrial waste for xylooligosaccharide hydrolysate production to improve digestibility and nutrition value of animal feed, food processing, the utilisation and faster decomposition of crop debris in soil, as well as in cellulose bleaching and other industries. The current trend focuses on using renewable resources, such as agricultural waste, as substitutes for expensive purified xylan in producer screening and xylanase synthesis. This work aimed to determine the impact of *Paenibacillus mucilaginosus* cultivation conditions on the xylanase production yield. Rice bran ferment lysate along with birch and beech timber xylans were used as a carbon source. Temperature, medium pH, pH correction factors, inoculant incubation time, carbon and nitrogen sources and concentrations were the studied criteria of xylanase biosynthesis and growth in bacteria *P. mucilaginosus* strain 560. We show that the xylanase biosynthesis and cultivation in *P. mucilaginosus* strain 560 are more practical and cost-effective with the use of a rice bran ferment lysate-based nutrient medium. Inductors contained in the rice bran ferment lysate improve the xylanase biosynthesis. Calcium ions also facilitate biosynthesis in the studied strain. Cultivation recommendations are: carbon source concentration in medium 0.5% of total reducing substances content; 0.2% carbamide as optimal nitrogen source; calcium hydroxide as an agent for medium pH correction to 6.0 ± 0.2 ; cultivation temperature 30 ± 1 °C. Under the specified conditions, cultivation of *P. mucilaginosus* does not require inoculate pre-processing, and a maximal xylanase activity in stationary culture reaches 20 U/mL.

Keywords: rice bran, birch, beech, xylan, *Paenibacillus mucilaginosus*, culturing, xylanase

Information about the article: Received February 20, 2020; accepted for publication August 31, 2020; available online September 30, 2020.

For citation: Kha TZ, Kanarskiy AV, Kanarskaya ZA, Scherbakov AV, Scherbakova EN, Pranovich AV. Impact of cultivation conditions on xylanase production and growth in *Paenibacillus mucilaginosus*. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):459–469. (In English) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-459-469>

УДК 57.013:57.014

Влияние условий культивирования на продуцирование ксиланазы и рост бактерий *Paenibacillus mucilaginosus*

Т.З. Ха*, А.В. Канарский*, З.А. Канарская*, А.В. Щербаков**,
Е.Н. Щербакова**, А.В. Пранович***

*Казанский национальный исследовательский технологический университет (КНИТУ),
г. Казань, Российская Федерация

** ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии (ВНИИСХМ),
г. Санкт-Петербург, Российская Федерация,

*** Або Академия, Финляндия

Резюме: Ксиланаза – фермент, гидролизующий β -1,4-связи в ксиланах. Этот фермент используется для получения из отходов агропромышленного комплекса гидролизата ксилоолигосахаридов с целью улучшения энергетической ценности и повышения усвояемости кормов для животных, обработки пищевых продуктов, утилизации и ускорения разложения поживных остатков в почве, а также в технологии отбелки целлюлозы и других областях. В настоящее время представляет интерес использование возобновляемых ресурсов, в частности, отходов сельскохозяйственного производства, в качестве субстрата вместо дорогого очищенного ксилана для скрининга продуцентов и выделения ксиланаз. Целью настоящей работы являлось определение влияния условий

культивирования бактерий *Paenibacillus tucilaginosus* на продуцирование ксиланаз. В качестве источника углерода использовали ферментолизат рисовой шелухи, ксилан, выделенный из березы и бука. Изучено влияние температуры, pH среды, факторов корректировки pH среды, продолжительности инкубации инокулята, источников углерода и азота, и также их концентраций на биосинтез ксиланаз и рост штамма 560 *P. tucilaginosus*. Установлено, что для биосинтеза ксиланазы культивирование штамма 560 *P. tucilaginosus* перспективно и экономически целесообразно проводить на питательной среде, приготовленной на основе ферментолизата рисовой шелухи. Присутствующие в составе ферментолизата рисовой шелухи индукторы улучшают биосинтез ксиланаз. Показано положительное влияние ионов кальция на биосинтез ксиланаз у рассматриваемого штамма. Рекомендуемые условия культивирования: концентрация источника углерода в питательной среде по общему количеству РВ – 0,5%; в качестве источника азота целесообразно использовать 0,2% карбамид; при корректировке pH среды до $6,0 \pm 0,2$ необходим гидроксид кальция; температура культивирования бактерий – 30 ± 1 °C. В указанных условиях культивирования *P. tucilaginosus* не требуется предварительного приготовления посевного материала, а максимальная активность синтезируемой ксиланазы в стационарной фазе роста бактерий достигает значения 20 ед./мл.

Ключевые слова: рисовая шелуха, береза, бук, ксилан, *Paenibacillus tucilaginosus*, культивирование, ксиланазы

Информация о статье: Дата поступления 20 февраля 2020 г.; дата принятия к печати 31 августа 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2020 г.

Для цитирования: Ха Т.З., Канарский А.В., Канарская З.А., Щербаков А.В., Щербакова Е.Н., Пранович А.В. Влияние условий культивирования на продуцирование ксиланазы и рост бактерий *Paenibacillus tucilaginosus*. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 3. С. 459–469. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-459-469>

INTRODUCTION

The second most abundant renewable natural polysaccharide after cellulose, xylan is a major hemicellulose of grain and wood [1]. This complex polysaccharide consists of β -1,4-xylopyranosyl residues chained through β -1,4-glycosidic bonds [2]. Side chains are linked to the backbone with β -(1→3)-glycosidic bonds. Some hydroxyl groups in xylose residues can be acetylated and attached with 4-O-methyl-D-glucuronic acid and L-arabinofuranose [2, 3]. The xylan structure varies depending on the plant taxon and extraction method [4].

Xylan is abundant in hardwood (15–30%) and conifer timber (7–10%). A high xylan content (about 30%) is found in straw, stems and other parts of annual plants and grasses (cereals, including sorghum, sugar cane cake, stems, cobs and husk of corn) [5]. Hardwood xylan is O-acetyl-4-O-methylglucuronoxylan. Conifer timber contains arabino-4-O-methylglucuronoxylan, which is distinguished from hardwood xylan by the absence of acetyl groups and presence of arabinofuranose branches. Grasses and annual plants usually possess arabinoxylans [6, 7]. Linear unsubstituted xylan was also found in esparto grass [8], tobacco [9] and some sea algae [10] and contains xylopyranosyl residues linked by 1,3- β - and 1,4- β -bonds [10, 11].

Xylans are the main antinutrient components of plant material that hamper nutrient absorption in the gastrointestinal tract of monogastric animals. Xylan is hydrolysed by xylanases (1,4- β -D-xylanases, EC 3.2.1.8) used for xylooligosaccharide (XOS) hydrolysate production from agricultural waste to improve digestibility and nutritive value of animal feed,

in food processing, in the utilisation and effective decomposition of crop debris in soil, as well as in cellulose bleaching and other industries [12]. Xylanases are the main endoenzymes hydrolysing β -1,4-bonds in xylan, the major hemicellulose polymer [13]. The current trend focuses on the use of renewable resources, such as agricultural waste, as substitutes for expensive purified xylan in producer screening and xylanase synthesis [14]. Fungi are known promising producers of xylanases. However, today's biotechnology opts for bacteria as primary xylanase producers, which are distinguished from mycelial fungi by a higher growth rate and effective production and absorption of carbon from various types of plant matter. Bacteria can also produce xylanase in large volumes and at moderate enzyme purification costs [15].

Paenibacillus bacteria are able to hydrolyse various carbohydrates and produce numerous extracellular enzymes, including xylanase. This xylan-degrading genus includes the species of *P. favisporus*, *P. phyllosphaerae*, *P. barcinonensis* and *P. panacisoli* [16–19]. Besides the benefits of their enzymatic action, the biomass and other products of *Paenibacillus* metabolism can supplement feed additives to replenish the diet of farm animals and birds with biologically active substances [20]. Sustainable growth in animal and poultry farming demands for the development of high-quality compound feeds containing enzyme additives. The Russian market is dominated by import fodder enzyme preparations, whereas their domestic production is very limited. The search for new efficient xylanase producer strains in the animal feed industry and the development of scalable fermentation technologies

for the substitution of imported fermented fodder preparations is a pressing issue.

The present work aimed to determine the impact of *Paenibacillus mucilaginosus* cultivation conditions on the xylanase production yield.

EXPERIMENTAL

Xylanase producer. Strain 560 of bacterium *P. mucilaginosus* was provided by the Russian Collection of Agricultural Microorganisms (RCAM, All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg).

Nutrient growth media. Submerged cultivation of *P. mucilaginosus* was carried out on the Alexandrov's nutrient medium modified as follows, %: NaCl – 0.02, K₂HPO₄ – 0.2, MgSO₄·7H₂O – 0.05, CaCO₃ – 0.01, (NH₄)₂SO₄ – 0.1, yeast extract – 0.1 [21].

Rice bran fibre ferment hydrolysate containing 0.5% of the total reducing substances (RS) content was used as a carbon source. The bran was pre-treated with 2.5% sodium hydroxide, with a solid-surface to sodium hydroxide saline ratio of 1:8, treatment temperature was 120±1 °C and treatment time 20 min. The fibre was then rinsed with tap water and exposed for 24 h to the Accellerase 1500 enzyme complex containing exoglucanase, endoglucanase, hemicellulase and beta-glucosidase at 55±1 °C, pH 5.5±0.3. This ferment lysate contained RS available for bacterial growth. Silicon-containing lye segregated from fibre was used as a medium pH correction factor.

Birchwood xylan was also used as a carbon source [22]. Xylan was extracted from birchwood chips (*Betula pendula*) through oxygen-free steaming at 150–155 °C and 0.60–0.65 MPa excess pressure. Xylan was precipitated from the resulting water extract by intensive vortexing in an ethanol/water solution (85:15) with overnight exposure for complete coagulation. After decantation, xylan precipitate was vacuum sieved with a filter paper (Black ribbon). Eluted xylan was vacuum dried at 40 °C for 48 h.

Beechwood xylan (Cath Roth) was used as a carbon source in comparison assays.

Nutrient medium was autoclaved at 120 °C and 1 atm. Sterile medium was corrected to neutral pH with calcium hydroxide. Cultivation was carried out with 250 mL Erlenmeyer flasks in 100 mL medium stirred continuously at 200 rpm on an ES-20 incubator shaker for 3 days at 30 °C. The flasks were inoculated at 5% relative to medium volume.

Experiments were designed as OFAT (One-Factor-At-a-Time). The OFAT approach was used to study the influence of cultivation conditions (substrate concentration, medium pH, temperature, inoculant incubation time, nitrogen source, nitrogen source concentration, carbon source) on the growth and metabolic yield in *P. mucilaginosus* bacteria. The method varies one tested factor per trial, while leaving the others constant [23]. The OFAT experimental design is detailed in Table 1.

Table 1. Experimental design
Таблица 1. Планирование эксперимента

Experiment number	Substrate concentration, %	Temperature, °C	pH corrector	pH	Carbon source	Inoculate Incubation time, h	Nitrogen source and concentration
1	0.25; 0.5; 0.75; 1	30	Calcium hydroxide	7	Rice bran ferment lysate	24	0.1% (NH ₄) ₂ SO ₄ + 0.1% yeast extract
2	Opt. value as in Trial 1	25, 30, 35	Calcium hydroxide	7	Rice bran ferment lysate	24	0.1% (NH ₄) ₂ SO ₄ + 0.1% yeast extract
3	Opt. value as in Trial 1	Opt. value as in Trial 2	Calcium hydroxide, sodium hydroxide, Si-containing lye	7	Rice bran ferment lysate	24	0.1% (NH ₄) ₂ SO ₄ + 0.1% yeast extract
4	Opt. value as in Trial 1	Opt. value as in Trial 2	Opt. value as in Trial 3	6, 7, 8, 9	Rice bran ferment lysate	24	0.1% (NH ₄) ₂ SO ₄ + 0.1% yeast extract
5	Opt. value as in Trial 1	Opt. value as in Trial 2	Opt. value as in Trial 3	Opt. value as in Trial 4	Rice bran ferment lysate, birch xylan, beech xylan	24	0.1% (NH ₄) ₂ SO ₄ + 0.1% yeast extract
6	Opt. value as in Trial 1	Opt. value as in Trial 2	Opt. value as in Trial 3	Opt. value as in Trial 4	Opt. value as in Trial 5	0, 12, 24, 36, 48	0.1% (NH ₄) ₂ SO ₄ + 0.1% yeast extract
7	Opt. value as in Trial 1	Opt. value as in Trial 2	Opt. value as in Trial 3	Opt. value as in Trial 4	Opt. value as in Trial 5	Opt. value as in Trial 6	Total concentration 0.2%
8	Opt. value as in Trial 1	Opt. value as in Trial 2	Opt. value as in Trial 3	Opt. value as in Trial 4	Opt. value as in Trial 5	Opt. value as in Trial 6	0; 0.02; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4% of opt. nitrogen source in Trial 7

Trial 1 assessed the xylanase activity and growth parameters of *P. mucilaginosus* strain 560 under rice bran ferment lysate concentrations varying from 0.25 to 1% total RS. Temperature, pH, inoculate incubation time, nitrogen sources and consumption rate were set constant. The RS concentration in ferment lysate corresponding to the maximal xylanase activity and optimal growth parameters in Trial 1 was fixed downstream in Trial 2, which tested the effect of temperature on bacterial growth and xylanase yield under other fixed parameters (pH, incubation time, nitrogen source and consumption rate). Trials 3–8 are designed likewise by varying one cultivation parameter at a time.

Assessment of growth parameters. Specific growth rate, bacterial biomass generation time and total yield were estimated as recommended in [24]. Biomass was pelleted by centrifugation with a 5418 R Eppendorf microcentrifuge at 12,000 rpm for 10 min. Biomass yield was determined thermogravimetrically with an MX-50 moisture analyser.

Assessment of xylanase activity. The xylanase activity and residual RS content of undegraded carbohydrates in supernatant after a 12, 24, 48 and 72-h submerged cultivation of *P. mucilaginosus* were measured by adding concentrated sulfuric acid in the ratio 1:1. Enzymatic activity was measured as in [25], with certain modifications. Xylanase activity was assessed with a 1% beechwood xylan substrate (1 g of xylan per 100 mL of acetate buffer, pH 6). Enzymatic activity was measured relative to the RS value [26]. The measurement procedure was as follows: 0.12 mL of supernatant with 1.2 mL of substrate were incubated for 1 h at 50 °C followed by the addition of 0.6 mL of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS reagent). In the control, 1.2 mL of substrate was mixed with 0.6 mL of DNS reagent and 0.12 mL of supernatant. Tubes with the substrate, culture medium and DNS reagent were boiled in a water bath for 10 min, cooled down and 6 mL of distilled water was added before optical density measurement at 540 nm. One xylanase activity unit was defined as the amount of enzyme needed to hydrolyse 1 g of substrate (30% of reaction total) to monosugars in 1 h under assumed pH and temperature.

Trials were in the form of biological and analytical assays performed in triplicate, and statistical analyses were performed using the MS Excel 2010 and Prism 7 software.

DISCUSSION

Effect of substrate concentration on growth and xylanase biosynthesis. Cost-efficient and therefore practical sources of carbon are substrates derived from recycled plant matter, such as crop debris and timber stands. Grain husk, straw, bran and wood shavings are typically rich in xylans.

Our trials demonstrate an impact of the substrate concentration, such as rice bran ferment lysate, on the growth and secreted xylanase activity in *P. mucilaginosus* strain 560. Higher substrate con-

centrations corresponded to a higher enzyme activity (Fig. 1, a), lower generation time and increased specific growth rate in bacteria (Table 2). Maximal xylanase activity reached 7.66 U/mL after 24 h of cultivation, with the total rice bran ferment lysate RS value of 0.5%, effective growth conditions and maximal biomass yield of 40%.

Effect of cultivation temperature. In 0.5% ferment lysate medium trials, a cultivation temperature of 30±1 °C facilitated both effective xylanase production and optimal bacterial growth (Fig. 1, b). A higher temperature of 35 °C was associated with a higher specific growth rate and 2-fold reduced generation time compared to culturing at 25 °C, and 1.5-fold reduction compared with 30 °C. However, the biomass yield at 25 or 35 °C diminished compared with culturing at 30 °C (see Table 2).

The effect of medium pH. Xylanase activity and growth in *P. mucilaginosus* was significantly influenced by the nutrient medium pH (Fig. 2) and pH correction factors. Table 2 shows that noncrystalline silicon-containing lye as a pH corrector facilitates bacterial growth and increases the specific growth rate. However, the use of silicon-containing lye or sodium hydroxide correctors was associated with a lower xylanase activity and reduced biomass yield (Fig. 2, a; see Table 2).

A maximal yield was observed with calcium hydroxide (see Table 2), which is likely explained by the regulatory role calcium ions play in many cellular processes. Calcium is a known stabilising factor in the outer lipopolysaccharide membrane and cellular wall in Gram-negative bacteria [27] and a stimulator of bacterial protein biosynthesis resulting in higher biomass yield and enzyme activity [28]. A maximal xylanase activity of 11 U/mL was observed after a 48 h cultivation of *P. mucilaginosus* on a calcium hydroxide-corrected medium (see Fig. 2, a), which may be related to the calcium-mediated stabilisation and regulation of the enzyme activity [29–31].

The calcium hydroxide adjustment of the medium's pH from 6 to 9 resulted in the arrest of bacterial growth at pH 9. Adding calcium hydroxide for pH adjustment of 6 to 8 accelerated the specific growth rate and had a 2-fold reduction on generation time (6 h at pH 6 vs. 3 h at pH 8, see Table 2).

This result conforms with another study [32], where the growth of rhizobacteria is shown to be co-affected by pH and calcium ion concentrations. In our trials, a maximal biomass yield of 38% is observed at a neutral medium pH of 7.0 (see Table 2). The maximal xylanase activity reaches 15 U/mL under pH 6.0 following a 48h cultivation on a rice bran ferment lysate medium (Fig. 2, b).

Effect of carbon source. Cultivation trials with various carbon sources demonstrated a peak biomass accumulation (about 60%) with beechwood xylan (see Table 2).

Rice bran ferment lysate was identified as the most effective source of carbon for xylanase produc-

Table 2. Effect of cultivation conditions on growth kinetics in *P. mucilaginosus* strain 560

Таблица 2. Влияние условий культивирования на кинетические параметры роста штамма 560 бактерий *P. mucilaginosus*

Parameter	Range	Specific growth rate, h ⁻¹	Generation time, h	Biomass yield, %
Substrate concentration, %	0.25	0.17±0.05	4.10±0.59	37.68±2.62
	0.5	0.22±0.03	3.09±0.41	40.11±2.83
	0.75	0.26±0.05	2.71±0.25	32.09±2.65
	1	0.23±0.05	2.96±0.30	33.13±2.63
Temperature, °C	25	0.11±0.04	6.45±0.66	18.26±1.52
	30	0.15±0.03	4.54±0.48	38.48±2.72
	35	0.24±0.03	2.86±0.14	26.55±3.02
pH correction factor	Calcium hydroxide	0.21±0.02	3.29±0.27	29.23±2.69
	Sodium hydroxide	0.31±0.04	2.25±0.27	18.92±1.45
	Si-containing lye	0.45±0.04	1.54±0.12	17.20±1.65
pH	6	0.11±0.01	6.89±0.57	19.24±2.02
	7	0.15±0.03	4.54±0.18	38.48±2.67
	8	0.20±0.05	3.52±0.10	19.91±1.82
Carbon source	Birchwood xylan	0.16±0.02	4.24±0.55	44.57±2.85
	Beechwood xylan	0.20±0.03	3.48±0.25	59.43±3.02
	Rice bran ferment lysate	0.21±0.02	3.29±0.27	39.23±2.12
Inoculate incubation time, h	0	0.16±0.03	4.36±0.12	43.30±2.63
	12	0.15±0.03	4.57±0.15	34.43±2.70
	24	0.09±0.01	7.47±0.81	21.38±2.22
	36	0.10±0.01	6.77±0.70	33.75±2.68
	48	0.13±0.02	5.55±0.71	56.16±3.08
Nitrogen source	No nitrogen	0.12±0.01	5.84±0.61	16.68±1.82
	NH ₄ NO ₃	0.19±0.02	3.72±0.22	22.40±2.12
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.19±0.02	3.63±0.20	25.57±2.07
	Yeast extract	0.11±0.01	6.68±0.25	33.16±2.82
	(NH ₄) ₂ SO ₄ + yeast extract	0.15±0.01	4.67±0.53	37.10±2.68
	Corn extract	0.06±0.01	12.17±0.74	49.31±2.64
	Pepton	0.15±0.01	4.68±0.46	29.87±2.12
	Carbamide	0.17±0.03	4.08±0.46	15.29±1.92
	Betafin	0.23±0.05	3.00±0.47	11.39±1.22
Carbamide content, %	0.02	0.21±0.04	3.25±0.36	29.18±2.27
	0.1	0.16±0.01	4.33±0.45	18.88±1.62
	0.2	0.15±0.01	4.51±0.35	15.21±1.65
	0.3	0.08±0.01	8.84±0.70	10.44±1.60

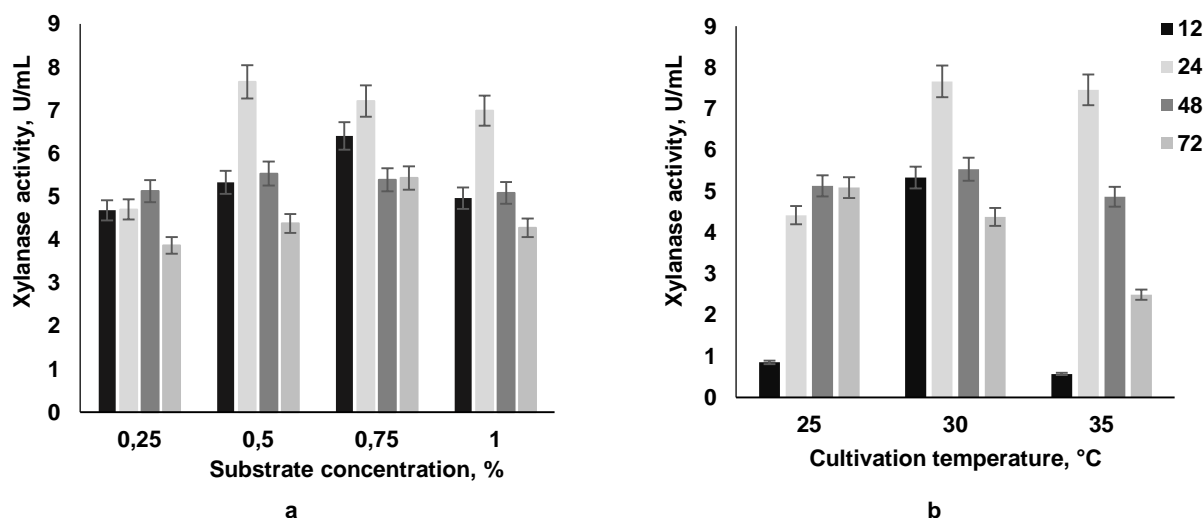


Fig. 1. Effect of rice bran ferment lysate carbohydrate concentration (a) and cultivation temperature (b) on xylanase activity (U/mL) in *P. mucilaginosus* strain 560

Рис. 1. Влияние концентрации углеводов в ферментализате рисовой шелухи (а) и температуры культивирования (б) на ксиланазную активность (ед./мл) штамма 560 *P. mucilaginosus*

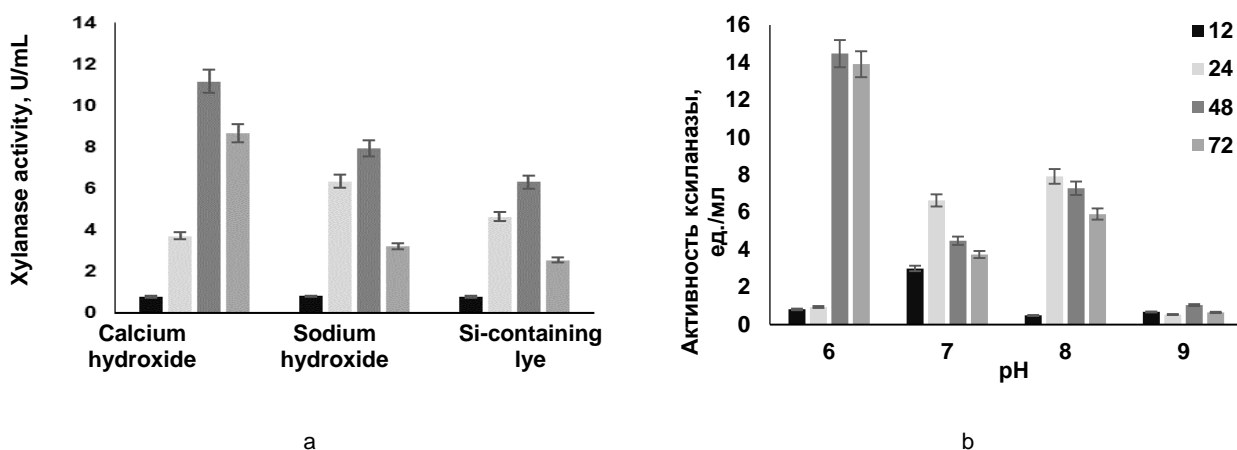


Fig. 2. Effect of pH correction factors (a) and acidity (b) on xylanase activity (U/mL) in *P. mucilaginosus* strain 560

Рис. 2. Влияние факторов корректировки pH среды (a) и кислотности среды (b) на ксиланазную активность (ед./мл) штамма 560 бактерий *P. mucilaginosus*

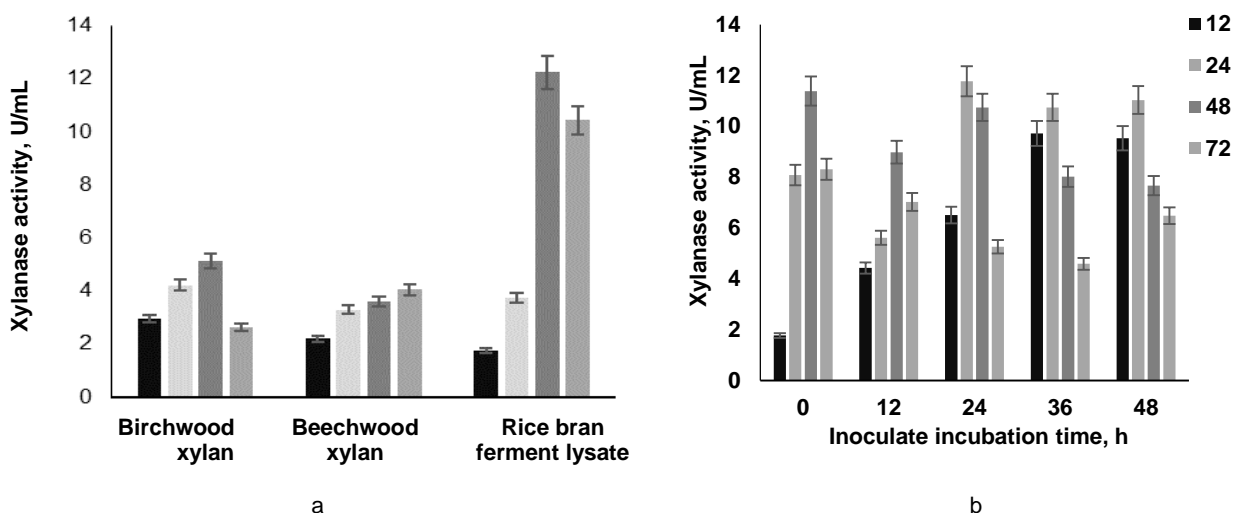


Fig. 3. Effect of xylan source (a) and incubation time (b) on xylanase activity (U/mL) in *P. mucilaginosus* strain 560

Рис. 3. Влияние источника ксилана (a) и продолжительности инкубации инокулята (b) на ксиланазную активность (ед./мл) штамма 560 бактерий *P. mucilaginosus*

tionin bacteria *P. mucilaginosus* strain 560 (Fig. 3, a). This observation may relate to the presence of specific inductors produced in the partial hydrolysis of ferment lysate, which boost the xylanase biosynthesis as reported by [33] in experiments examining fungal xylanase production in *Aspergillus* and *Trichoderma*. As shown in [34], specific inductor substances play a key role in xylanase biosynthesis regulation. Among those are xylose, xylobiose, xylooligosaccharides, xylose heterodisaccharides and their positional isomers formed during the enzymatic hydrolysis of rice bran fibre. Inoculate incubation time under the trial conditions was found to have an insignificant effect on bacterial growth and xylanase production (Fig. 3, b; see Table 2). Accordingly, the inoculum pre-treatment is not required for experimental assays.

Effect of nitrogen source and concentration. Trials with various nitrogen sources demonstrated a maximal xylanase activity after a 48 h cultivation with carbamide supplemented medium (Fig. 4, a). A carbamide content of 0.2% increased the xylanase activity by 2–4 times compared to the control (no nitrogen) (Fig. 4, b). Under optimal cultivation conditions, the maximum xylanase activity in the stationary phase reached 20 U/mL, giving a 2-fold increase compared to *P. campinasensis* BL11 cultured under optimal conditions on a lye-treated rice bran-straw lysate medium (xylanase 10.5 U/mL) [35].

A combined application of ammonium sulphate and yeast extract in the medium increased the *P. mucilaginosus* biomass yield (see Table 2).

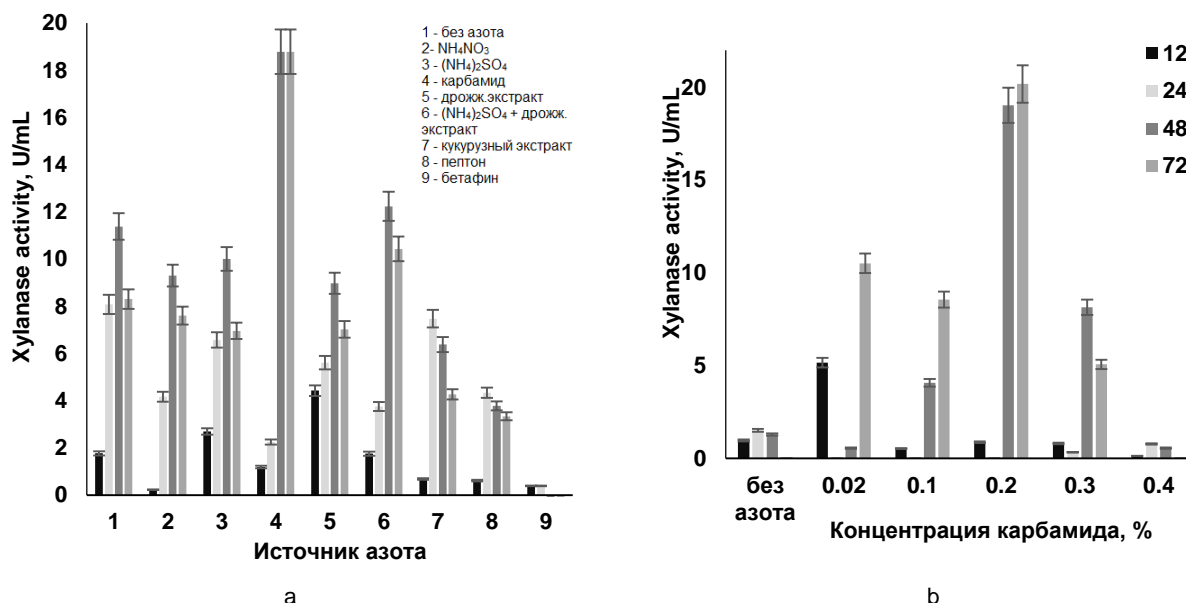


Fig. 4. Effect of nitrogen source (a) and concentration (b) in medium on xylanase activity (U/mL) in *P. mucilaginosus* strain 560

Рис. 4. Влияние источника азота на ксиланазную активность (ед./мл) штамма 560 бактерий *P. mucilaginosus*: а – источник азота; б – концентрация источника азота в питательной среде

CONCLUSIONS

We identify the rice bran ferment lysate-based nutrient medium as optimal for the xylanase production in *P. mucilaginosus* strain 560. Calcium supplementation positively affects bacterial growth and xylanase biosynthesis. Recommended cultivation conditions are: carbon source concentration in the

medium of 0.5% of total RS content; 0.2% carbamide as the optimal nitrogen source; calcium hydroxide as medium pH corrector to 6.0±0.2; cultivation temperature 30±1 °C. These conditions do not require inoculate pre-treatment of *P. mucilaginosus* strain 560, and a maximal xylanase activity reaches 20 U/mL in stationary culture.

REFERENCES

- Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005;29(1):3–23. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>
- Sedlmeyer FB. Xylan as a by-product of bio-refineries: characteristics and potential use for food applications. *Food Hydrocolloids*. 2014;25(8):1891–1898. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2011.04.005>
- Shanthi V, Roymon MG. Isolation and screening of alkaline thermostable xylanase producing bacteria from soil in Bhilai Durg region of Chhattisgarh, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2014;3(8):303–311.
- Habibi Y, Vignon MR. Isolation and characterization of xylans from seed pericarp of *Argania spinosa* fruit. *Carbohydrate Research*. 2005;340(7):1431–1436. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.01.039>
- Singh S, Madlala AM, Prior BA. *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiology Reviews*. 2003;27(1):3–16. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00018-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00018-4)
- Kulkarni N, Shendye A, Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 1999;23(4):411–456. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00407.x>
- Fengel D, Wegener G. *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Berlin. Walter de Gruyter, 1984 (Russ ed.: Fengel D, Vegener G. Drevesina. *Химия. Ультраструктура. Реакции*. Moscow: Lesnaya promyshlennost': 1988. 511 p.)
- Chanda SK, Hirst EL, Jones JKN, Percival EGV. 262. The constitution of xylan from esparto grass (*Stipa tenacissima*, L.). *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. 1950:1289–1297. <https://doi.org/10.1039/JR9500001289>
- Eda S, Ohnishi A, Katō K. Xylan isolated from the stalk of *Nicotiana tabacum*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1976;40(2):359–364.
- Barry VC, Dillon T. Occurrence of xylans in marine algae. *Nature*. 1940;146(3706):620–620. <https://doi.org/10.1038/146620a0>
- Percival EGV, Chanda SK. The xylan of *Rhodomenia palmate*. *Nature*. 1950;166(4227):787–788. <https://doi.org/10.1038/166787b0>
- Kaur A, Singh A, Patra AK, Mahajan R. Cost-effective scouring of flax fibers using cellulase-free xylano-pectinolytic synergism from a bacterial isolate. *Journal of Cleaner Production*. 2016;131:107–111. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.05.069>

13. Akin DE. Plant cell wall aromatics: influence on degradation of biomass. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2008;2:288–303. <https://doi.org/10.1002/bbb.76>
14. Kaur A, Mahajan R, Singh A, Garg G, Sharma J. A novel and cost effective methodology for qualitative screening of alkalothermophilic cellulase free xylano-pectinolytic microorganisms using agricultural wastes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011;27:459–463. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0457-9>
15. Subramaniyan S, Prema P. Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology and application. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2002;22(1):33–64. <https://doi.org/10.1080/07388550290789450>
16. Velázquez E, de Miguel T, Poza M, Rivas R, Rosselló-Mora R, Villa TG. *Paenibacillus favisporus* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from cow faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004;54(1):59–64. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02709-0>
17. Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E. *Paenibacillus phyllosphaerae* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from the phyllosphere of Phoenix dactylifera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005;55(2):743–746. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63323-0>
18. Sánchez MM, Fritze D, Blanco A, Spröer C, Tindall BJ, Schumann P, et al. *Paenibacillus barcinonensis* sp. nov., a xylanase-producing bacterium isolated from a rice field in the Ebro River delta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005;55(2):935–939. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63383-0>
19. Ten LN, Baek SH, Im WT, Lee M, Oh HW, Lee ST. *Paenibacillus panacisoli* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from soil in a ginseng field in South Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2006;56(11):2677–2681. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.64405-0>
20. Rafikova GF, Loginova EV, Melentev AI, Loginov ON. *Biological basis of microbial fodder additive*. Patent RF, no. 2 662 931, 2018. (In Russian)
21. Li X, Yang SH, Yu XC, Jin ZX, Li WD, Li L, et al. Construction of transgenic *Bacillus mucilaginosus* strain with improved phytase secretion. *Journal of Applied Microbiology*. 2005;99(4):878–884. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02683.x>
22. Von Schoultz S, AB BLN-WOODS LTD. *Method for extracting biomass*. U.S. Patent Application. 14/413,409. 2015. <https://doi.org/10.1080/00031305.1999.10474445>
23. Czitrom V. One-factor-at-a-time versus designed experiments. *The American Statistician*. 1999;53(2):126–131.
24. Maier RM. *Environmental microbiology* (second edition). Chapter 3. *Bacterial growth*. Elsevier Inc. 2009. P. 37–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00003-1>
25. Bailey M, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*. 1992;23(3):257–270. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90074-J](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90074-J)
26. Morozova YuA., Skvortsov EV, Alimova FK, Kanarsky AV. Biosynthesis of xylanases and cellulases by fungi *Trichoderma* on the post-alcohol bard. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta = Bulletin of Kazan Technological University*. 2012;15(19):120–122. (In Russian)
27. Dias FE, Okrend H, Dondero NC. Growth-promoting activity of spent sulfite liquor for *Sphaerotilus natans* growing in a continuous-flow apparatus. *Applied Microbiology*. 1968;16(2):276–278. <https://doi.org/10.1128/aem.16.2.276-278.1968>
28. Patrauchan MA, Sarkisova S, Sauer K, Franklin MJ. Calcium influences cellular and extracellular product formation during biofilm-associated growth of a marine *Pseudoalteromonas* sp. *Microbiology*. 2005;151(9):2885–2897. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28041-0>
29. Lamed R, Setiter E, Bayer EA. Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. *Journal of Bacteriology*. 1983;156(2):828–836. <https://doi.org/10.1128/JB.156.2.828-836.1983>
30. Grepinet O, Chebrou MC, Beguin P. Nucleotide sequence and deletion analysis of the xylanase gene (xynZ) of *Clostridium thermocellum*. *Journal of Bacteriology*. 1988;170(10):4582–4588. <https://doi.org/10.1128/jb.170.10.4582-4588.1988>
31. Ratanakhanokchai K, Kyu KL, Tanticharoen M. Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999;65(2):694–697. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.2.694-697.1999>
32. Howieson JG, Robson AD, Abbott LK. Calcium modifies pH effects on acid-tolerant and acid-sensitive strains of *Rhizobium meliloti*. *Australian Journal of Agricultural Research*. 1992;43(3):765–772. <https://doi.org/10.1071/AR9920765>
33. Haltrich D, Nidetzky B, Kulbe KD, Steiner W, Župančič S. Production of fungal xylanases. *Biore-source Technology*. 1996;58(2):137–161. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(96\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00094-6)
34. Kulkarni N, Shendye A, Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 1999;23(4):411–456. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00407.x>
35. Ko C-H, Lin Z-P, Tu J, Tsai C-H, Liu C-C, Chen H-T, et al. Xylanase production by *Paenibacillus campinasensis* BL11 and its pretreatment of hardwood kraft pulp bleaching. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2010;64(1):13–19. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.10.001>

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Collins T., Gerday C., Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases // FEMS Microbiology Reviews. 2005. Vol. 29. Issue 1. P. 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>
2. Sedlmeyer F.B. Xylan as a by-product of biorefineries: characteristics and potential use for food applications // Food Hydrocolloids. 2014. Vol. 25. Issue 8. P. 1891–1898. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2011.04.005>
3. Shanthi V., Roymon M.G. Isolation and screening of alkaline thermostable xylanase producing bacteria from soil in Bhilai Durg region of Chhattisgarh, India // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2014. Vol. 3. Issue 8. P. 303–311.
4. Habibi Y., Vignon M.R. Isolation and characterization of xylans from seed pericarp of *Argania spinosa* fruit // Carbohydrate Research. 2005. Vol. 340. Issue 7. P. 1431–1436. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.01.039>
5. Singh S., Madlala A.M., Prior B.A. *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases // FEMS Microbiology Reviews. 2003. Vol. 27. Issue 1. P. 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00018-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00018-4)
6. Kulkarni N., Shendye A., Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases // FEMS Microbiology reviews. 1999. Vol. 23. Issue 4. P. 411–456. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00407.x>
7. Фенгел Д., Вегенер Г. Древесина. Химия. Ультроструктура. Реакции / пер. с англ. А.В. Оболенской, З.П. Ельницкой; под ред. А.А. Леоновича. М.: Лесная промышленность, 1988. 511 с.
8. Chanda S.K., Hirst E.L., Jones J.K.N., Percival E.G.V. 262. The constitution of xylan from esparto grass (*Stipa tenacissima*, L.) // Journal of the Chemical Society (Resumed). 1950. P. 1289–1297. <https://doi.org/10.1039/JR9500001289>
9. Eda S., Ohnishi A., Katō K. Xylan isolated from the stalk of *Nicotiana tabacum* // Agricultural and Biological Chemistry. 1976. Vol. 40. Issue 2. P. 359–364.
10. Barry V.C., Dillon T. Occurrence of xylans in marine algae // Nature. 1940. Vol. 146. Issue 3706. P. 620–620. <https://doi.org/10.1038/146620a0>
11. Percival E.G.V., Chanda S.K. The xylan of *Rhodomenia palmate* // Nature. 1950. Vol. 166. Issue 4227. P. 787–788. <https://doi.org/10.1038/166787b0>
12. Kaur A., Singh A., Patra A.K., Mahajan R. Cost-effective scouring of flax fibers using cellulase-free xylano-pectinolytic synergism from a bacterial isolate // Journal of Cleaner Production. 2016. Vol. 131. P. 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.05.069>
13. Akin D.E. Plant cell wall aromatics: influence on degradation of biomass // Biofuels, Bioproducts and Biorefining. 2008. Vol. 2. P. 288–303. <https://doi.org/10.1002/bbb.76>
14. Kaur A., Mahajan R., Singh A., Garg G., Sharma J. A novel and cost effective methodology for qualitative screening of alkalothermophilic cellulase free xylano-pectinolytic microorganisms using agricultural wastes // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2011. Vol. 27. P. 459–463. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0457-9>
15. Subramaniyan S., Prema P. Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology and application // Critical Reviews in Biotechnology. 2002. Vol. 22. Issue 1. P. 33–64. <https://doi.org/10.1080/07388550290789450>
16. Velázquez E., de Miguel T., Poza M., Rivas R., Rosselló-Mora R., Villa T.G. *Paenibacillus favisporus* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from cow faeces // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2004. Vol. 54. Issue 1. P. 59–64. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02709-0>
17. Rivas R., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Velázquez E. *Paenibacillus phyllosphaerae* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from the phyllosphere of *Phoenix dactylifera* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2005. Vol. 55. Issue 2. P. 743–746. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63323-0>
18. Sánchez M.M., Fritze D., Blanco A., Spröer C., Tindall B.J., Schumann P., et al. *Paenibacillus barcinonensis* sp. nov., a xylanase-producing bacterium isolated from a rice field in the Ebro River delta // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2005. Vol. 55. Issue 2. P. 935–939. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63383-0>
19. Ten L.N., Baek S.H., Im W.T., Lee M., Oh H.W., Lee S.T. *Paenibacillus panacisoli* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from soil in a ginseng field in South Korea // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2006. Vol. 56. Issue 11. P. 2677–2681. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.64405-0>
20. Пат. № 2662931, Российская Федерация, С12N 1/20, С12N 9/00. Биологическая основа микробной кормовой добавки / Г.Ф. Рафикова, Логинова Е.В., Мелентьева А.И., Логинов О.Н.; заявл. 22.02.2017; опубл. 31.07.2018.
21. Li X., Yang S.H., Yu X.C., Jin Z.X., Li W.D., Li L., et al. Construction of transgenic *Bacillus mucilaginosus* strain with improved phytase secretion // Journal of Applied Microbiology. 2005. Vol. 99. Issue 4. P. 878–884. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02683.x>
22. Von Schoultz S., AB BLN-WOODS LTD. Method for extracting biomass. U.S. Patent Application. 14/413,409. 2015. <https://doi.org/10.1080/00031305.1999.10474445>
23. Czitrom V. One-factor-at-a-time versus de-

signed experiments // The American Statistician. 1999. Vol. 53. Issue 2. P. 126–131.

24. Maier R.M. Environmental microbiology (second edition). Chapter 3. Bacterial Growth. Elsevier Inc. 2009. P. 37–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00003-1>

25. Bailey M., Biely P., Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity // Journal of Biotechnology. 1992. Vol. 23. Issue 3. P. 257–270. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90074-J](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90074-J)

26. Морозова Ю.А., Скворцов Е.В., Алимова Ф.К., Канарский А.В. Биосинтез ксиланаз и целлюлаз грибами рода *Trichoderma* на послеспиртовой барде // Вестник Казанского технологического университета. 2012. Vol. 15. N 19. P. 120–122.

27. Dias F.E., Okrend H., Dondero N.C. Growth-promoting activity of spent sulfite liquor for *Sphaerotilus natans* growing in a continuous-flow apparatus // Applied Microbiology. 1968. Vol. 16. Issue 2. P. 276–278. <https://doi.org/10.1128/aem.16.2.276-278.1968>

28. Patrauchan M.A., Sarkisova S., Sauer K., Franklin M.J. Calcium influences cellular and extracellular product formation during biofilm-associated growth of a marine *Pseudoalteromonas* sp. // Microbiology. 2005. Vol. 151. Issue 9. P. 2885–2897. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28041-0>

29. Lamed R., Setiter E., Bayer E.A. Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum* // Journal of Bacteriology. 1983. Vol. 156. Issue 2. P. 828–836. <https://doi.org/10.1128/JB.156.2.828-836.1983>

30. Grepinet O., Chebrou M.C., Beguin P. Nu-

cleotide sequence and deletion analysis of the xylanase gene (*xynZ*) of *Clostridium thermocellum* // Journal of Bacteriology. 1988. Vol. 170. Issue 10. P. 4582–4588. <https://doi.org/10.1128/jb.170.10.4582-4588.1988>

31. Ratanakhanokchai K., Kyu K.L., Tanticharoen M. Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1 // Applied and Environmental Microbiology. 1999. Vol. 65. Issue 2. P. 694–697. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.2.694-697.1999>

32. Howieson J.G., Robson A.D., Abbott L.K. Calcium modifies pH effects on acid-tolerant and acidsensitive strains of *Rhizobium meliloti* // Australian Journal of Agricultural Research. 1992. Vol. 43. Issue 3. P. 765–772. <https://doi.org/10.1071/AR9920765>

33. Haltrich D., Nidetzky B., Kulbe K.D., Steiner W., Župančič S. Production of fungal xylanases // Bioresource Technology. 1996. Vol. 58. Issue 2. P. 137–161. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(96\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00094-6)

34. Kulkarni N., Shendye A., Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases // FEMS Microbiology Reviews. 1999. Vol. 23. Issue 4. P. 411–456. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00407.x>

35. Ko C.-H., Lin Z.-P., Tu J., Tsai C.-H., Liu C.-C., Chen H.-T., et al. Xylanase production by *Paenibacillus campinasensis* BL11 and its pretreatment of hardwood kraft pulp bleaching // International Biodeterioration & Biodegradation. 2010. Vol. 64. Issue 1. P. 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.10.001>

Contribution

Dung T. Ha, Albert V. Kanarsky, Zosia A. Kanarskaya, Andrei V. Shcherbakov, Elena N. Shcherbakova, Andrey V. Pranovich carried out the experimental work, on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. All authors have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict interests

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

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

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Dung T. Ha,
Postgraduate Student,
Department of Food Biotechnology,
Kazan National Research Technological
University,

Критерии авторства

Ха Т.З., Канарский А.В., Канарская З.А., Щербаков А.В., Щербакова Е.Н., Пранович А.В. выполнили экспериментальную работу, на основании полученных результатов провели обобщение и написали рукопись. Авторы имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ха Тхи Зунг,
аспирант кафедры пищевой биотехнологии,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Толстова, 8,

8, Tolstov St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
e-mail: coldwind.91@mail.ru

Albert V. Kanarsky,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Department of Food Biotechnology,
Kazan National Research Technological
University,
8, Tolstov St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
✉ e-mail: alb46@mail.ru

Zosia A. Kanarskaya,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor
Department of Food Biotechnology,
Kazan National Research Technological
University,
8, Tolstov St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
e-mail: zosya_kanarskaya@mail.ru

Andrei V. Shcherbakov,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Laboratory of Microbial Technology,
All-Russia Research Institute for Agricultural
Microbiology,
3, Podbelsky Highway, St. Petersburg, 196608,
Russian Federation,
e-mail: microbe-club@inbox.ru

Elena N. Shcherbakova,
Cand. Sci. (Agriculture), Researcher,
Laboratory of Microbial Technology,
All-Russia Research Institute for Agricultural
Microbiology,
3, Podbelsky Highway, St. Petersburg, 196608,
e-mail: alonagonchar@mail.ru

Andrey V. Pranovich,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Department of Wood Chemistry,
Laboratory of Wood and Paper Chemistry,
Abo Academy,
3, Tuomiokirkontori, Turku/Abo, FI-20500,
Finland,
e-mail: apranovi@abo.fi

Российская Федерация,
e-mail: coldwind.91@mail.ru

Канарский Альберт Владимирович,
д.т.н., профессор кафедры пищевой
биотехнологии,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Толстова, 8,
Российская Федерация,
✉ e-mail: alb46@mail.ru

Канарская Зося Альбертовна,
к.т.н., доцент кафедры пищевой
биотехнологии,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Толстова, 8,
e-mail: zosya_kanarskaya@mail.ru

Щербаков Андрей Владимирович,
к.б.н., научный сотрудник лаборатории
технологии микробных препаратов,
Всероссийский НИИ сельскохозяйственной
метеорологии,
196608, С.-Петербург, шоссе Подбельского, 3,
Российская Федерация,
e-mail: microbe-club@inbox.ru

Щербакова Елена Николаевна,
к.с.-х.н., младший научный сотрудник
лаборатории технологии микробных
препаратов,
Всероссийский НИИ сельскохозяйственной
метеорологии,
196608, С.-Петербург, шоссе Подбельского, 3,
Российская Федерация,
e-mail: alonagonchar@mail.ru

Пранович Андрей Викторович,
к.х.н., доцент кафедры химии древесины
и бумаги,
Або Академия,
Туомиокirkontори 3, Турку/Або, FI-20500,
Финляндия,
e-mail: apranovi@abo.fi



Determination of phenolic compounds in water-ethanol extracts of *Populus tremula* L. leaves using high-performance liquid chromatography

© Olga V. Kotsupiy*, Yulia V. Zagurskaya**, Vladimir I. Ufimtsev**

*Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

**Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry SB RAS
(Institute of Human Ecology), Kemerovo, Russian Federation

Abstract: The analytical task of determining the phenolic compound content of water-ethanol extracts of *Populus tremula* L. (common aspen) leaves is complicated by the heterogeneity of compound groups having different polarities and appearing in varying concentrations. The purpose of the present work is to study the conditions of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography used to analyse the content of different groups of phenolic compounds in water-ethanol extracts of leaves from the *P. tremula* plant. In order to facilitate the derivation of phenolic compounds, an exhaustive extraction process was carried out using ethanol. Solid-phase extraction was carried out using a Diapak C16 cartridge, after which the eluates were passed through a membrane filter having a pore diameter of 0.45 μm . The high-performance liquid chromatography method was used to determine the content of phenolic acids and flavonoid glycosides, as well as salicin and individual flavonoid glycoside components: hyperoside, rutin, astragaloside and two unidentified flavonoid glycosides in aqueous (analyte 1) and aqueous-alcoholic fractions (analyte 2) in two systems along the gradient elution. The requirement of analysing the primary aqueous eluate together or in parallel with the main aqueous-alcoholic fraction in the preparation of *P. tremula* leaf extracts for high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction cartridges was substantiated. For separating the extract to determine the hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid content, it is preferable to use system 2; for determining the phenologlycoside (salicin) content, system 1 is more effective. Flavonoid glycosides (hyperoside, rutin, astragaloside and two unidentified flavonoids) make the most significant contribution to the difference between the aqueous and aqueous-alcoholic fractions.

Keywords: phenolic compounds, *Populus tremula*, solid-phase extraction, high-performance liquid chromatography (HPLC), sample preparation

Acknowledgments: The work was carried out within the framework of the projects of Central Siberian Botanical Garden SB RAS no. AAAA-A17-117012610051-5 and Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry SB RAS no. AAAA-A17-117041410053-1.

Information about the article: Received March 13, 2020; accepted for publication August 31, 2020; available online September 30, 2020.

For citation: Kotsupiy OV, Zagurskaya YuV, Ufimtsev VI. Determination of phenolic compounds in water-ethanol extracts of *Populus tremula* L. leaves using high-performance liquid chromatography. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):470–478. (In English) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-470-478>

УДК 581.19 : 581.5 (582.623.2)

Определение фенольных соединений в водно-этанольных экстрактах листьев *Populus tremula* L. с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии

О.В. Коцупий*, Ю.В. Загурская**, В.И. Уфимцев**

*Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,
г. Новосибирск, Российская Федерация

**Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН (Институт экологии человека),
г. Кемерово, Российская Федерация

Резюме: Водно-этанольный экстракт листьев *Populus tremula* L. (осина обыкновенная) включает различные группы фенольных соединений с разной полярностью и различной концентрацией веществ, что осложняет аналитическую задачу при определении их содержания. Цель работы –

изучить условия твердофазной экстракции и высокоэффективной жидкостной хроматографии при исследовании содержания разных групп фенольных соединений в водно-этанольных экстрактах листьев *P. tremula*. Для извлечения фенольных соединений проводили исчерпывающую экстракцию этанолом. Твердофазную экстракцию осуществляли с помощью патрона Диапак С16, после чего элюаты пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определяли содержание фенолокислот и гликозидов флавоноидов, а также салицина и индивидуальных компонентов гликозидов флавоноидов: гиперозида, рутина, астрагалина и двух неидентифицированных гликозидов флавоноидов в водной (аналит 1) и водно-спиртовой фракциях (аналит 2) в двух системах, различающихся по градиенту элюирования. Доказана необходимость анализа первичного водного элюата совместно или параллельно с основной водно-спиртовой фракцией при подготовке экстрактов листьев *P. tremula* для высокоэффективной жидкостной хроматографии с помощью картриджей твердофазной экстракции. Для разделения экстракта с целью определения содержания компонентов гидроксикоричных и гидроксibenзойных кислот предпочтительнее использовать систему 2, для определения содержания фенологликозидов (салицина) – систему 1. Гликозиды флавоноидов (гиперозид, рутин, астрагалин и два неидентифицированных флавоноида) вносят наиболее весомый вклад в различие двух фракций – водной и водно-спиртовой.

Ключевые слова: фенольные соединения, *Populus tremula*, твердофазная экстракция, высокоэффективная жидкостная хроматография, пробоподготовка

Благодарность: Работа выполнена в рамках проектов Центрального сибирского ботанического сада СО РАН № АААА-А17-117012610051-5 и Федерального исследовательского центра угля и углехимии СО РАН № АААА-А17-117041410053-1.

Информация о статье: Дата поступления 13 марта 2020 г.; дата принятия к печати 31 августа 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2020 г.

Для цитирования: Коцупий О.В., Загурская Ю.В., Уфимцев В.И. Определение фенольных соединений в водно-этанольных экстрактах листьев *Populus tremula* L. с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 3. С. 470–478. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-470-478>

INTRODUCTION

The study of phenolic compounds (PCs) in plant material is of current interest in order to identify new economically-significant sources of biologically-active substances, primarily for medicinal use. PCs are also widely used as chemotaxonomic markers, as well as, more recently, within the framework of ecological research in the selection of bioindication objects and methods for determining environmental wellbeing. Moreover, for taxonomic and bioindication purposes, it is necessary to obtain the most complete information on the content of individual phenolic substances, which presupposes exhaustive extraction and careful sample preparation. However, the complex matrix composition inherent in crude plant extracts complicates the analytical problem, negatively impacting on analysis results [1]. In terms of significantly simplifying the analysis procedure and improving its metrological characteristics, the most efficient and versatile method for isolation, purification and concentration of phenolic substances from plant samples having a complex composition is solid-phase extraction (SPE) [2, 3].

An analysis of publications indexed in the Web of Science citation database (© Clarivate) for 2013–2018 showed that, when performing tasks requiring maximum preservation of the extract for the subsequent study of PS, membrane filters are most typically used during preliminary sample preparation,

often in conjunction with centrifugation. Mention of the use of solid-phase extraction (SPE), including the use of cartridges such as Phenomenex Strata-X and C₁₈ (Torrance, CA, USA), Agilent SampliQ (Agilent Technologies, CA, USA) separately or together with other methods of purification and / or fractionation, was found in about a third of the reviewed publications [4–13]. In the Russian Federation, domestically-produced Diapak cartridges are successfully used (CJSC BioKhimMak ST, Moscow) for SPE purposes. For polyphenolic compounds, a sorbent with a grafted C18 phase is optimally used for sample preparation within the framework of HPLC analysis [1].

According to the literature data, various groups of phenolic compounds are present in the leaves of *Populus tremula* L. (common aspen): flavonoids (hyperoside, rutin, quercitrin, isoquercitrin, astragalol), nine phenolic glycosides, including salicin and tremulacin, as well as chlorogenic acid and esters of p-coumaric, ferulic and cinnamic acids [14–17]. Phenol glycosides constitute a significant proportion of PCs in aspen leaves, significantly exceeding the flavonoid and phenol carboxylic acid content [15]. The separation completeness of compounds and quantitative determination accuracy can be influenced by the chemical nature of individual components in the intact sample, as well as their number and content [5, 18]. A matrix with the joint presence of a sufficiently large

number of substances of different polarities having different concentrations presents difficulties in performing tasks to determine component content and composition.

In our study examining the content of different groups of phenolic compounds in water-ethanol extracts of leaves of *P. tremula*, we set the goal of studying the conditions of SPE and HPLC analysis.

MATERIALS AND METHODS

We examined mature undamaged leaf blades from aspen trees of between 10 and 15 years old, collected from the 1st to the 5th August, 2015, on the territory of the Kedrovsky coal mine in southwestern Siberia. According to the results of differential spectrophotometry with AlCl_3 , the different total flavonoid glycoside content in terms of rutin following a single cold extraction with 95% ethanol was as follows: sample 1 (O1) – 0.4 ± 0.1 ; sample 2 (O2) – 0.6 ± 0.1 ; sample 3 (O3) – 1.0 ± 0.1 .

In order to extract phenolic compounds, an exact weighed portion (0.120–0.200 g) of the crushed air-dry material was first obtained by cold extraction with 70% ethanol in darkness for 48 h. Next, an exhaustive extraction was carried out three times with 50% ethanol while heating in a water bath: 1) 30 ml of the extractant – for 30 minutes; 2) 20 ml of extractant – for 20 minutes; 3) 10 ml of extractant – for 10 minutes. The combined extract was evaporated to dryness and brought to a volume of 3 ml with 50% ethanol.

For SPE, 1 ml of the extract was diluted with bidistilled water to 5 ml and passed through a Diapak C16 concentrating cartridge (CJSC BioKhim-Mak ST). The substances were washed off the cartridge with a small amount (5 ml) of solvent with an increasing concentration of ethanol (40, 70 and 96%).

During the preparation of *P. tremula* samples, it was observed that the aqueous residue had a yellowish colour when the sample was washed through a TFE cartridge, indicating a significant content of coloured compounds, possibly of a phenolic nature. For this reason, the water residue was not discarded following sorption on the cartridge, but analysed as the first fraction (analyte 1 – A1) separately from the water-alcohol fraction (analyte 2 – A2). Following SPE, the eluates were passed through a membrane filter having a pore diameter of 0.45 μm .

The components were analysed on an Agilent 1200 liquid chromatograph fitted with a diode array detector and a ChemStation system for collecting and processing chromatographic data. The substances were separated on a Zorbax SB-C18 column having dimensions 4.6×150 mm and a particle diameter of 5 μm using a gradient elution mode. Two systems were used for the chromatographic procedure. System 1 (S1, developed for the separation of phenolic substances, primarily flavonoid glycosides): in the mobile phase, the methanol content

in an aqueous solution of orthophosphoric acid (0.1%) varied: from 32 to 33% in 27 minutes; then up to 46% – by 38 minutes; then up to 56% – by 50 minutes; and up to 100% – by 54 minutes. System 2 (S2, developed for the separation of phenolic substances, primarily phenolic acids): in the mobile phase, the methanol content in an aqueous solution of orthophosphoric acid (0.1%) varied: from 19 to 70% – in 30 minutes; then to 100% – by 32 min. The flow rate of the eluent is 1 ml/min. Column temperature – 26 °C. Volume of injected sample – 10 μl . Detection was carried out at analytical wavelengths $\lambda = 255, 270, 290, 340, 350, 360, 370 \text{ nm}$. To prepare the mobile phases, we used methyl alcohol (extra pure grade), orthophosphoric acid (extra pure grade) and bidistilled water. Standard solutions were prepared at a concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$ in ethyl alcohol. Standard samples of salicin (MP Biomedicals LLC), rutin, hyperoside and astragalol (FLUKA Analytical) were used as taps. Each variant was analysed in 4 replications.

The content of individual components (C_x , %) in terms of absolutely dry matter (ADM) was calculated by the formula:

$$C_x = \frac{C_{st} \times S_1 \times V_1 \times V_2 \times 100}{S_2 \times M \times 10 \times (100 - B)},$$

where C_{st} – the concentration of a standard solution of a phenolic compound (PC), $\mu\text{g/ml}$; S_1 – the area of the PC peak in the analysed sample, a.u.; S_2 – peak area of the standard PC, a.u.; V_1 – volume of the eluate after washing out the PC from the concentrating cartridge, ml; V_2 – total extract volume, ml; M – sample weight, mg; B – raw material moisture (%).

The salicin content was calculated in terms of salicin; phenolic acids – in terms of gallic and chlorogenic acids. The flavonoid glycoside content was calculated for quercetin using the coefficient known from the literature for converting the concentration – 2.504 [19, 20].

Statistical data processing – calculation of the average value of the feature (M), its error (m_M), variance (ANOVA, Duncan's test) and the method of principal components were carried out using the Statistica 10 application package.

RESULTS AND DISCUSSION

Hyperoside, rutin, astragalol, as well as gallic-, chlorogenic-, and cinnamic acids, were previously found in the leaves of *P. tremula* from ecotopes having varying degrees of technogenic load [21].

In this work, the composition and content of phenolic acids (PA) and flavonoids glycosides (FG) in both aqueous (A1) and aqueous-alcoholic fractions (A2) were determined in two systems differing in the elution gradient. Data on the content of different groups of PC are presented in Table 1.

Table 1. Phenolic content and number of components in aqueous and aqueous-alcoholic fractions of *Populus tremula* leaf extracts in systems with different elution gradients (% on ADM)

Таблица 1. Содержание фенольных соединений и число компонентов в водных и водно-спиртовых фракциях экстрактов листьев *Populus tremula* в системах с разным градиентом элюирования (% на АСВ)

Sample	PC	System 1		System 2			
		A1	A2	A1	A2	extract	R, %
1	PA,%	0.74±0.01	0.50±0.01	0.91±0.01	0.39±0.01	2.00±0.18	65
	FG,%	1.27±0.10	1.95±0.17	1.69±0.15	1.73±0.15	4.96±0.40	69
	N, pcs	33	44	57	46	56	
2	PA,%	0.79±0.01	0.29±0.01	0.62±0.04	0.84±0.06	2.09±0.18	67
	FG,%	0.81±0.01	1.01±0.01	0.81±0.01	0.99±0.01	2.80±0.21	64
	N, pcs	45	44	65	34	51	
3	PA,%	1.94±0.15	0.49±0.01	2.58±0.20	0.57±0.01	3.51±0.25	91
	FG,%	1.96±0.17	1.37±0.10	2.20±0.17	1.48±0.10	3.50±0.30	105
	N, pcs	27	33	43	37	55	

Note. N is the number of phenolic components; R is the degree of analyte recovery.

Earlier, possible losses of gallic and caffeic acids in the process of sample preparation of plant extracts using SPE were reported [1, 22]. In all investigated *P. tremula* samples, the aqueous eluate (A1) contains a significant amount of PA – in most cases, exceeding that of the aqueous-alcoholic analytes (see Table 1). In addition, the presence of significant amounts of phenolic – including flavonoid – components was observed in the aqueous fractions of all samples (Fig. 1). Thus, in the first two samples, the FG content in the aqueous analyte is comparable to – or only 1.3–1.5 times less than – the FG content in the target aqueous-alcoholic analyte. In O3, however, the FG content in the aqueous analyte exceeds that observed in the aqueous-alcoholic analyte by 1.4–1.5 times. The lowest number of compounds for all studied variants of determination was noted for O3, in which the highest content of both PC groups is observed.

It is known that substances having different polarities are concentrated and desorbed from the sorbent of the cartridge to varying degrees of extraction. The recovery factor was analysed in the sys-

tem having the highest total PC content and number of components, i.e. S2 (see Table 1). In an earlier work, it was indicated that the degree of extraction of rutin from an aqueous decoction of St. John's wort was 49% [1]. In our samples, the degree of extraction from the combined fractions (aqueous and aqueous-alcoholic) was for different samples: for FG – 64–105%; for PA – 65–91%. The different recovery rates are possibly related to intermolecular effects in the complex natural matrix of the aspen leaf extract, as well as to the different number and content of the determined components in the samples.

To elucidate the relationship between the PC composition and content of the aspen leaf extract with the sample preparation and HPLC analysis conditions, we determined the content of some individual substances (salicin, hyperoside, rutin and astragaline), as well as two unidentified substances (FG1 and FG2), classified as glycosides of flavonoids, according to spectral data ($\lambda_{max} = 255, 355 \text{ nm}$) (Table 2).

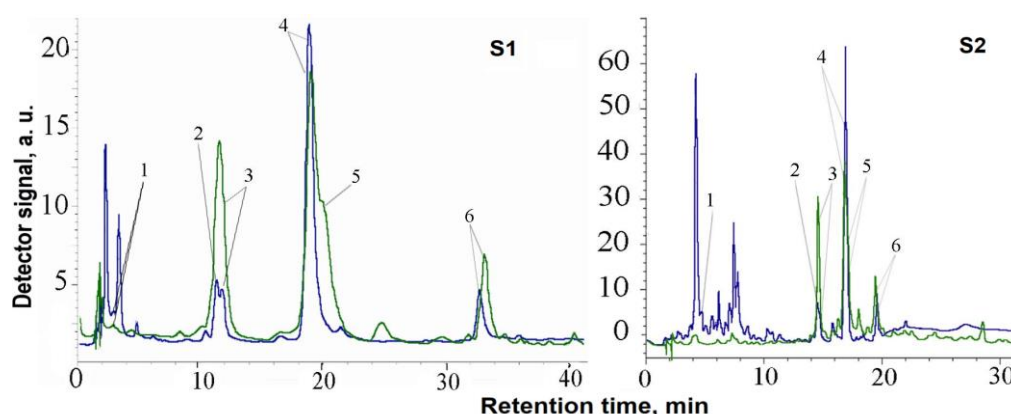


Fig. 1. HPLC chromatograms of water-ethanol extracts of *Populus tremula* leaves: S1 – 360 nm; S2 – 325 nm; blue line – A1, green line – A2; main components: 1 – salicin; 2 and 3 – flavonoid glycosides FG1 and FG2; 4 – hyperoside; 5 – rutin, 6 – astragaline

Рис. 1. ВЭЖХ-хроматограммы водно-этанольных экстрактов листьев *Populus tremula*: С1 – 360 нм, С2 – 325 нм; синяя линия – А1, зеленая линия – А2; основные компоненты: 1 – салицин, 2 и 3 – гликозиды флавоноидов ГФ1 и ГФ2, 4 – гиперозид, 5 – рутин, 6 – астрагалин

The highest salicin content (best recovery and separation) was noted in aqueous eluates, especially during chromatography in S1. Two glycosides FG1 and FG2, which were close in retention times, were not separated in the aqueous-alcoholic eluate of either system. For O3, a different ratio of the main flavonoid components – rutin (prevailing) and hyperoside – was established than in other studied samples, in which the content of hyperoside exceeded the amount of rutin by 2 or more times (see Table 1).

To identify the most significant influencing factors from the existing number of explanatory variables (the content of analysed individual substances and their sums), the principal component analysis (PCA) method was applied.

We took 9 signs: content salicin, hyperoside, rutin, astragaline, flavonoid glycosides FG1 and FG2, the sum of five glycosides, the sum of FG and the sum of FC. The data visualisation is graphically presented in the scatterplot (Fig. 2).

For the PC of aspen leaves, sufficiently clear scattering regions can be observed on a three-dimensional diagram constructed using the first three factors (F1-F2-F3). The compact area of dispersion of indicators of the PC content in the O2 aspen leaves is separated from others by the first factor. The most significant correlation coefficients noted for the first factor are the sum of FG, the sum of five glycosides and the sum of PC, as well as the salicin and rutin content. Different samples have

Table 2. Content of individual components of phenolic compounds in aqueous and aqueous-alcoholic fractions of *Populus tremula* leaf extracts in systems with different elution gradients (% on ADM)

Таблица 2. Содержание индивидуальных компонентов фенольных соединений в водных и водно-спиртовых фракциях экстрактов листьев *Populus tremula* в системах с разным градиентом элюирования (% на АСВ)

Sample / analyte / system	Salicin	FG1	FG2	Hyperoside	Rutin	Astragaline	Total amount of FG
O1/A1/C1	0.78±0.06 ^{bc}	0.075±0.006 ^b	0.075±0.006 ^f	0.925±0.030 ^a	n/d	0.18±0.01 ^c	1.25±0.10 ^d
O1/A2/C1	0.21±0.02 ^d	n/d	0.575±0.030 ^a	0.825±0.030 ^b	0.43±0.03 ^c	0.25±0.02 ^a	1.65±0.15 ^b
O1/A1/C2	0.67±0.05 ^c	0.100±0.009 ^a	0.075±0.006 ^f	0.85±0.06 ^b	0.175±0.015 ^f	0.15±0.01 ^d	1.35±0.10 ^{dc}
O1/A2/C2	n/d	n/d	0.275±0.023 ^d	0.325±0.025 ^{cf}	0.30±0.02 ^d	0.23±0.02 ^b	1.13±0.10 ^a
O2/A1/C1	0.84±0.07 ^b	0.050±0.003 ^c	0.075±0.006 ^f	0.275±0.020 ^{fg}	0.075±0.006 ^h	0.100±0.009 ^e	0.58±0.04 ^f
O2/A2/C1	0.15±0.01 ^d	n/d	0.175±0.013 ^c	0.20±0.01 ^d	0.175±0.015 ^f	0.13±0.01 ^g	0.68±0.05 ^f
O2/A1/C2	0.24±0.02 ^d	0.050±0.003 ^c	0.075±0.006 ^f	0.30±0.02 ^{fg}	0.075±0.006 ^h	0.13±0.01 ^g	0.63±0.05 ^f
O2/A2/C2	n/d	n/d ^a	0.225±0.017 ^e	0.375±0.030 ^c	0.050±0.003 ^{gh}	0.075±0.006 ^f	0.73±0.06 ^f
O3/A1/C1	1.73±0.15 ^a	0.055±0.003 ^c	0.33±0.02 ^b	0.303±0.020 ^{fg}	0.89±0.06 ^a	0.11±0.09 ^g	1.70±0.15 ^b
O3/A2/C1	0.16±0.01 ^d	n/d	0.107±0.009 ^f	0.055±0.003 ^e	0.72±0.05 ^e	0.090±0.008 ^e	0.95±0.15 ^e
O3/A1/C2	0.69±0.05 ^c	0.07±0.006 ^b	0.25±0.02 ^{de}	0.25±0.02 ^{dg}	0.77±0.05 ^e	0.06±0.004 ^f	1.40±0.10 ^d
O3/A2/C2	n/d	n/d	0.110±0.009 ^f	0.045±0.003 ^e	0.65±0.05 ^b	0.16±0.01 ^d	0.95±0.09 ^e

Note. n/d – not detected; column averages followed by like letters do not differ significantly from each other according to Duncan's test at P = 0.05.

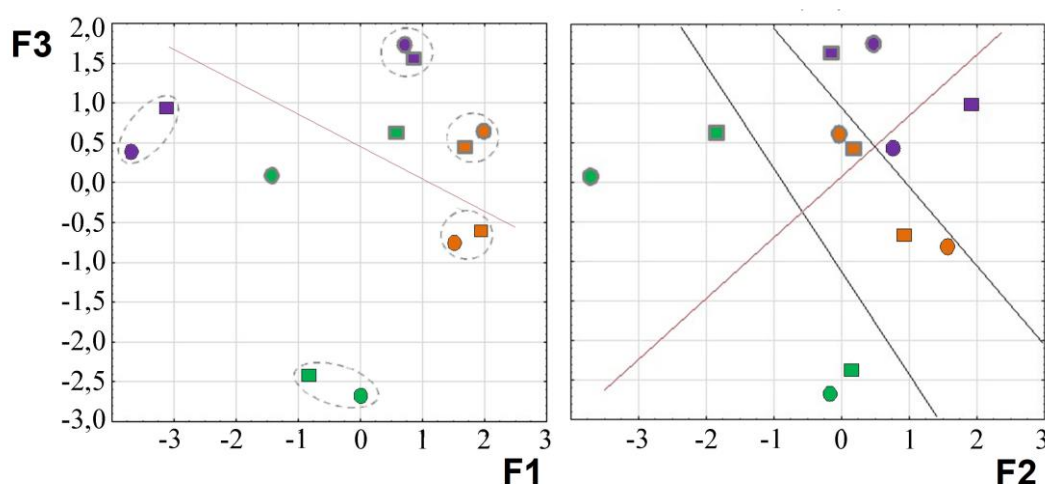


Fig. 2. Application of the PCA method in the distribution of water- and aqueous-alcoholic fractions of *Populus tremula* leaf extracts: green – O1, orange – O2, violet – O3; circle – S1, square – S2; thin black border line – A1; bold grey – A2

Рис. 2. Применение метода главных компонент при распределении водных и водно-спиртовых фракций экстрактов листьев *Populus tremula*: зеленый – O1, оранжевый – O2, фиолетовый – O3; круг – S1, квадрат – S2; линия границы тонкая черная – A1, жирная серая – A2

their own scattering regions according to F2-F3 (separated by black lines in the figure). In addition, according to F2-F3, there are two scattering regions, represented by (1) aqueous and (2) aqueous-alcoholic fractions, although some points are located nearby. The second factor correlates most strongly with the astragalín and FG2 content, while the third correlates most strongly with the hyperoside, FG1 and rutin content. According to F1-F3, the region with aqueous-alcoholic eluates is also localised, except for O1 in the aqueous-alcoholic fraction S1.

Thus, the differences between the aqueous and aqueous-alcoholic fractions, as well as the differences of the samples from each other, is mainly due to the content of individual flavonoid components: hyperoside, astragalín, rutin, FG1 and FG2. Differences in the PC content of aspen leaves largely depend on the analysed fraction (aqueous or aqueous-alcoholic) (see Fig. 2). The salicin and PC content correlates with the sample preparation conditions and elution gradient in HPLC analysis. Salicin is best detected in the S1 aqueous eluate (see Table 2). S2 is preferable for use at a sufficiently

high content of PA in the test material, in particular, for the analysis of the aqueous fraction of *P. tremula* leaf extracts (see Table 1).

CONCLUSIONS

1. In order to study the PC composition and content by means of HPLC when preparing *Populus tremula* extracts using SPE cartridges, it is necessary to analyse the aqueous eluate together or in parallel with the main aqueous-alcoholic fraction.

2. In order to separate the extract for determining the hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid content, it is preferable to use system 2; for determining the phenoglycoside (salicin) content, system 1 is more effective.

3. Preferred conditions for sample preparation and HPLC analysis for optimal separation of the component composition of flavonoid glycosides have not been identified. The content of individual flavonoids (hyperoside, astragalín, rutin, and two unidentified flavonoids) makes the most significant contribution to the differences between aqueous and aqueous-alcoholic fractions.

REFERENCES

1. Temerdashev ZA, Milevskaya VV, Kiseleva NV, Vernikovskaya NA, Korobkov VA. Sorption-chromatographic determination of gallic, caffeic acids, rutin and (-)-epicatechin in herbs. *Analitika i control = Analytics and Control*. 2013;2:211–218. (In Russian)
2. Saprykin LV, Saprykina LV. Methodology of analytical application of solid-phase extraction. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskie protsessy*. 2007;7(3):397–409. (In Russian)
3. Kudrinskaya VA, Dmitrienko SG, Zolotov YuA. Synthesis and study of sorption properties of molecularly imprinted polymers for quercetin. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2009;64(3):124–129. <https://doi.org/10.3103/S0027131409030031>
4. Zanutto FV, Boldrin PK, Varanda EA, Fernandes de Souza S, Sano PT, Vilegas W, et al. Characterization of flavonoids and naphthopyranones in methanol extracts of *Paepalanthus chiquitensis* Herzog HPLC-ESI-IT-MSn and their mutagenic activity. *Molecules*. 2012;18(1):244–262. <https://doi.org/10.3390/molecules18010244>
5. Simirgiotis MJ, Schmeda-Hirschmann G, Bórquez J, Kennelly EJ. The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) fruit: a source of bioactive flavonoid C-glycosides isolated by HSCCC and characterized by HPLC–DAD–ESI/MS/MS. *Molecules*. 2013;18(2):1672–1692. <https://doi.org/10.3390/molecules18021672>
6. Asghari A, Barfi B, Barfi A, Saeidi I, Ghollasi Moud F, Peyrovi M, et al. Comparison between conventional solid phase extraction and its simplified method for HPLC determination of five flavonoids in orange, tangerine, and lime juice samples. *Acta Chromatographica*. 2014;26(1):157–175. <https://doi.org/10.1556/AChrom.26.2014.1.12>
7. Costa DLMG, Rinaldo D, Varanda EA, de Sousa JF, Nasser ALM, Silva ACZ, et al. Flavonoid detection in hydroethanolic extract of *Pouteria torta* (Sapotaceae) Leaves by HPLC-DAD and the determination of Its mutagenic activity. *Journal of Medicinal Food*. 2014;17(10):1103–1112. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0116>
8. Mehta JP, Fultariya CR, Parmar PH, Vadia SH, Golakiya BA. Determination of phenolic acids and a flavonoid in *Eleusine coracana* (L.) by semi-preparative HPLC photo diode array detector. *Journal of Analytical Chemistry*. 2015;70(3):369–373. <https://doi.org/10.1134/S1061934815030090>
9. Hsu BY, Lin SW, Stephen Inbaraj B, Chen BH. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Chenopodium formosanum* Koidz. (djulis) by HPLC-DAD-ESI–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;132:109–116. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.09.027>
10. Gomes SVF, Portugal LA, dos Anjos JP, de Jesus ON, de Oliveira EJ, David JP, Davida JM. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. *Microchemical Journal*. 2017;132:28–35. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.021>
11. Tewari R, Gupta M, Ahmad F, Rout PK, Misra L, Patwardhan A, et al. Extraction, quantification and antioxidant activities of flavonoids, polyphenols and pinitol from wild and cultivated *Saraca asoca* bark using RP-HPLC-PDA-RI method. *Industrial Crops and Products*. 2017;103:73–80. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.036>
12. Ciric A, Jelkic-Stankov M, Cvijovic M, Djurdjevic P. Statistical optimization of an RP-HPLC

method for the determination of selected flavonoids in berry juices and evaluation of their antioxidant activities. *Biomedical Chromatography*. 2018;32(4). Art. no. e4150. <https://doi.org/10.1002/bmc.4150>

13. Kuppusamy P, Lee KD, Song CE, Ilavenil S, Sriganesh S, Arasu MV, et al. Quantification of major phenolic and flavonoid markers in forage crop *Lolium multiflorum* using HPLC-DAD. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2018;28(3):282–288. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.03.006>

14. Häikiö E, Makkonen M, Julkunen-Tiitto R, Sitte J, Freiwald V, Silfver T, et al. Performance and secondary chemistry of two hybrid Aspen (*Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.) clones in long-term elevated ozone exposure. *Journal of Chemical Ecology*. 2009;35(6):664–678. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9644-2>

15. Lobanova IYu. Phenolic compounds of leaves of *Populus tremula* L. as the basis for creation of preparation of anti-inflammatory action. *Vestnik ural'skoi meditsinskoi akademicheskoi nauki*. 2011;3/1:67–68. (In Russian)

16. Lobanova IYu, Turetskova VF. Isolation and study of the composition of flavonoids of aspen leaves. *Khimija rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant raw material*. 2011;2:117–122. (In Russian)

17. Banayev YeV, Shishkin SV, Voronkova MS, Belanova AP, Tomoshevich MA. Morphological and biochemical features of *Populus x canescens* in

natural populations of the Altai region. *Vestnik Altaiskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Bulletin of Altai State Agricultural University*. 2017; 8:90–97. (In Russian)

18. Sychev KS, Davankov VA. Materials and methods for sample preparation in chromatography: solid-phase concentration and adsorption purification. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2004;4(1):5–28. (In Russian)

19. Van Beek TA. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts. *Journal of Chromatography A*. 2002;967(1):21–55. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00172-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00172-3)

20. Yur'ev DV., Ehler KI, Arzamashev AP. Analysis flavonolglycosides in preparations and dietary supplements based on *Ginkgo biloba* extract. *Farmatsiya = Pharmacy*. 2003;2:7–9. (In Russian)

21. Zagurskaya YuV, Siromlya TI, Kotsupiy OV, Babaeva EYu, Ufimtsev VI. Physiological and biochemical characteristics of *Populus tremula* leaves in anthropogenic disturbed habitats. *BIO Web of Conferences*. 2018;11. Art. no. 00050. 4 p. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20181100050>

22. Shkarina EI, Maksimova TV, Nikulina IN, Lozovskaya EL, Chumakova ZV, Pakhomov VP, et al. Effect of biologically active substances on the antioxidant activity of phytopreparations. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2001;35(6):333–340. <https://doi.org/10.1023/A:1012349806071>

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Темердашев З.А., Милевская В.В., Киселева Н.В., Верниковская Н.А., Коробков В.А. Сорбционно-хроматографическое определение галловой, кофейной кислот, рутина и эпикатехина в лекарственных растениях // Аналитика и контроль. 2013. Т. 17. N 2. С. 211–218.

2. Сапрыкин Л.В., Сапрыкина Л.В. Методология аналитического применения твердофазной экстракции // Сорбционные и хроматографические процессы. 2007. Т. 7. Вып. 3. С. 397–409.

3. Kudrinskaya V.A., Dmitrienko S.G., Zolotov Yu.A. Synthesis and study of sorption properties of molecularly imprinted polymers for quercetin // Moscow University Chemistry Bulletin. 2009. Vol. 64. Issue 3. P. 124–129. <https://doi.org/10.3103/S0027131409030031>

4. Zanutto F.V., Boldrin P.K., Varanda E.A., Fernandes de Souza S., Sano P.T., Vilegas W., et al. Characterization of flavonoids and naphthopyranones in methanol extracts of *Paepalanthus chiquitensis* Herzog HPLC-ESI-IT-MSn and their mutagenic activity // *Molecules*. 2012. Vol. 18. Issue 1. P. 244–262. <https://doi.org/10.3390/molecules18010244>

5. Simirgiotis M.J., Schmeda-Hirschmann G., Bórquez J., Kennelly E.J. The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) fruit: a source of bioactive flavonoid C-glycosides isolated by HSCCC and characterized by HPLC-DAD-ESI/MS/MS // *Molecules*.

2013. Vol. 18. Issue 2. P. 1672–1692. <https://doi.org/10.3390/molecules18021672>

6. Asghari A., Barfi B., Barfi A., Saeidi I., Ghollasi Moud F., Peyrovi M., et al. Comparison between conventional solid phase extraction and its simplified method for HPLC determination of five flavonoids in orange, tangerine, and lime juice samples // *Acta Chromatographica*. 2014. Vol. 26. Issue 1. P. 157–175. <https://doi.org/10.1556/AChrom.26.2014.1.12>

7. Costa D.L.M.G., Rinaldo D., Varanda E.A., de Sousa J.F., Nasser A.L.M., Silva A.C.Z., et al. Flavonoid detection in hydroethanolic extract of *Pouteria torta* (Sapotaceae) Leaves by HPLC-DAD and the determination of its mutagenic activity // *Journal of Medicinal Food*. 2014. Vol. 17. Issue 10. P. 1103–1112. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0116>

8. Mehta J.P., Fultariya C.R., Parmar P.H., Vadia S.H., Golakiya B.A. Determination of phenolic acids and a flavonoid in *Eleusine coracana* (L.) by semi-preparative HPLC photo diode array detector // *Journal of Analytical Chemistry*. 2015. Vol. 70, Issue 3. P. 369–373. <https://doi.org/10.1134/S1061934815030090>

9. Hsu B.Y., Lin S.W., Stephen Inbaraj B., Chen B.H. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Chenopodium formosanum* Koidz. (djulis) by HPLC-DAD-ESI-MS/MS // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017. Vol.

132. P. 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.09.027>

10. Gomes S.V.F., Portugal L.A., dos Anjos J.P., de Jesus O.N., de Oliveira E.J., David J.P., Davida J.M. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species // *Microchemical Journal*. 2017. Vol. 132. P. 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.021>

11. Tewari R., Gupta M., Ahmad F., Rout P.K., Misra L., Patwardhan A., et al. Extraction, quantification and antioxidant activities of flavonoids, polyphenols and pinitol from wild and cultivated *Saraca asoca* bark using RP-HPLC-PDA-RI method // *Industrial Crops and Products*. 2017. Vol. 103. P. 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.036>

12. Ciric A., Jelkic-Stankov M., Cvijovic M., Djurdjevic P. Statistical optimization of an RP-HPLC method for the determination of selected flavonoids in berry juices and evaluation of their antioxidant activities // *Biomedical Chromatography*. 2018. Vol. 32. Issue 4. Art. no. e4150. <https://doi.org/10.1002/bmc.4150>

13. Kuppusamy P., Lee K.D., Song C.E., Ilavenil S., Srigopalram S., Arasu M.V., et al. Quantification of major phenolic and flavonoid markers in forage crop *Lolium multiflorum* using HPLC-DAD // *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2018. Vol. 28. Issue 3. P. 282–288. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.03.006>

14. Häikiö E., Makkonen M., Julkunen-Tiitto R., Sitte J., Freiwald V., Silfver T., et al. Performance and secondary chemistry of two hybrid Aspen (*Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.) clones in long-term elevated ozone exposure // *Journal of Chemical Ecology*. 2009. Vol. 35. Issue 6. P. 664–678. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9644-2>

15. Лобанова И.Ю. Фенольные соединения

листьев осины обыкновенной как основа создания препарата противовоспалительного действия // *Вестник уральской медицинской академической науки*. 2011. N 3/1. С. 67–68.

16. Лобанова И.Ю., Турецкова В.Ф. Выделение и изучение состава флавоноидов листьев осины обыкновенной // *Химия растительного сырья*. 2011. N 2. С. 117–122.

17. Банаев Е.В., Шишкин С.В., Воронкова М.С., Беланова А.П., Томошевич М.А. Морфологические и биохимические особенности *Populus x canescens* в природных популяциях Алтайского Края // *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*. 2017. N 8 (154). С. 90–97.

18. Сычев К.С., Даванков В.А. Материалы и методы пробоподготовки в хроматографии: твердофазное концентрирование и адсорбционная очистка // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2004. Т. 4. Вып.1. С. 5–28.

19. Van Beek T.A. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts // *Journal of Chromatography*. A. 2002. Vol. 967. Issue 1. P. 21–55. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00172-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00172-3)

20. Юрьев Д.В., Эллер К.И., Арзамасцев А.П. Анализ флавонолгликозидов в препаратах и БАД на основе экстракта *Ginkgo biloba* // *Фармация*. 2003. N 2. С. 7–9.

21. Zagurskaya Yu.V., Siromlya T.I., Kotsupiy O.V., Babaeva E.Yu., Ufimtsev V.I. Physiological and biochemical characteristics of *Populus tremula* leaves in anthropogenic disturbed habitats // *BIO Web of Conferences*. 2018. Vol. 11. Art. no. 00050. 4 p. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20181100050>

22. Shkarina E.I., Maksimova T.V., Nikulina I.N., Lozovskaya E.L., Chumakova Z.V., Pakhomov V.P., et al. Effect of biologically active substances on the antioxidant activity of phytopreparations // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2001. Vol. 35. Issue 6. P. 333–340. <https://doi.org/10.1023/A:1012349806071>

Contribution

Olga V. Kotsupiy, Yulia V. Zagurskaya, Vladimir I. Ufimtsev carried out the experimental work. The authors on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. All authors have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

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.

Критерии авторства

Коцупий О.В., Загурская Ю.В., Уфимцев В.И. выполнили экспериментальную работу. Авторы совместно обобщили результаты, написали рукопись, имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Olga V. Kotsupiy,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Central Siberian Botanical Garden SB RAS,
101, Zolotodolinskaya St.,
Novosibirsk, 630090,
Russian Federation,
✉ e-mail: olnevaster@gmail.com

Yulia V. Zagurskaya,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Federal Research Center of Coal
and Coal Chemistry SB RAS
(Institute of Human Ecology),
18, Sovetskii Ave., Kemerovo, 650000,
Russian Federation,
e-mail: syjil@mail.ru

Vladimir I. Ufimtsev,
Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher,
The Federal Research Center of Coal
and Coal-Chemistry SB RAS
(Institute of Human Ecology),
18, Sovetskii Ave., Kemerovo, 650000,
Russian Federation,
e-mail: uwy2079@gmail.com

Коцупий Ольга Викторовна,
к.б.н., научный сотрудник,
Центральный Сибирский ботанический сад
СО РАН,
630090, г. Новосибирск,
ул. Золотодолинская, 101,
Российская Федерация,
✉ e-mail: olnevaster@gmail.com

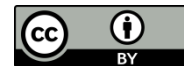
Загурская Юлия Васильевна,
к.б.н., научный сотрудник,
Федеральный исследовательский центр
угля и углехимии СО РАН
(Институт экологии человека),
650000, г. Кемерово, пр-т Советский, 18,
Российская Федерация,
e-mail: syjil@mail.ru

Уфимцев Владимир Иванович,
к.б.н., ведущий научный сотрудник,
Федеральный исследовательский центр
угля и углехимии СО РАН
(Институт экологии человека),
650000, г. Кемерово, пр-т Советский, 18,
Российская Федерация,
e-mail: uwy2079@gmail.com

Оригинальная статья / Original article

УДК 663.423

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-479-486>



Исследование ароматобразующих компонентов хмеля с применением химических сенсоров

© А.В. Коростелев, П.В. Рукавицын, И.В. Новикова, Т.А. Кучменко, Р.У. Умарханов, А.С. Муравьев

Воронежский государственный университет инженерных технологий,
г. Воронеж, Российская Федерация

Резюме: Проведен подбор массива сенсоров с учетом специфики компонентного состава эфирного масла хмеля. Исследована интенсивность аромата нескольких сортов хмеля путем применения высокочастотных пьезоэлектрических резонаторов с высокой чувствительностью, низкими пределами обнаружения легколетучих компонентов. Аналитические сигналы массива сенсоров в парах равновесной газовой фазы проб были скомпонованы в многомерный набор данных, представленных в виде «визуального отпечатка» (диаграммы построены по максимальным откликам сенсоров в равновесной газовой фазе образцов в течение временного интервала 60 с). Данные для образцов с приемлемыми органолептическими характеристиками, соответствующими нормативным документам, принимали за стандарт. Для исследуемых образцов отклики химических сенсоров в равновесной газовой фазе были представлены в виде суммарного сигнала и сопоставлены с «визуальным отпечатком» максимумов для стандарта в программном обеспечении, рассчитаны площади фигур отпечатков S_{Σ} , $G_{c.s.}$. В качестве дополнительных характеристик были применены 5 параметров идентификации A_{ij} , рассчитанные по сигналам отдельных сенсоров в газовой фазе анализируемых образцов и выбранных стандартов. При относительном различии параметров фигур «визуального отпечатка» менее чем на 20% была установлена идентичность состава анализируемой пробы и соответствующего стандарта. При относительном различии более 20% параметров фигур сигналов пробу считали не идентичной выбранному стандарту. Результаты исследований использованы для установления идентичности или аутентичности проб гранулированного хмеля из разных партий.

Ключевые слова: хмель, аромат, эфирные масла, химические сенсоры, легколетучие компоненты

Информация о статье: Дата поступления 27 марта 2020 г.; дата принятия к печати 31 августа 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2020 г.

Для цитирования: Коростелев А.В., Рукавицын П.В., Новикова И.В., Кучменко Т.А., Умарханов Р.У., Муравьев А.С. Исследование ароматобразующих компонентов хмеля с применением химических сенсоров. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 3. С. 479–486. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-479-486>

Study of hop aroma components using chemical sensors

Alexey V. Korostelev, Pavel V. Rukavitsyn, Inna V. Novikova,
Tatyana A. Kuchmenko, Ruslan U. Umarchanov, Aleksandr S. Muravev

Voronezh state university of engineering technologies,
Voronezh, Russian Federation

Abstract: An array of sensors was selected taking into account the specific component composition of the essential oil contained in the hop plant. The aroma intensity of several hop varieties was investigated using high-frequency piezoelectric resonators with a high sensitivity and low detection limits for volatile components. Analytical signals of the sensor array in the vapour of the equilibrium gas phase of the samples were assembled into a multidimensional data set, presented in the form of a “visual imprint” (diagrams were plotted according to the maximum responses of the sensors in the equilibrium gas phase of the samples during a time interval of 60 s). Data for the samples with acceptable organoleptic characteristics complying with regulatory documents were taken as the standard. For the samples under study, the responses of chemical sensors in the equilibrium gas phase were presented in the form of a total signal and compared with the “visual imprint” of the maxima for the standard; the areas of indentation figures were calculated – S_{Σ} , $G_{c.s.}$. As

additional characteristics, 5 identification parameters A_{ij} were used, calculated from the signals of individual sensors in the gas phase of the analyzed samples and selected standards. The identity between the composition of the sample under analysis and the corresponding standard was established, when the relative difference in the parameters of the "visual imprint" figures did not exceed 20%. Conversely, a sample was considered not identical to the selected standard, when the relative difference was higher than 20%. The experimental results were used to establish the identity or authenticity of hop pellet samples from different batches.

Keywords: hops, aroma, essential oils, chemical sensors, volatile components

Information about the article: Received March 27, 2020; accepted for publication August 31, 2020; available online September 30, 2020.

For citation: Korostelev AV, Rukavitsyn PV, Novikova IV, Kuchmenko TA, Umarchanov RU, Muravev AS. Study of hop aroma components using chemical sensors. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):479–486. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-479-486>

ВВЕДЕНИЕ

Хмелевое эфирное масло придает хмелю присущий ему специфический аромат. Хмелевое масло – смесь летучих маслообразных веществ с приятным ароматом, содержащихся в основном в лупулине. Эфирное масло содержит около 300 соединений, компоненты эфирного масла состоят из двух фракций: углеводородной (40–80 %) и кислородосодержащей. Большую часть (60–80 %) углеводородной фракции составляют мирцен, кариофиллен, гумулен, гераниол, линалоол и фарнезен. Мирцен придает аромату остроту и может быть причиной резкого аромата (в хмеле с «тонким» ароматом его не более 50 %). Содержание гумулена положительно сказывается на аромате, поэтому в сортах с «тонким» ароматом его содержание выше. При хранении хмеля под влиянием кислорода воздуха, а также в результате активности ферментов и жизнедеятельности микроорганизмов происходят окислительные и биохимические процессы, оказывающие влияние на качество хмеля и пива [1, 2].

Качество и безопасность гранулированного хмеля как сырья для пивоваренного производства контролируют по набору физико-химических и органолептических показателей. При постоянстве и соответствии нормам физико-химических показателей проб гранулированного хмеля на производстве возникает проблема в оценке различий аромата, определяющего в процессе дальнейшего производства органолептические свойства пива. Органолептическая объективная оценка аромата предполагает наличие не менее 5 квалифицированных дегустаторов, что невыполнимо для малотоннажных производств. Органолептический анализ проб хмеля достаточно длителен, результаты анализа зависят от многих факторов, и в случае изучения данных объектов воспроизводимость результатов и их математическая обработка являются сложными задачами. Не менее важным является решение задач контроля воспроизводимости аромата разных партий хмеля одного производителя (или нескольких производителей) с целью сохранения прослежи-

ваемости схожих органолептических свойств пива. Актуальна апробация сортов хмеля для приготовления разнообразных сортов пива, в том числе с применением сухого охмеления [7–12].

Цель работы – экспресс-оценка аромата сортов хмеля с помощью системы искусственного интеллекта. Задачей исследования являлись: подбор массива сенсоров с учетом специфики компонентного состава эфирного масла хмеля; исследование интенсивности аромата сортов хмеля для установления идентичности или аутентичности проб гранулированного хмеля из разных партий.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Применяли образцы хмеля сорта Перле урожая 2014, 2015 гг. Хмель урожая 2015 г. (стандарт 1 – С1) – тип 45, $\alpha = 7,0\%$; хмель урожая 2014 г. (стандарт 2 – С2) – тип 45, $\alpha = 10,0\%$. Провели сравнение обоих стандартов с анализируемым образцом из партии, для которой нужно доказать соответствие или принадлежность продукции одному из производителей стандартов 1 или 2. Исследование идентичности проб гранулированного хмеля по запаху с применением химических сенсоров проводили в статическом детектирующем устройстве «пьезоэлектронный нос» (в ООО «Сенсорика – новые технологии»). Матрица прибора сформирована из пьезорезонаторов с различными пленками сорбентов на обеих сторонах кристалла, обеспечивающего высокую чувствительность, низкий предел обнаружения, простоту работы, экспрессность анализа без сложной пробоподготовки. Устройство позволяет обеспечить одновременность детектирования нескольких компонентов легколетучей фракции запаха, удобную визуализацию индивидуального профиля химического состава запаха проб, сохранение и сравнение их в любое время, в том числе удаленно в программном обеспечении. В результате получают качественные и количественные критерии, позволяющие объективно принимать решение о степени идентичности проб гранулированного

хмеля как для оценки воспроизводимости аромата, так и оценки изменений в процессе его хранения [3–6]. Идентичность проб гранулированного хмеля по запаху устанавливали с применением химических сенсоров, что включало подготовку пробы, отбор равновесной газовой фазы и детектирование легколетучих компонентов.

Осуществляли подбор системы сенсоров для проведения исследований образцов хмеля.

Для модификации электродов семи пьезокварцевых резонаторов АТ-среза с базовой частотой колебаний 10,0 МГц применяли растворы поливинилпирролидона, (ПВП), полиэтиленгликоль фталата (ПЭГФ), полиэтиленгликоль сукцината (ПЭГСк), полиэтиленгликоля (ПЭГ-2000), дициклогексана-18-краун-6 (18К6), пчелиного клея (прополис) (ПК), полиэтиленгликоль себацината (ПЭГСб). Тонкие пленки сорбентов формировали нанесением микрошприцем их растворов на тензочувствительную область пьезокварцевых резонаторов (электродов). При выборе покрытий электродов учитывали необходимость идентификации веществ, определяющих аромат гранулированного хмеля, его индивидуальность для разных наименований и производителей. Избыток растворителя удаляли в сушильном шкафу в течение 15–20 мин при температуре 40 °С. Чувствительность по массе адсорбируемых молекул данным набором сенсоров составляет не менее 8 Гц/10 нг сорбата, предел обнаружения летучих соединений наиболее чувствительного сенсора 1 составляет 150 нг/дм³.

Пробу гранулированного хмеля в нативном состоянии массой 5–10 г. помещали в стеклянный бюкс на ½ от объема. Герметично закрыва-

ли инертной мягкой мембраной, выдерживали в течение 20 мин, отбирали стерильным шприцем 3 см³ равновесной газовой фазы над пробой, вкалывали пробу в закрытую ячейку детектирования.

При диффузии легколетучих веществ в околосенсорное пространство ячейки детектирования и их адсорбции на пленках химических сенсоров изменялись частоты колебаний кварцевой пластины химических сенсоров, которые регистрировали в программном обеспечении в течение 60 с с шагом 1 с.

После измерения регенерация сенсора (полное восстановление начальной частоты колебаний) производили с помощью обработки сенсора осушенным лабораторным воздухом, подающимся в ячейку с помощью компрессора в течение 4–6 с. Аналитическим сигналом массива сенсоров в парах равновесной газовой фазы проб, принимаемых за стандарт и соответствующих по показателям нормативным документам, с приемлемыми органолептическими характеристиками являлся многомерный набор данных, представляемых в виде «визуального отпечатка» максимумов (рис. 1). Сопоставляли «визуальные отпечатки» анализируемых образцов и стандартов, рассчитывали площади и другие параметры фигур с помощью специального программного обеспечения [13–15]. При относительном различии параметров фигур менее чем на 20 % делали вывод об идентичности состава анализируемой пробы и соответствующего стандарта. При относительном различии более 20% различия в составе смеси легколетучих соединений считали значимыми, а пробу – не идентичной выбранному стандарту.

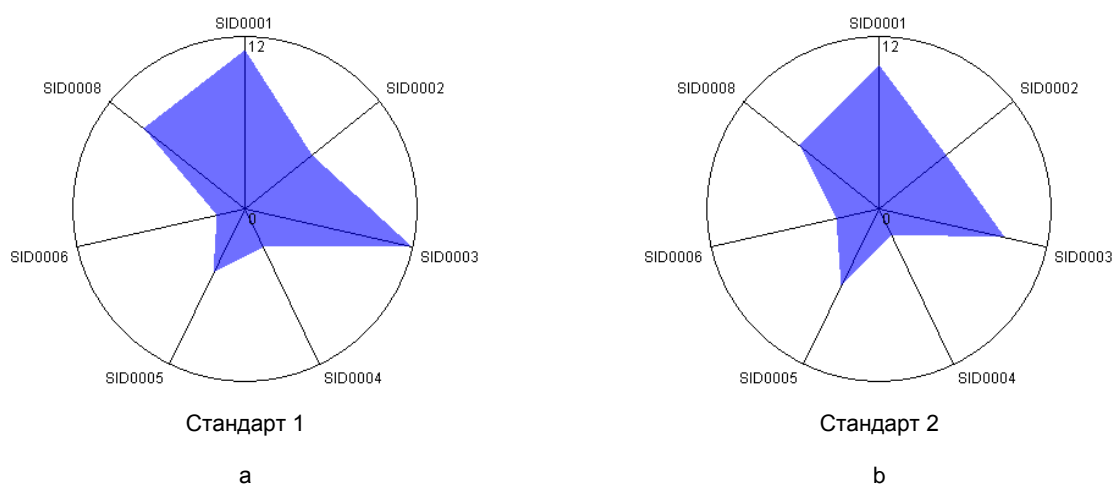


Рис. 1. «Визуальные отпечатки» максимумов для образцов проб хмеля разных производителей: стандарт 1 (a) и стандарт 2 (b). По осям – номера сенсоров с различными покрытиями, по вертикали – максимальные отклики сенсоров за время измерения (ΔF_{\max} , Гц)

Fig. 1. "Visual imprints" of maximums for hop samples from different manufacturers. Standard 1 (a) and Standard 2 (b). The axes show the sensor numbers with different coatings. Vertically, the maximum sensor responses during the measurement (ΔF_{\max} , Hz) are given

При совпадении физико-химических показателей, измеренных другими методами (например, ВЭЖХ-анализ), выявление значимых различий свидетельствовало об изменении аромата партии хмеля, что может приводить к изменению органолептических показателей пива. Снижение степени идентичности «визуальных отпечатков» максимумов можно объяснить нарушением технологии производства гранулированного хмеля, изменением сорта или качества сырья, порчей сырья, несоблюдением условий хранения хмеля и др. [16–20].

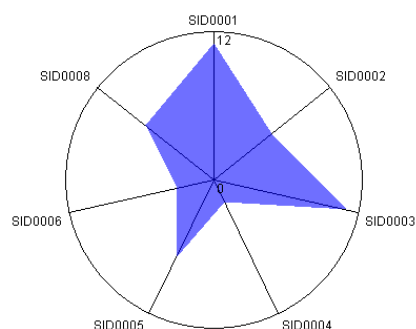
Продолжительность анализа с учетом пробоподготовки составляла 25 мин при двухкратном повторении измерения, время измерения – 1 мин; число измерений без обновления массива сенсоров – 150. Продолжительность повторного нанесения пленок на электроды пьезорезонаторов – не более 45 мин.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Провели анализ образца гранулированного хмеля (анализируемый образец) из партии, для которой нужно было доказать соответствие или принадлежность продукции одному из производителей (стандарту 1 или 2) (рис. 2). По физико-химическим показателям анализируемый образец соответствует всем требуемым нормам для продукции всех производителей и соответствует стандартам – образцам двух лидеров рынка гранулированного хмеля 1 и 2. При этом вызывал сомнение аромат образца, по которому трудно доказать соответствие ранее реализованной партии гранулированного хмеля производителя 1. Для измерения качественного и количественного состава легколетучей фракции запаха всех проб и их сравнения применен набор химических сенсоров в приборе «пьезоэлектронный нос».

Аналитическим сигналом массива сенсоров в парах равновесной газовой фазы проб, принимаемых за стандарт и соответствующих по показателям нормативным документам, с приемлемыми органолептическими характеристиками запаха являлся многомерный набор данных, представленных в виде «визуального отпечатка» максимумов. Диаграммы построены по максимальным откликам сенсоров в равновесной газовой фазе образцов за 60 с. «Визуальные отпечатки» мак-

симумов для анализируемого образца (см. рис. 2) и стандартов (см. рис. 1) сопоставляли в программном обеспечении, рассчитывали их площадь S_{Σ} , Гц.с и другие характеристики.



Анализируемый образец

Рис. 2. «Визуальный отпечаток» максимумов для анализируемого образца гранулированного хмеля, для которого необходимо установить идентичность пробам стандартов 1 или 2

Fig. 2. “Visual imprint” of the maximum for the analyzed granular hop to ascertain the identity to Standard 1 or 2

Площадь «визуальных отпечатков» сигналов сенсоров в большей степени характеризует интенсивность запаха образцов. Качественный химический состав смеси детектируемых сенсорами соединений, формирующих легколетучую фракцию запаха, отражает набор расчетных параметров идентификации A_{ij} , рассчитанных по сигналам отдельных сенсоров в парах анализируемого образца и выбранных стандартов как частное откликов двух сенсоров (таблица). Это относительная характеристика сравнения чувствительности двух сенсоров по отношению к одному и тому же набору соединений (безразмерная величина). Для массива из семи сенсоров таких параметров может быть 24. Но для каждого вида смеси соединений выбираются наиболее представительные показатели (минимаксные значения набора). Таких показателей для анализируемых проб 4 и рассчитаны они по сигналам сенсоров, проявляющих сродство и селективность к спиртам, кислотам, аминам, альдегидам, специфическим ароматическим соединениям.

Параметры идентификации
 Identification Parameters

Вид пробы	S_{Σ} , Гц.с	Относительное изменение S_{Σ} , %	Вид параметра A_{ij}			
			1	2	3	4
Стандарт 1	123*		0,27	1,33	0,67	2,0
Стандарт 2	98		0,20*	1,29	1,5	3,0
Анализируемый образец (А)	112		0,18	1,57	1,5	3,0
Стандарт 1 – А		9				
Стандарт 2 – А		14				
Совпадение показателей	Стандарт 1 – А Стандарт 2 – А	X X	– X	– –	– X	– X

*Отмечены параметры, близкие друг другу; X – совпадение показателей.

По форме «визуального отпечатка» максимумов и относительной разнице площадей для анализируемого образца и стандартов 1 и 2 не установлено существенных отличий. По сравнению со стандартами 1 и 2 относительное изменение площади «визуального отпечатка» максимумов для анализируемой пробы менее 20%. Но с учетом дополнительных параметров A_{ij} анализируемый образец отличался от стандарта 1 на 80% (4 из 5 выбранных параметров различаются), а от стандарта 2 – на 20% (отличался 1 из 5 выбранных показателей). Различия в аромате анализируемой пробы гранулированного хмеля от стандарта 1 значимы, от стандарта 2 – не значимы. С учетом задачи (доказать соответствие какому-либо из стандартов) принимали, что анализируемый образец по составу легколетучей фракции запаха идентичен стандарту 2, а значит, не соответствует продукции производителя более ранних партий хмеля со стандартом 1.

Продолжительность анализа с учетом пробоподготовки составила 25 мин с учетом двукратного повторения измерения, время измерения – 1 мин.

ВЫВОДЫ

Исследование аромата образцов хмеля с помощью химических сенсоров может обеспечить экспрессность анализа хмеля без сложной пробоподготовки, с высокой чувствительностью, низкими пределами обнаружения легколетучих компо-

нентов аромата. Чувствительность химических сенсоров, модифицированных различными фазами сорбентов малой массы, позволяет провести одновременно детектирование нескольких компонентов легколетучей фракции аромата (при применении одновременно семи разнохарактерных химических сенсоров). Возможна визуализация индивидуального профиля химического состава запаха образцов, сохранение и сравнение их в программном обеспечении в любое время, в том числе удаленно.

Метод исследования обеспечивает получение качественных (параметры А) и количественных (площадь «визуального отпечатка») критериев, позволяющих объективно идентифицировать пробы сортового хмеля разных лет урожая и определить изменения их органолептических характеристик в процессе хранения. Отклики химических сенсоров в парах равновесной газовой фазы фиксируются в течение 60 с и формируются в виде суммарного сигнала в «визуальный отпечаток» максимумов, который сопоставляется в программном обеспечении прибора с «визуальным отпечатком» максимумов для стандарта. При относительном различии параметров фигур менее чем на 20 % делается вывод об идентичности состава анализируемой пробы и соответствующего стандарта, при относительном различии более 20% – различия в составе смеси легколетучих соединений считаются значимыми, а проба – не идентичной выбранному стандарту.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Кунце В. Технология солода и пива; пер. с нем. СПб.: Профессия, 2001. 912 с.
2. Меледина Т.В. Сырье и вспомогательные материалы в пивоварении. СПб.: Профессия, 2003. 304 с.
3. Кучменко Т.А. Химические сенсоры на основе пьезокварцевых микровесов. В кн.: Проблемы аналитической химии; под ред. Ю.Г. Власова. Т. 14. Химические сенсоры. М.: Наука, 2011. С. 127–202.
4. Roy R.B., Tudu B., Bandyopadhyay R., Bhattacharyya N. Application of electronic nose and tongue for beverage quality evaluation // Engineering Tools in the Beverage Industry. 2019. Vol. 3. P. 229–254. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815258-4.00008-1>
5. Кучменко Т.А., Шуба А.А., Бельских Н.В. Пример решения идентификационных задач в методе пьезокварцевого микровзвешивания смесей некоторых органических соединений // Аналитика и контроль. 2012. Т. 16. N 2. С. 1–11.
6. Пат. № 2670651, Российская Федерация. Способ установления идентичности проб гранулированного хмеля по запаху с применением химических сенсоров / А.В. Коростелев, Т.А. Кучменко, И.В. Новикова, Р.У. Умарханов, П.В. Рукавицын; заявл. 21.03.2017; опублик. 11.12.2018.
7. Новикова И.В., Юрицын И.А., Муравьев А.С. Исследование влияния интенсивности аэрации на жизнедеятельность дрожжей *Brettanomyces bruxellensis* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9. N 1. С. 102–108. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-1-102-108>
8. Новикова И.В., Рукавицын П.В., Муравьев А.С. К вопросу перехода ароматических соединений хмеля в пиво при реализации сухого охмеления // Пищевая промышленность. 2019. N 1. С. 69–73.
9. Kairbayeva A., Vasilenko V., Dzinguilbayev S., Baibolova L., Frolova L. Development of the mathematical model for the process of oil raw materials pressing // Journal of Engineering & Applied Sciences. 2017. Vol. 12. Issue 6 Sl. P. 7836–7842. <https://doi.org/10.36478/jeasci.2017.7836.7842>
10. Авцинов И.А., Кожевников Ю.Е., Суханова Н.В. Модель кинетики процесса культивирования микроорганизмов // Вестник Тамбовского государственного технического университета. 2017. Т. 23. N 3. С. 481–487. <https://doi.org/10.17277/vestnik.2017.03.pp.481-487>
11. Шелехова Н.В., Поляков В.А., Сербя Е.М., Шелехова Т.М., Веселовская О.В., Скворцова Л.И. Информационные технологии в аналитическом контроле качества алкогольной продукции //

Пищевая промышленность. 2018. N 8. С. 30–33.

12. Матвеева, Н.А., Титов А.А. Применение технологии сухого охмеления в пивоварении // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия: Процессы и аппараты пищевых производств. 2015. N 1. С. 111–118.

13. Zhong Y. Electronic nose for food sensory evaluation // *Evaluation Technologies for Food Quality*. 2019. P. 7–22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814217-2.00002-0>

14. Singh T.S., Verma P., Yadava R.D.S. Fuzzy subtractive clustering for polymer data mining for SAW sensor array based electronic nose // *Proceedings of Sixth International Conference on Soft Computing for Problem Solving*. Springer, Singapore, 2017. P. 245–253.

15. Zhang L., Tian F., Zhang D. In: *Electronic Nose: Algorithmic Challenges*. Springer, Singapore. 2018. P. 11–20. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2167-2_2

16. Men H., Shi Y., Jiao Y., Gong F., Liu J. Electronic nose sensors data feature mining: a synergetic strategy for the classification of beer // *Analytical Methods*. 2018. Vol. 10. Issue 17. P. 2016–2025. <https://doi.org/10.1039/C8AY00280K>

17. Santos J.P., Lozano J., Aleixandre M. Electronic noses applications in beer technology (open access peer-reviewed chapter). In: Kanauchi M. (ed.), *Brewing Technology*. IntechOpen, 2017. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68822>

18. Aliani M., Eideh A., Kapourchali F.R., Alharbi R., Fahmi R. Evaluation of bitterness by the electronic tongue: correlation between sensory tests and instrumental methods. In: Aliani M, Eskin MNA (eds.) *Bitterness: Perception, Chemistry and Food Processing*. John Wiley & Sons, Inc.; 2017. Chapter 9. P. 195–207. <https://doi.org/10.1002/9781118590263>

19. Ocvirk M., Mlinarič N.K., Košir I.J. Comparison of sensory and chemical evaluation of lager beer aroma by gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2018. Vol. 98. Issue 10. P. 3627–3635. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8840>

20. Martins C., Almeida A., Rocha S.M. Recent advances and challenges for beer volatile characterization based on gas chromatographic techniques // *Recent Advances in Analytical Techniques*. 2017. Vol. 1. P. 141–199. <https://doi.org/10.2174/97816810844731170101>

REFERENCES

1. Kunze W. *Technologie Brauer und Mälzer*. Im Verlag der Berlin (Russ. ed.: Kunze W. *Tekhnologiya soloda i piva*. St. Petersburg: Professiya; 2001. 912 p.)

2. Meledina TV. *Raw and auxiliary materials in brewing*. St. Petersburg: Professiya; 2003. 304 p. (In Russian)

3. Kuchmenko TA. Chemical sensors based on piezoquartz microweights. In: *Problems of analytical chemistry*. Vol. 14. Moscow: Nauka; 2011. p. 127–202. (In Russian)

4. Roy RB, Tudu B, Bandyopadhyay R, Bhattacharyya N. Application of electronic nose and tongue for beverage quality evaluation. *Engineering Tools in the Beverage Industry*. 2019;3:229–254. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815258-4.00008-1>

5. Kuchmenko TA, Shuba AA, Belskich NV. The identification parameters of organic substances in multisensors piezoquartz microbalance. *Analitika i kontrol = Analytics and Control*. 2012;16(2):1–11. (In Russian)

6. Korostelev AV, Kuchmenko TA, Novikova IV, Umarchanov RU, Rukavitsyn PV. Method of identification of granulated hop samples by odor with chemical sensors. Patent RF, no. 2670651; 2017. (In Russian)

7. Novikova IV, Yuritsyn IA, Muravev AS. Effects of aeration intensity on the growth and activity of *Brettanomyces bruxellensis*. *Izvestia Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universitets. Applied chemistry and biotechnology*. 2019;9(1):102–108. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-1-102-108>

8. Novikova IV, Rukavitsyn PV, Murav'ev AS. To the question of hops aromatic compounds transition to beer during dry hopping process. *Pishchevaya promyshlennost' = Food Industry*. 2019;1:69–73. (In Russian)

9. Kairbayeva A, Vasilenko V, Dzhinguilbayev S, Baibolova L, Frolova L. Development of the mathematical model for the process of oil raw materials pressing. *Journal of Engineering & Applied Sciences*. 2017;12(6):7836–7842.

<https://doi.org/10.36478/jeasci.2017.7836.7842>

10. Avtsinov IA, Kozhevnikov YuE., Sukhanova NV. Model of kinetics of the microorganisms cultivation process. *Vestnik Tambovskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta*. 2017;23(3):481–487. (In Russian) <https://doi.org/10.17277/vestnik.2017.03.pp.481-487>

11. Shelekhova NV, Polyakov VA, Serba EM, Shelekhova TM, Veselovskaya OV, Skvorcova LI. Information technology in the analytical quality control of alcoholic beverage. *Pishchevaya promyshlennost' = Food Industry*. 2018;8:30–33. (In Russian)

12. Matveeva NA, Titov AA. The use of dry hopping technique in brewing. *Nauchnyi zhurnal NIU ITMO. Seriya: Processy i apparaty pishchevykh proizvodstv = Scientific Journal NRU ITMO. Series "Processes and Food Production Equipment"*. 2015;1:111–118. (In Russian)

13. Zhong Y. Electronic nose for food sensory evaluation. *Evaluation Technologies for Food Quality*. 2019:7–22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814217-2.00002-0>

14. Singh TS, Verma P, Yadava RDS. Fuzzy

subtractive clustering for polymer data mining for SAW sensor array based electronic nose. In: *Proceedings of Sixth International Conference on Soft Computing for Problem Solving*. Springer, Singapore, 2017:245–253.

15. Zhang L, Tian F, Zhang D. In: *Electronic Nose: Algorithmic Challenges*. Springer, Singapore. 2018. P. 11–20. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2167-2_2

16. Men H, Shi Y, Jiao Y, Gong F, Liu J. Electronic nose sensors data feature mining: a synergetic strategy for the classification of beer. *Analytical Methods*. 2018;10(17):2016–2025. <https://doi.org/10.1039/C8AY00280K>

17. Santos JP, Lozano J, Aleixandre M. Electronic noses applications in beer technology (open access peer-reviewed chapter). In: Kanauchi M. (ed.), *Brewing Technology*. IntechOpen; 2017. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68822>

18. Aliani M, Eideh A, Kapourchali FR, Alharbi R, Fahmi R. Evaluation of bitterness by the electronic tongue: correlation between sensory tests and instrumental methods. In: Aliani M, Eskin MNA (eds.) *Bitterness: Perception, Chemistry and Food Processing*. John Wiley & Sons, Inc.; 2017. Chapter 9. P. 195–207. <https://doi.org/10.1002/9781118590263>

19. Ocvirk M, Mlinarič NK, Košir IJ. Comparison of sensory and chemical evaluation of lager beer aroma by gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2018;98(10):3627–3635. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8840>

20. Martins C, Almeida A, Rocha SM. Recent advances and challenges for beer volatile characterization based on gas chromatographic techniques. In: *Recent Advances in Analytical Techniques*. Vol. 1. Chapter 5. Bentham Science Publishers; 2017. p.141–199. <https://doi.org/10.2174/97816810844731170101>

Критерии авторства

Коростелев А.В., Рукавицын П.В., Новикова И.В., Кучменко Т.А., Умарханов Р.У., Муравьев А.С. выполнили экспериментальную работу. Авторы совместно обобщили результаты, написали рукопись, имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Коростелев Алексей Васильевич,
к.т.н., доцент кафедры технологии
бродильных и сахаристых производств,
Воронежский государственный университет
инженерных технологий,
394036, г. Воронеж, пр-т Революции, 19,
Российская Федерация,
e-mail: kafedra_tbisp@mail.ru

Рукавицын Павел Владимирович,
экстерн кафедры технологии бродильных
и сахаристых производств,
Воронежский государственный университет
инженерных технологий,
394036, г. Воронеж, пр-т Революции, 19,
Российская Федерация

Contribution

Alexey V. Korostelev, Pavel V. Rukavitsyn, Inna V. Novikova, Tatyana A. Kuchmenko, Ruslan U. Umarchanov, Aleksandr S. Muravev carried out the experimental work. The authors on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. All authors have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict interests

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

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

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Alexey V. Korostelev,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Technologies of Fermentation and Sugar
Industries Department,
Voronezh State University of Engineering
Technologies,
19, Revolutsii Ave., Voronezh, 394036,
Russian Federation,
e-mail: kafedra_tbisp@mail.ru

Pavel V. Rukavitsyn,
Postgraduate Student,
Technologies of Fermentation and Sugar
Industries Department,
Voronezh State University of Engineering
Technologies,
19, Revolutsii Ave., Voronezh, 394036,
Russian Federation

Новикова Инна Владимировна,
д.т.н., профессор кафедры технологии
броидильных и сахаристых производств,
Воронежский государственный университет
инженерных технологий,
394036, г. Воронеж, пр-т Революции, 19,
Российская Федерация,
✉ e-mail: noviv@list.ru

Кучменко Татьяна Анатольевна,
д.х.н., профессор, заведующая кафедрой
физической и аналитической химии,
Воронежский государственный университет
инженерных технологий,
394036, г. Воронеж, пр-т Революции, 19,
Российская Федерация

Умарханов Руслан Умарханович,
доцент кафедры физической
и аналитической химии,
Воронежский государственный университет
инженерных технологий,
394036, г. Воронеж, пр-т Революции, 19,
Российская Федерация

Муравьев Александр Сергеевич,
к.т.н., инженер отдела стандартизации
и метрологии,
Воронежский государственный университет
инженерных технологий
394036, г. Воронеж, пр-т Революции, 19,
Российская Федерация,
e-mail: hntrun@mail.ru

Inna V. Novikova,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Technologies of Fermentation and Sugar
Industries department,
Voronezh State University of Engineering
Technologies,
19, Revolutsii Ave., Voronezh, 394036,
Russian Federation,
✉ e-mail: noviv@list.ru

Tatyana A. Kuchmenko,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Head of the Department of Physical
and Analytical Chemistry,
Voronezh State University of Engineering
Technologies,
19, Revolutsii Ave., Voronezh, 394036,
Russian Federation

Ruslan U. Umarkhanov,
Associate Professor,
Department of Physical and Analytical Chemistry,
Voronezh State University of Engineering
Technologies,
19, Revolutsii Ave., Voronezh, 394036,
Russian Federation

Aleksandr S. Muravev
Cand. Sci. (Engineering), Engineer,
Department of Metrology and Standardization,
Voronezh State University of Engineering
Technologies,
19, Revolutsii Ave., Voronezh, 394036,
Russian Federation,
e-mail: hntrun@mail.ru

Оригинальная статья / Original article

УДК 604.2

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-487-495>



Протатраны – биомодуляторы роста дрожжей *Candida ethanolica*

© А.С. Кирюхина*, Т.С. Лозовая*, Е.А. Привалова*,
В.Г. Федосеева**, Е.Н. Оборина**, С.Н. Адамович**,
И.Б. Розенцвейг***,****

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

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

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

Резюме: Целью работы являлось исследование соединений из ряда протатранов в качестве биостимуляторов роста дрожжей *Candida ethanolica*, что обусловлено необходимостью определения условий, способствующих ускорению роста микроорганизмов в присутствии высокоэффективных, физиологически активных, нетоксичных соединений – протатранов. В качестве объекта исследований использовали дрожжи *Candida ethanolica*. Дрожжи культивировали на синтетической питательной среде, содержащей в качестве источника углерода 1,5%-й раствор этанола. Протатраны использовали в концентрациях $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-9}$ % масс. Количество клеток дрожжей контролировали путем определения оптической плотности дрожжевых суспензий на фотозлектроколориметре КФК-3 марки Zotaх при длине волны 540 нм, при длине оптического пути 10 мм. Определение биомассы дрожжей осуществляли гравиметрическим методом. На первом этапе работы было изучено накопление клеток и биомассы при различной исходной концентрации клеток дрожжей. Выявлено, что при незначительном увеличении исходной концентрации клеток дрожжей происходит заметный сдвиг влево всей S-кривой. На втором этапе было изучено влияние протатранов на накопление клеток и биомассы при различной исходной концентрации клеток дрожжей. Сравнение полученных данных между собой показало, что исследованные протатраны существенно увеличивали удельную скорость роста и сокращали время генерации в период лог-фазы в том случае, если на данную фазу приходилась значительная часть процесса культивирования. Однако наличие протатранов значительно замедляло удельную скорость роста и увеличивало период генерации в лог-фазе в том случае, если культура значительную часть времени культивирования находилась в стационарной фазе. Возможно, это вызвано положительным влиянием протатранов на синтез белка, который наиболее интенсивен во время лог-фазы. Применение протатранов позволяет модулировать количество клеток, количество биомассы, удельную скорость роста и время генерации дрожжей *Candida ethanolica* в зависимости от исходной концентрации клеток и, соответственно, от фазы роста культуры.

Ключевые слова: протатраны, биомодуляторы, дрожжи, одноклеточный белок, *Candida ethanolica*, биомасса

Благодарности: Синтез протатранов проведен на оборудовании Байкальского аналитического центра коллективного пользования СО РАН. Работа выполнена в рамках Интеграционной программы Иркутского научного центра СО РАН «Фундаментальные исследования и прорывные технологии как основа опережающего развития Байкальского региона и его межрегиональных связей», при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Иркутской области в рамках научных проектов 20-43-380001 и 20-016-00114.

Информация о статье: Дата поступления 15 января 2020 г.; дата принятия к печати 31 августа 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2020 г.

Для цитирования: Кирюхина А.С., Лозовая Т.С., Привалова Е.А., Федосеева В.Г., Оборина Е.Н., Адамович С.Н., Розенцвейг И.Б. Протатраны – биомодуляторы роста дрожжей *Candida ethanolica*. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 3. С. 487–495. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-487-495>

Protatrans as biomodulators of *Candida ethanolica* growth

Aleksandra S. Kiryukhina*, Tat'yana S. Lozovaya*, Elena A. Privalova*,
Victoria G. Fedoseeva**, Elizaveta N. Oborina**, Sergei N. Adamovich**,
Igor B. Rozentsveig***

*Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation

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

***Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

Abstract: This study was aimed at investigating compounds from a series of protatranses as biostimulants for the growth of the *Candida ethanolica* yeast. The relevance of the study is associated with the need to determine conditions accelerating the growth of microorganisms in the presence of such highly effective, physiologically active and non-toxic compounds as protatranses. The research object was the *Candida ethanolica* yeast cultivated on a synthetic nutrient medium containing 1.5% ethanol solution as a carbon source. Protatranses were used at concentrations of $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-8}$ wt%. The number of yeast cells was controlled by determining the optical density of yeast suspensions using a KFK-3 Zomax photoelectrocolorimeter at a wavelength of 540 nm and optical path length of 10 mm. The determination of yeast biomass was carried out gravimetrically. The first stage of the work set out to study the accumulation of cells and biomass at various initial yeast cell concentrations. It was revealed that a slight increase in the initial concentration of yeast cells leads to a noticeable shift of the entire S-curve to the left. A comparison of the obtained data sets showed that the investigated protatranses significantly increase the specific growth rate and reduce the generation time during the log phase, provided that this phase accounts for a significant part of the cultivation process. However, the presence of protatranses significantly reduce the specific growth rate and increase the generation period in the log phase, provided that the culture remains in the stationary phase for a significant part of the cultivation time. This is likely to be associated with the positive effect of protatranses on protein synthesis, which is most intense during the log phase. The use of protatranses facilitates the control over the number of cells, amount of biomass, specific growth rate and generation time of the *Candida ethanolica* yeast depending on the initial cell concentration and, accordingly, the growth phase of the culture.

Keywords: protatranses, biomodulators, yeast, unicellular protein, *Candida ethanolica*, biomass

Acknowledgments: The work was carried out within the framework of the Integration Program of the Irkutsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences "Fundamental research and breakthrough technologies as the basis for the advanced development of the Baikal region and its interregional ties" and with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research and the Government of the Irkutsk Region in the framework of scientific projects 20-43-380001 and 20-016-00114.

Information about the article: Received January 15, 2020; accepted for publication August 31, 2020; available online September 30, 2020.

For citation: Kiryukhina AS, Lozovaya TS, Privalova EA, Fedoseeva VG, Oborina EN, Adamovich SN, Rozentsveig IB. Protatrans as biomodulators of *Candida ethanolica* growth. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):487–495. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-487-495>

ВВЕДЕНИЕ

Одним из способов решения проблемы белкового дефицита является культивирование микроорганизмов – продуцентов одноклеточного белка [1, 2]. При его производстве актуальным является ускорение синтеза биомассы микроорганизмов. Для ускорения роста биомассы широко применяются различные биостимуляторы: минеральные соли, аминокислоты, витамины, органические кислоты, экстракты растительного или микробиологического происхождения, природные и специально синтезированные органические соединения. Однако многие из них имеют нестабильный состав, а также относительно большой расход и высокую стоимость, что сни-

жает их потребительские качества [3, 4].

В данном контексте перспективны синтезированные нами доступные физиологически активные соединения – протатраны [5–12]. В качестве основы для дизайна протатранов выбраны два вида доступных реактивов (компонентов): биогенные этаноламины (в частности, триэтанолламин) и биологически активные арилхалькогенилукусусные кислоты. Этанолламины участвуют в процессах внутриклеточного метаболизма и являются составной частью фосфолипидов, холина, ацетилхолина и др. Арилхалькогенилукусусные кислоты обладают широким спектром биологического действия и нашли применение в медицине и сельском хозяйстве [7, 11].

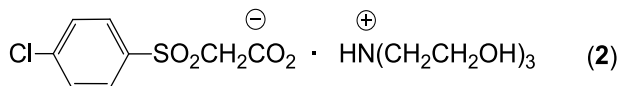
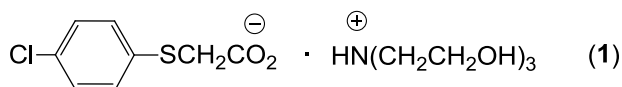
Проведенные ранее исследования позволили выявить разнонаправленное действие протатранов на различные биологические объекты [13], в связи с чем при культивировании микроорганизмов важно понимать, какие факторы способствуют повышению эффективности данного процесса. Для исследования этой проблемы хорошо подходят дрожжи *Candida ethanolica*. В качестве источника углерода они предпочитают использовать этанол, что дает возможность изучать процесс роста микроорганизмов в модельных условиях, так как этиловый спирт является более дешевым источником углерода в сравнении, например, с химически чистой глюкозой, а также он не содержит примесей и хорошо растворяется в воде [2, 14–16].

В связи с вышеизложенным цель настоящей работы состояла в исследовании соединений из ряда протатранов в качестве биостимуляторов роста дрожжей *Candida ethanolica*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объекта исследований использовали дрожжи *Candida ethanolica* Rybarova, Stros et Kockova-Kratochvilova 1980 ВКМ Y-2300 Т. Дрожжи культивировали на синтетической питательной среде следующего состава, г/л: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 10,0; K_2HPO_4 – 10,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,7; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0125; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0125; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0125; NaCl – 0,0063. Культивирование проводили в аэробных условиях при 37 °С. Аэрацию осуществляли на шейкере SERTOMAT BS-1 при интенсивности 200 мин⁻¹. Источником углерода в среде являлся этиловый спирт, вносимый в количестве 1,5% об.

В качестве стимуляторов роста дрожжей *Candida ethanolica* были протестированы химические соединения 1 и 2 ряда протатранов, синтезированные на основе биогенных этаноламинов и арилхалькогенилуксусных кислот:



Протатраны использовали в концентрациях $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-8}$ % масс., которые были установлены в ходе предыдущих исследований [10, 12].

Количество клеток дрожжей контролировали путем определения оптической плотности дрожжевых суспензий на фотоэлектроколориметре КФК-3 марки Zomax при длине волны 540 нм, при длине оптического пути 10 мм. Определение биомассы дрожжей осуществляли гравиметрическим методом [17, 18].

Определение удельной скорости роста и периода генерации вели по методикам, представленным в работе [19], по формулам:

$$\mu = \frac{\ln n_2 - \ln n_1}{t_2 - t_1} \quad (1);$$

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu} \quad (2)$$

где μ – удельная скорость роста, ч⁻¹; n_1 и n_2 – концентрация клеток в момент времени t_1 и t_2 соответственно, кл/мл; g – период генерации (время удвоения числа клеток), ч.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С точки зрения эффективности для биотехнологического производства важен период наибольшего накопления целевого продукта. Поэтому первым этапом работы было построение S-кривой роста дрожжей и определение временных периодов, в которых накапливается наибольшее количество биомассы и клеток.

Культивирование проводили в условиях различной исходной концентрации клеток, поскольку она оказывает большое влияние на продолжительность фаз роста популяции [20]. В процессе культивирования анализировали изменение количества клеток и общей биомассы. Отбор проб осуществляли через 2, 4, 6, 8, 10, 24 и 48 ч культивирования. Результаты представлены на рис. 1, 2.

При исходной концентрации клеток $3 \cdot 10^6$ кл/мл среды фаза адаптации длилась 6 ч, лог-фаза закончилась между 10 и 24 ч культивирования, после чего культура вошла в стационарную фазу. Максимальное количество клеток было выше исходного на 11,0% (см. рис. 1). Изменение количества биомассы соответствовало фазам роста: наблюдалось незначительное увеличение биомассы в конце лаг-фазы, основной экспоненциальный рост – между 8 и 24 ч, постепенное замедление – в стационарной фазе. Итоговое количество биомассы увеличилось в 2,6 раза в сравнении с исходным (см. рис. 2). Таким образом, при исходной концентрации клеток $3 \cdot 10^6$ кл/мл максимальное количество биомассы образовывалось через 48 ч культивирования, причем большая ее часть – во время лог-фазы.

При исходной концентрации клеток дрожжей $9 \cdot 10^6$ кл/мл среды фаза адаптации и лог-фаза были очень короткими (2 и 6 ч соответственно). Большую часть культивирования дрожжи находились в стационарной фазе роста. Количество клеток к концу культивирования увеличилось на 10,8% относительно исходного (см. рис. 2). Изменение количества биомассы соответствовало фазам роста: интенсивное накопление биомассы наблюдалось в фазе адаптации и лог-фазе; затем медленный прирост с увеличением количества биомассы через сутки в 2,2 раза. После чего биомасса клеток стала постепенно снижаться. Это связано с тем, что культура дрожжей находилась уже во второй половине стационарной фазы, когда клетки испытывают значительный

недостаток питательных веществ и для выживания используют внутриклеточные ресурсы [21].

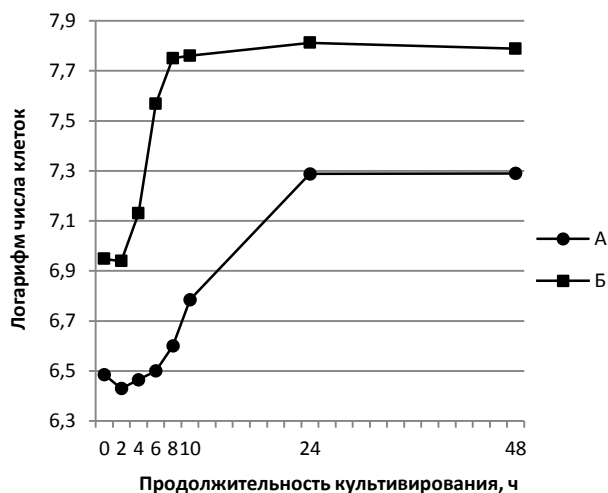


Рис. 1. Влияние исходной концентрации клеток дрожжей на S-кривую (А – $3 \cdot 10^6$ кл/мл; Б – $9 \cdot 10^6$ кл/мл)

Fig. 1. Relationship between the initial concentration of yeast cells and the S-curve (A – $3 \cdot 10^6$ cells/ml; B – $9 \cdot 10^6$ cells/ml)

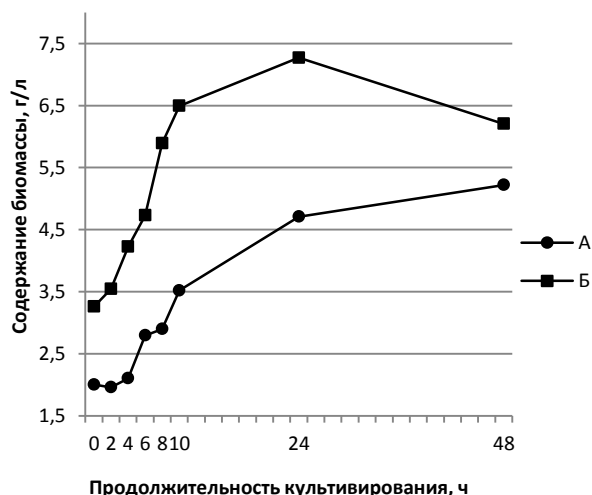


Рис. 2. Влияние исходной концентрации клеток дрожжей на накопление биомассы (А – $3 \cdot 10^6$ кл/мл; Б – $9 \cdot 10^6$ кл/мл)

Fig. 2. Relationship between the initial concentration of yeast cells and biomass accumulation (A – $3 \cdot 10^6$ cells/ml; B – $9 \cdot 10^6$ cells/ml)

Вторым этапом было изучение влияния протатранов 1 и 2 на накопление клеток и биомассы при различной исходной концентрации клеток дрожжей. Контролем (К) служили дрожжи, выращенные без протатранов 1 и 2.

Результаты культивирования дрожжей в присутствии соединений 1 и 2 при исходной концентрации клеток $3 \cdot 10^6$ кл/мл среды представлены на рис. 3, 4 и в таблице. Наличие в питательной среде соединений 1 и 2 сначала незначительно задерживало начало лог-фазы и накопление биомассы, но в период лог-фазы вызывало резкое увеличение биомассы. В результате количество

клеток к 24 ч культивирования увеличилось на 8,6–10,2% относительно контроля и оставалось на достигнутом уровне до конца культивирования (см. рис. 3). Биомасса увеличилась на 59,6–70,9% в сравнении с контролем и тоже оставалась на достигнутом уровне практически до конца культивирования (см. рис. 4). Наличие протатранов 1 и 2 повысило удельную скорость роста дрожжей на 23,8 и 4,8% соответственно, а также снизило период генерации на 19,1 и 4,5% соответственно в период экспоненциальной фазы.

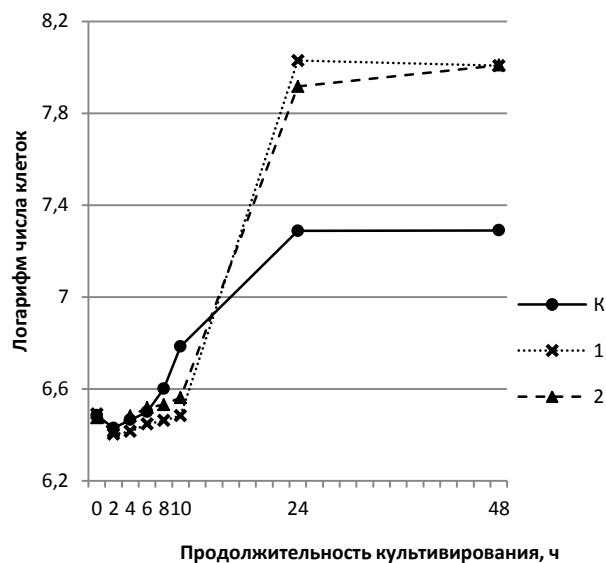


Рис. 3. Влияние протатранов 1 и 2 на S-кривые дрожжей при исходной концентрации клеток $3 \cdot 10^6$ кл/мл

Fig. 3. Effect of protatrans 1 and 2 on the yeast S-curves at an initial cell concentration of $3 \cdot 10^6$ cells/ml

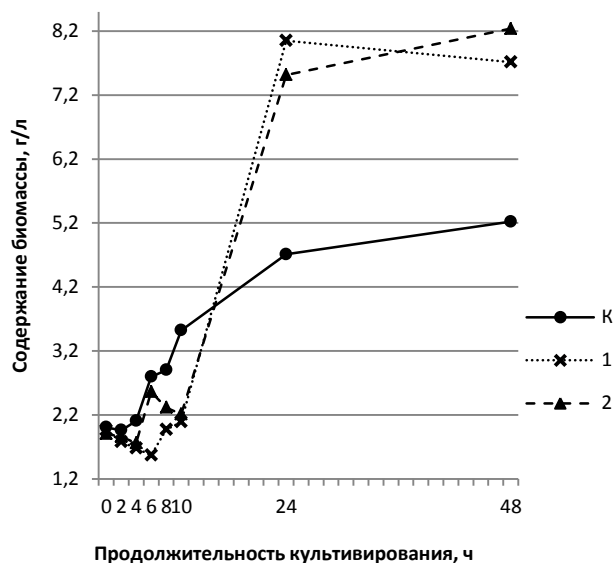


Рис. 4. Влияние протатранов 1 и 2 на биомассу дрожжей при исходной концентрации клеток $3 \cdot 10^6$ кл/мл

Fig. 4. Effect of protatrans 1 and 2 on the yeast biomass at the initial cell concentration of $3 \cdot 10^6$ cells/ml

Влияние протатранов 1 и 2 на показатели роста дрожжей
 Effect of protatranes 1 and 2 on yeast growth indexes

Объект	Удельная скорость роста, μ , ч ⁻¹	Период генерации, g, ч
<i>Исходная концентрация клеток дрожжей $3 \cdot 10^6$ кл/мл (рис. 3)</i>		
Контроль	$\frac{\ln 6,1 \times 10^6 - \ln 4,0 \times 10^6}{10-8} = \frac{15,62-15,2}{2} = 0,21$	$\frac{0,693}{0,21} = 3,30$
Соединение 1	$\frac{\ln 1,1 \times 10^8 - \ln 3,0 \times 10^6}{24-10} = \frac{18,52-14,9}{14} = 0,26$	$\frac{0,693}{0,26} = 2,67$
Соединение 2	$\frac{\ln 8,2 \times 10^7 - \ln 3,6 \times 10^6}{24-10} = \frac{18,22-15,1}{14} = 0,22$	$\frac{0,693}{0,22} = 3,15$
<i>Исходная концентрация клеток дрожжей $9 \cdot 10^6$ кл/мл (рис. 5)</i>		
Контроль	$\frac{\ln 3,7 \times 10^7 - \ln 1,3 \times 10^7}{6-4} = \frac{17,43-16,38}{2} = 0,53$	$\frac{0,693}{0,53} = 1,31$
Соединение 1	$\frac{\ln 3,1 \times 10^7 - \ln 1,4 \times 10^7}{8-6} = \frac{17,25-16,45}{2} = 0,40$	$\frac{0,693}{0,4} = 1,73$
Соединение 2	$\frac{\ln 3,5 \times 10^7 - \ln 1,1 \times 10^7}{8-6} = \frac{17,37-16,21}{2} = 0,58$	$\frac{0,693}{0,58} = 1,19$

При исходной концентрации клеток в среде $9 \cdot 10^6$ кл/мл культивирование дрожжей *Candida ethanolica* в присутствии соединений 1 и 2 привело к снижению количества клеток в период лог-фазы на 1,7–7,0% относительно контроля; в стационарной фазе количество клеток находилось почти на уровне контроля (рис. 5). В присутствии соединений 1 и 2 снижалось также количество биомассы (на 7,0–50,5% относительно контроля соответственно) (рис. 6). Наличие соединения 1 на 24,5% снизило удельную скорость роста в период лог-фазы, что привело к увеличению периода генерации на 32,1%. Наличие соединения 2 на 9,4% повысило удельную скорость роста в период лог-фазы, что привело к снижению периода генерации на 9,2% (см. таблицу).

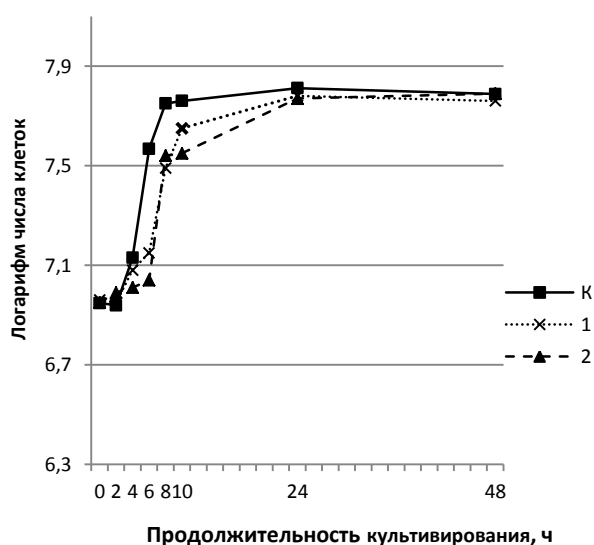


Рис. 5. Влияние протатранов 1 и 2 на S-кривые дрожжей при исходной концентрации клеток $9 \cdot 10^6$ кл/мл

Fig. 5. Effect of protatrans 1 and 2 on the yeast S-curves at the initial cell concentration of $9 \cdot 10^6$ cells/ml

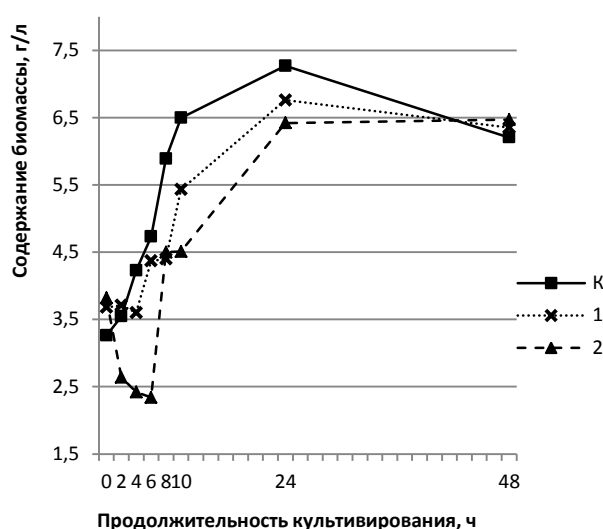


Рис. 6. Влияние протатранов 1 и 2 на биомассу дрожжей при исходной концентрации клеток $9 \cdot 10^6$ кл/мл

Fig. 6. Effect of protatrans 1 and 2 on the yeast biomass at the initial cell concentration of $9 \cdot 10^6$ cells/ml

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При исходной концентрации клеток дрожжей *Candida ethanolica* $3 \cdot 10^6$ кл/мл на лог-фазу приходится 29% времени культивирования (14 ч), а на стационарную – 50% (24 ч). При небольшом (в 3 раза) увеличении исходной концентрации клеток дрожжей (до $9 \cdot 10^6$ кл/мл) 83% времени культивирования (40 ч) клетки находятся в стационарной фазе, т.е. происходит заметный сдвиг влево всей S-кривой. Более высокая исходная концентрация клеток дрожжей приводит к более высокой скорости образования максимального количества клеток и биомассы.

Сравнение полученных данных между собой показало, что протатраны 1 и 2 существенно увеличивают количество клеток и биомассы в том случае, если на лог-фазу приходится значи-

тельная часть времени культивирования.

Однако наличие протатранов **1** и **2** замедляет или угнетает накопление количества клеток и биомассы (т.е. их действие становится отрицательным) в том случае, если в процессе культивирования наблюдается смещение S-кривой в сторону стационарной фазы. Это вызвано, возможно, положительным влиянием протатранов на синтез белка, который наиболее интенсивен во время логарифмического роста.

Анализ влияния данных соединений на удельную скорость роста и время генерации во время лог-фазы показал следующее: когда на данную фазу приходится значительная часть времени культивирования, протатраны **1** и **2** увеличивают удельную скорость роста и сокращают период генерации. Но когда в процессе культивирования наблюдается смещение S-кривой в сторону ста-

онарной фазы, наличие протатрана **1** снижает удельную скорость роста и увеличивает время генерации (т.е. его воздействие становится отрицательным). Однако воздействие протатрана **2** остается таким же положительным и приводит к повышению удельной скорости роста и снижению времени генерации в период лог-фазы. При этом воздействие протатрана **1** является более значительным по сравнению с соединением **2** вне зависимости от вектора этого воздействия.

Таким образом, применение протатранов позволяет модулировать, то есть увеличивать или снижать, количество клеток, количество биомассы, удельную скорость роста и время генерации дрожжей *Candida ethanolica* в зависимости от исходной концентрации клеток и, соответственно, от фазы роста культуры.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Jones S.W., Karpol A., Friedman S., Maru B.T., Tracy B.P. Recent advances in single cell protein use as a feed ingredient in aquaculture // *Current Opinion in Biotechnology*. 2020. Vol. 61. P. 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.026>
2. Reihani S.F.S., Khosravi-Darani K. Influencing factors on single cell protein production by submerged fermentation: A review // *Electron Journal. Biotechnology*. 2019. Vol. 37. P. 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.11.005>
3. Paalme T., Kevvai K., Vilbaste A., Hälvin K., Nisamedtinov I. Uptake and accumulation of B-group vitamins in *Saccharomyces cerevisiae* in ethanol-sterilized batch culture // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014. Vol. 30. P. 2351–2359. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1660-x>
4. Пермякова Л.В. Классификация стимуляторов жизненной активности дрожжей // *Техника и технология пищевых производств*. 2016. N 3 (42). С. 46–55.
5. 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. N 9. С. 1869–1883. <https://doi.org/10.1007/s11172-014-0679-3>
6. 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. P. 149–155. <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0018>
7. Kunaszewska M. Complexogenic properties of ethanolamines. III. Kinetics of some reactions of chromium(III) complexes with triethanolamine in aqueous solutions // *Scientific Bulletin of Lodz Technic University*. 1976. Vol. 31. Issue 267. 65 p.
8. 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>
9. 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>
10. Молокова К.В., Привалова Е.А., Адамович С.Н., Мирскова А.Н., Мирсков Р.Г. Влияние протонных ионных жидкостей на бродильную активность спиртовых дрожжей // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2014. N 1 (6). С. 70–73.
11. Khaliullin F.A., Alekhin E.K., Klen E.E., Ryabchinskaya L.A., Kataev V.A., Bogdanova A.Sh. Synthesis and immunotropic activity of (benzimidazolyl-2-thio)acetic acid derivatives containing thietane cycles // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2001. Vol. 35. Issue 1. P. 11–14. <https://doi.org/10.1002/chin.200137131>
12. Privalova EA, Tiguntseva N.P., Adamovich SN, Mirskov RG, Mirskova AN. Tris(2-hydroxyethyl)ammonium arylchalcogenylacetates, growth stimulants of alcohol yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Russian Chemical Bulletin*. 2017. Vol. 66. Issue 7. P. 1320–1324. <https://doi.org/10.1007/s11172-017-1893-6>
13. 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>
14. Ugalde U.O., Castrillo J.I. Single cell proteins from fungi and yeasts // *Applied Mycology and Biotechnology*. 2002. Vol. 2. P. 123–149. [https://doi.org/10.1016/S1874-5334\(02\)80008-9](https://doi.org/10.1016/S1874-5334(02)80008-9)

15. Пат. № 2061751, Российская Федерация. Штамм дрожжей *Candida ethanolica* – продуцент биомассы / Р.Н. Бравичева, А.Д. Сатрутдинов, В.М. Благодатская, Н.Б. Градова, В.К. Ерошин, Н.А. Салихова [и др.]; заявл. 13.04.1992; опубл. 10.06.1996.

16. Song J.-J., Yuan Y.-H., Liu B., Wang H.-X., Cen T. Isolation and identification of ethanol-utilizing strains and application in low-alcohol cider // *Modern Food Science and Technology*. 2015. Vol. 31. P. 254–258. <https://doi.org/10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.040>

17. Бурьян Н.И. Практическая микробиология виноделия. Симферополь: Таврида, 2003. 560 с.

18. Sonnleitner B., Locher G., Fiechter A. Biomass determination // *Journal of Biotechnology*. 1992. Vol. 25. Issue 1-2. P. 5–22. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90107-K](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90107-K)

19. Maier R.M. Bacterial Growth. In: Maier R.M., Pepper I.L., Gerba C.P. *Environmental Microbiology*, second edition. Elsevier. 2009. P. 38–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00003-1>

20. Ginovart M., Prats C., Portell X., Silbert M. Analysis of the effect of inoculum characteristics on the first stages of a growing yeast population in beer fermentations by means of an individual-based model // *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2011. Vol. 38. P. 153–165. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0840-4>

21. Kusch H., Engelmann S., Bode R., Albrecht D., Morschhäuser J., Hecker M. A proteomic view of *Candida albicans* yeast cell metabolism in exponential and stationary growth phases // *International Journal of Medical Microbiology*. 2008. Vol. 298. Issue 3-4. P. 291–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.020>

REFERENCES

1. Jones SW, Karpol A, Friedman S, Maru BT, Tracy BP. Recent advances in single cell protein use as a feed ingredient in aquaculture. *Current Opinion in Biotechnology*. 2020;61:189–197. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.026>

2. Reihani SFS, Khosravi-Darani K. Influencing factors on single cell protein production by submerged fermentation: A review. *Electron J. Biotechnology*. 2019;37:34–40. <https://doi.org/10.1016/j.jbt.2018.11.005>

3. Paalme T, Kevvai K, Vilbaste A, Hälvin K, Nisamedtinov I. Uptake and accumulation of B-group vitamins in *Saccharomyces cerevisiae* in ethanol-stat fed-batch culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014;30:2351–2359. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1660-x>

4. Permyakova LV. Classification of preparations to promote yeast vital activity. *Tekhnika i tekhnologiya pishchevyh proizvodstv = Food Processing: Techniques and Technology*. 2016;3:46–55. (In Russian)

5. 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;9:1869–1883. <https://doi.org/10.1007/s11172-014-0679-3>

6. 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;13:149–155. <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0018>

7. Kunaszewska M. Complexogenic properties of ethanolamines III. Kinetics of some reactions of chromium(III) complexes with triethanolamine in aqueous solutions. *Scientific Bulletin of Lodz Technic University*. 1976;31(267). 65 p.

8. 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>

9. 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>

10. Molokova KV, Privalova EA, Adamovich SN, Mirskova AN, Mirskov RG. Proton ionic liquids effect on alcohol yeast fermentative activity. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2014;1:70–73. (In Russian)

11. Khaliullin FA, Alekhin EK, Klen EE, Ryabchinskaya LA, Kataev VA, Bogdanova ASh. Synthesis and immunotropic activity of (benzimidazole-2-thio)acetic acid derivatives containing thietane cycles. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2001;35(1):11–14. <https://doi.org/10.1002/chin.200137131>

12. 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;66(7):1320–1324. <https://doi.org/10.1007/s11172-017-1893-6>

13. Mirskova AN, Adamovich SN, Mirskov RG. Protatranes as effective biostimulators for agriculture, biotechnology, and microbiology. *Khimiya v interesakh ustoychivogo razvitiya = Chemistry for Sustainable Development*. 2016;24:713–729. (In Russian) <https://doi.org/10.15372/KhUR20160601>

14. Ugalde UO, Castrillo JI. Single cell proteins from fungi and yeasts. *Applied Mycology and Biotechnology*. 2002;2:123–149. [https://doi.org/10.1016/S1874-5334\(02\)80008-9](https://doi.org/10.1016/S1874-5334(02)80008-9)

15. Bravicheva RN, Satrutdinov AD, Blago-

datskaja VM, Gradova NB, Eroshin VK, Salikhova NA, et al. Strain of yeast *Candida ethanolica* – a producer of biomass. Patent RF, no. 2061751; 1992. (In Russian)

16. Song J-J, Yuan Y-H, Liu B, Wang H-X, Cen T. Isolation and identification of ethanol-utilizing strains and application in low-alcohol cider. *Modern Food Science and Technology*. 2015;31:254–258. <https://doi.org/10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.040>

17. Bur'yan NI. *Practical microbiology of wine-making*. Simferopol: Tavrida; 2003. 560 p. (In Russian)

18. Sonnleitner B, Locher G, Fiechter A. Biomass determination. *Journal of Biotechnology*. 1992;25(1-2):5–22. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90107-K](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90107-K)

19. Maier RM. Bacterial Growth. In: Maier RM,

Pepper IL, Gerba CP. *Environmental Microbiology*, 2nd ed. Elsevier; 2009. P. 38–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00003-1>

20. Ginovart M, Prats C, Portell X, Silbert M. Analysis of the effect of inoculum characteristics on the first stages of a growing yeast population in beer fermentations by means of an individual-based model. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2011;38:153–165. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0840-4>

21. Kusch H, Engelmann S, Bode R, Albrecht D, Morschhäuser J, Hecker M. A proteomic view of *Candida albicans* yeast cell metabolism in exponential and stationary growth phases. *International Journal of Medical Microbiology*. 2008;298(3-4):291–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.020>

Критерии авторства

Кирюхина А.С., Лозовая Т.С., Привалова Е.А., Федосеева В.Г., Оборина Е.Н., Адамович С.Н., Розенцвейг И.Б. выполнили экспериментальную работу. Авторы совместно обобщили результаты, написали рукопись, имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Кирюхина Александра Сергеевна, аспирант, Иркутский национальный исследовательский технический университет, 664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83, Российская Федерация, e-mail: alexandra.kirukhina@yandex.ru

Лозовая Татьяна Сергеевна, к.б.н., доцент, Иркутский национальный исследовательский технический университет, 664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83, Российская Федерация, ✉ e-mail: tnike75@mail.ru

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

Contribution

Aleksandra S. Kiryukhina, Tat'yana S. Lozovaya, Elena A. Privalova, Victoria G. Fedoseeva, Elizaveta N. Oborina, Sergei N. Adamovich, Igor B. Rozentsveig carried out the experimental work. The authors on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. All authors have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict interests

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

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

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Aleksandra S. Kiryukhina, Postgraduate Student, Irkutsk National Research Technical University, 83, Lermontov St., Irkutsk, 664074, Russian Federation, e-mail: alexandra.kirukhina@yandex.ru

Tat'yana S. Lozovaya, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor, Irkutsk National Research Technical University, 83, Lermontov St., Irkutsk, 664074, Russian Federation, ✉ e-mail: tnike75@mail.ru

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

Российская Федерация,
e-mail: epriv@istu.edu

Russian Federation,
e-mail: epriv@istu.edu

Федосеева Виктория Генриховна,
младший 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

Victoria G. Fedoseeva,
Junior Researcher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: mir@irioch.irk.ru

Оборина Елизавета Николаевна,
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: mir@irioch.irk.ru

Elizaveta N. Oborina,
Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: mir@irioch.irk.ru

Адамович Сергей Николаевич,
д.х.н., старший научный сотрудник,
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

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

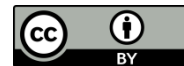
Розенцвейг Игорь Борисович,
д.х.н., доцент, заместитель директора
по научной работе,
Иркутский институт химии
им. А.Е. Фаворского СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация;
профессор кафедры теоретической
и прикладной органической химии
и полимеризационных процессов,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1,
Российская Федерация,
e-mail: mir@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: mir@irioch.irk.ru

Оригинальная статья / Original article

УДК 664.6, 631.811:633.111.1

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-496-505>



Формирование химического состава зерна яровой пшеницы при различном уровне минерального питания

© Д.В. Чикишев*, Н.В. Абрамов*, Н.С. Ларина**, С.В. Шерстобитов*

*Государственный аграрный университет Северного Зауралья,
г. Тюмень, Российская Федерация

**Тюменский государственный университет, г. Тюмень, Российская Федерация

Резюме: Зерно яровой пшеницы широко используется в качестве сырья для производства пищевых продуктов и кормов. Целью исследования являлось изучение отзывчивости яровой пшеницы на различные уровни минерального питания. В статье представлены результаты внесения минеральных удобрений под яровую пшеницу сорта Новосибирская 31 в Тюменской области. Определены: урожайность зерна яровой пшеницы, основные показатели качества зерна на пищевые цели (содержание белка, сырой клейковины, качество клейковины, стекловидность, натура), аминокислотный и элементный (N, P, K, S, Na, Mg, Ca, Cl) составы. Показано, что в зависимости от почвенных и погодных условий, а также от дозы внесения минеральные удобрения имеют неодинаковую эффективность. В 2018 г. применение минеральных удобрений позволило получить прибавку урожайности и улучшить качество зерна. Относительно варианта без внесения минеральных удобрений урожайность пшеницы повысилась на 1,6 т/га, содержание белка в зерне – на 3,67%, сырой клейковины – на 9,9%. С помощью удобрений удалось получить пшеницу 3-го класса, в то время как на контроле получена пшеница 4-го класса с меньшей урожайностью. Выявлено, что в годы с благоприятными погодными условиями на черноземе выщелоченном роль минеральных удобрений в формировании урожайности пшеницы и ее качества снижается. В 2019 г. на всех вариантах была получена пшеница 3-го класса с несущественно различающейся урожайностью. Доказано, что при повышении доз минеральных удобрений в зерне повышается содержание глутаминовой и аспарагиновой кислот, но снижается содержание аргинина. Элементный состав зерна, кроме азота, не зависит от дозы внесения удобрений.

Ключевые слова: яровая пшеница, минеральные удобрения, урожайность, химический состав зерна

Благодарность: Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-316-90001.

Информация о статье: Дата поступления 22 марта 2020 г.; дата принятия к печати 31 августа 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2020 г.

Для цитирования: Чикишев Д.В., Абрамов Н.В., Ларина Н.С., Шерстобитов С.В. Формирование химического состава зерна яровой пшеницы при различном уровне минерального питания. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 3. С. 496–505. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-496-505>

Chemical composition of spring wheat at different levels of mineral nutrition

Dmitry V. Chikishev*, Nikolay V. Abramov*, Natalya S. Larina**,
Sergey V. Sherstobitov*

*Northern Trans-Ural State Agricultural University, Tyumen, Russian Federation

**University of Tyumen, Russian Federation

Abstract: Spring wheat is widely used as a raw material for the production of human food and animal feed. This study was aimed at investigating the response of spring wheat to different levels of mineral nutrition. The article presents the results of applying mineral fertilisers when growing spring wheat of the Novosibirsk 31 variety in the Tyumen region. The following parameters were determined: wheat grain yield, grain nutri-

tional quality (protein content, raw gluten, gluten quality, grain hardness, grain-unit value), and amino acid and elemental (N, P, K, S, Na, Mg, Ca, Cl) composition. The efficiency of mineral fertilisers was shown to depend on their dosage, as well as on soil and weather conditions. In 2018, the use of mineral fertilisers led to an increased wheat yield and an improved grain quality. Thus, in comparison with the control (no fertilisers), the wheat yield increased by 1.6 t/ha, while the protein and wet gluten content grew by 3.67% and 9.9%, respectively. The application of fertilisers allowed 3rd class wheat to be obtained, while experiments involving no fertilisers produced only 4th class wheat. It was revealed that the role of mineral fertilisers in wheat yields and their quality decreases when growing wheat on leached chernozem under favourable weather conditions. Thus, in 2019, 3rd class wheat varying in yield insignificantly was obtained in all experiments (with and without fertilisers). It was confirmed that an increase in the dose of mineral fertilisers leads to an increase in the content of glutamic and aspartic acids in the grain, at the same time as decreasing the content of arginine. The elemental composition of grain, except for nitrogen, does not depend on the dose of fertilisers.

Keywords: spring wheat, mineral fertilisers, yield, grain chemical composition

Acknowledgements: The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Project No. 19-316-90001.

Information about the article: Received March 22, 2020; accepted for publication August 31, 2020; available online September 30, 2020.

For citation: Chikishev DV, Abramov NV, Larina NS, Sherstobitov SV. Chemical composition of spring wheat at different levels of mineral nutrition. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):496–505. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-496-505>

ВВЕДЕНИЕ

В зависимости от целей использования зерна яровой пшеницы к нему предъявляются различные требования. Для хлебопекарной муки важны такие показатели, как содержание белка и сырой клейковины, стекловидность, натура, число падения. Для зерна, используемого на кормовые цели, будет важно содержание в нем белка, различных элементов и аминокислот.

Продуктивность яровой пшеницы и химический состав зерна могут значительно варьироваться. Сорт пшеницы, применяемые удобрения и агротехника, а также уровень плодородия почвы, погодные условия – все это влияет на урожайность и качество зерна [1–4]. Для Российской Федерации ключевыми факторами, влияющими на урожайность яровой пшеницы, являются количество осадков и степень азотного питания [5].

Мировая практика использования минеральных удобрений показала, что эффективность их применения зависит от состава, сроков и способов их внесения, а также уровня плодородия почв [6–10].

Влияние минеральных удобрений на химический состав зерна пшеницы в первую очередь отражается на количестве азотсодержащих соединений в нем. Считается, что чем больше белка и сырой клейковины в зерне пшеницы, тем оно лучше. Однако увеличение количества вносимых минеральных удобрений не всегда способствует увеличению белка в зерне. Зависимость может быть как прямая, когда с увеличением доз удобрений повышается количество белка в зерне [11–14], так и обратная, когда с увеличением доз удобрений повышается уро-

жайность пшеницы, а массовая доля белка в зерне снижается, что связано с генетической особенностью некоторых сортов [15, 16]. В других опытах зависимость между дозами вносимых удобрений и содержанием белка в зерне не наблюдается [17].

Рассмотрение результатов ранее проведенных исследований свидетельствует о том, что минеральный состав зерна пшеницы незначительно меняется от доз минеральных удобрений и агротехнологических мероприятий и в большей степени зависит от сорта, места произрастания, погодных условий и применяемой органической системы земледелия [18–22]. При изучении влияния высоких доз вносимых минеральных удобрений (950 и 1450 кг/га в физической массе) выявилась тенденция к повышению содержания в зерне пшеницы Mn, Fe, B на 33–34%, Mg – на 20%, Zn – на 15%, P – на 11%. Содержание в зерне K и Si не изменилось. Но в этом случае также повысилось содержание кадмия от 0,08 до 0,15 мг/кг [23].

Анализируя взаимосвязь между содержанием белка и аминокислотным составом пшеницы, ученые приходят к заключению, что с увеличением массовой доли белка увеличивается содержание глутамина и пролина, а содержание аргинина часто снижается [24–27]. Глутаминовая кислота и глутамин являются первыми аминокислотами, которые синтезируются в пшенице. В дальнейшем глутамин используется как источник аминокислот при синтезе других аминокислот в растении [28]. Увеличение содержания пролина напрямую связано с особенностями белков пшеницы. Пролин входит в состав белков-прола-

минов, которые в свою очередь являются основным компонентом глютена [29]. Снижение содержания аргинина связано с его катаболизмом, мобилизующим запасенный азот и регулирующий синтез оксида азота (NO), полиаминов и потенциально пролина [30].

Таким образом, учитывая, что в процессе становления продуктивности агроценозов с хорошим качеством важным условием является уровень их обеспеченности элементами питания, поставлена цель исследования: проследить формирование урожайности яровой пшеницы и химического состава зерна в зависимости от уровня минерального питания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Полевой эксперимент. Яровая пшеница сорта Новосибирская 31 возделывалась в 2018 и 2019 гг. на производственных полях учхоза Государственного аграрного университета Северного Зауралья. Тип почвы – чернозем выщелоченный. Опытные участки характеризовались близкой к нейтральной реакцией среды: рН солевой вытяжки – 5,5 и 5,7 (в 2018 и 2019 гг. соответственно), значительной гидролитической кислотностью – 4,52 и 3,07 мм/100 г, и очень высокой обеспеченностью обменными основаниями – 41,1 и 39,4 мм/100 г. Содержание нитратного азота перед посевом составляло 4,7 и 10,2 мг/кг, подвижного фосфора (по Чирикову) – 167 и 129 мг/кг, подвижного калия (по Чирикову) – 99 и 100 мг/кг, гумуса – 7,5 и 4,9% (по годам соответственно).

В качестве минеральных удобрений применялись аммиачная селитра (N) и азотно-фосфорно-калийное удобрение (NPK – азофоска) с содержанием действующих веществ 34,4 и 15:15:15% соответственно. Оба удобрения вносили непосредственно перед посевом. Расчет доз удобрений проводился балансовым методом¹ на планируемую урожайность яровой пшеницы: 3, 4, и 5 т/га. В процессе расчета учитывалось: содержание элементов питания в почве перед посевом (нитратного азота, подвижных форм фосфора и калия), вынос элементов питания единицей продукции, коэффициенты использования элементов питания из почвы и из удобрений, количество действующего вещества в удобрении. Результаты расчетов показали, что на каждый вариант необходимо было внести в среднем: 220, 375, 520 кг/га минеральных удобрений. В качестве контрольного являлся вариант без внесения минеральных удобрений.

За период вегетации сумма активных температур (10 °C и выше) в 2018 и 2019 гг. составила 2029 и 2180 °C соответственно. Количество осадков, выпавших за период с температурой воздуха 10 °C и выше, составило 259 и 324 мм

по годам соответственно. Гидротермический коэффициент (ГТК) вегетационного периода 2018 г. составил 1,28, 2019 г. – 1,47. В ключевые фазы вегетации, когда шла закладка репродуктивных органов пшеницы (фазы кущения и колосения), ГТК составил: в 2018 г. – 1,06, в 2019 г. – 1,54.

Отбор и анализ образцов. Урожайность яровой пшеницы учитывалась прямым комбайнированием ($S = 10 \text{ м}^2$). В дальнейшем пробу зерна перемешивали, измеряли натуру (ГОСТ Р 54895) и размалывали в муку.

В подготовленной пробе зерна определяли следующие показатели: элементный (ГОСТ Р 56374, 56375) и аминокислотный составы (М-04-38-2009), содержание белка (ГОСТ 10846) и сырой клейковины (ГОСТ Р 54478), стекловидность (ГОСТ 10987). Элементный (по ионам) и аминокислотный (по ФТК-производным аминокислот) составы зерна определяли методом капиллярного электрофореза с применением системы капиллярного электрофореза Капель-105 (Люмэкс, Россия). При определении нитратов и хлоридов использовали водную вытяжку. Солянокислую вытяжку использовали для определения других ионов, а также 19 устойчивых к кислотному гидролизу аминокислот (кроме триптофана). При этом для определения содержания глутамина, аспарагина и цистина их предварительно переводили в глутаминовую, аспарагиновую и цистеиновую кислоты соответственно окислением навески пермуравьиной кислотой. Для извлечения триптофана использовали вытяжку насыщенным раствором гидроксида бария.

Все варианты изучались в трехкратной повторности. После проведения анализов каждой повторности каждого варианта определялось среднее значение показателей и рассчитывался доверительный интервал при уровне достоверности 95% ($P = 0,95$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Урожайность яровой пшеницы в 2018 и 2019 гг. составила 3,78–5,40 т/га. Для почвенно-климатических условий Западной Сибири это хорошая продуктивность зерновых. При этом фактическая урожайность превысила планируемую, поскольку расчетные методики являются весьма условными и не учитывают погодные условия, сорт, применяемые агротехнологии.

Отзывчивость яровой пшеницы на внесение минеральных удобрений имела отличия в зависимости от года исследования. В 2018 г. прослеживается высокая корреляционная зависимость формирования урожайности яровой пшеницы от количества внесенных удобрений ($r = 0,841$; $n = 12$; $P = 0,95$), что свидетельствует о зависимости урожайности от количества внесенного

¹Ермохин Ю.И. Основы прикладной агрохимии: учеб. пособие. Омск: Вариант-Сибирь, 2004. 120 с.

удобрения. Максимальная прибавка наблюдалась в варианте с внесением 375 кг/га минеральных удобрений, где урожайность составила 5,40 т/га, что более чем на 40% выше контрольного варианта (или 1,62 т/га). Аналогичные результаты получены рядом ученых в 2018 г.: был отмечен рост урожайности яровой пшеницы при увеличении нормы минеральных удобрений [31–34]. По представленным в этих работах данным, прибавка урожайности яровой пшеницы составила от 0,4 до 1,3 т/га или 21–47%. Кроме повышения урожайности внесение минеральных удобрений позволило повысить содержание белка в зерне яровой пшеницы. Благодаря этому зерно яровой пшеницы в вариантах с внесением минеральных удобрений можно классифицировать как зерно 3-го класса (ГОСТ 9353), а в вариантах с дозами внесения удобрений 375 и 520 кг/га по содержанию белка и сырой клейковины – даже 2-го класса. Но из-за того, что качество клейковины не соответствовало требованиям, это зерно нельзя отнести ко 2-му классу. В 2019 г., как и в предыдущем, был получен хороший урожай яровой пшеницы как на контрольном, так и на опытном участке с внесением различных доз минеральных удобрений. Однако минеральные удобрения не позволили получить прибавку урожая и не повлияли на качество зерна. Это свидетельствует о том, что в годы с благоприятными погодными условиями на черноземе выщелоченном использование минеральных удобрений оказывает слабое воздействие на продуктивность яровой пшеницы и качество продукции. Содержание белка в зерне по вариантам опыта находилось в пределах 12,77–13,35%, сырой клейковины – 24,5–28,6%. Качество пшеницы – 76,7–82,5 ед. ИДК, что соответствовало ка-

честву зерна 3-го класса (табл. 1).

Сорт пшеницы Новосибирская 31 показал хорошую зависимость между урожайностью и содержанием белка в зерне ($r = 0,803$; $n = 24$; $P = 0,95$). С повышением урожайности массовая доля белка в зерне тоже повышалась. Несомненно, это является достоинством сорта. Как было отмечено ранее, некоторые сорта пшеницы имеют обратную зависимость между урожайностью и содержанием белка в зерне. Следует отметить, что соотношение между содержанием сырой клейковины и белком в зерне в 2018 г. было выше, чем в 2019, что говорит о лучшем качестве полученного зерна. Изменения данного показателя в 2018 г. составили в зависимости от дозы внесенного удобрения 2,18–2,52, а в 2019 г. – 1,88–2,24.

На содержание аргинина, глутаминовой и аспарагиновой кислот в зерне яровой пшеницы оказывали влияние нормы вносимых минеральных удобрений и уровень естественного плодородия почв на опытном участке. Повышенное поступление неорганического азота в пшеницу в первую очередь влияет на повышение содержания глутаминна (амида глутаминовой кислоты). В 2019 г. ее содержание по вариантам было в целом выше чем в 2018 г. и не опускалось ниже 4,8%. Кроме того, в 2019 г. отмечено более высокое содержание аспарагиновой кислоты. Аспарагин во многих растениях является основным реципиентом глутаминового азота и обеспечивает мобильный резервуар для транспортировки к участкам роста. Это подтверждается и низким содержанием аргинина (менее 2,0%), который мобилизует запасенный азот. Содержание других аминокислот изменялось несущественно и составляло, %: пролина – 1,3–1,7;

Таблица 1. Урожайность и показатели качества зерна на пищевые цели
Table 1. Yield and grain quality for food purposes

Год	Вариант (количество вносимого минерального удобрения, кг/га)	Урожайность, т/га ($n = 3$)	Показатели качества зерна для пищевых целей ($n = 3$)				
			Белок, %	Сырая клейковина, %	Качество клейковины, ед. ИДК	Натура, кг/л	Стекловидность, %
2018	Контроль	3,78±1,17	11,95±0,77	26,0±2,5	86,7±9,5	805±6	79±12
	220	4,99±0,49	12,85±0,26	32,4±7,1	95,2±6,2	782±8	84±13
	375	5,40±0,35	14,81±1,68	32,3±11,5	85,8±21,8	789±23	85±4
	520	5,34±1,09	15,62±2,59	35,9±3,2	90,8±7,2	771±4	84±13
	НСР05*	0,37	0,78	2,3	2,7	8	3
2019	Контроль	4,97±0,65	13,05±1,20	26,5±8,8	76,7±21,8	766±46	86±9
	220	4,45±0,78	13,35±2,78	26,7±13,4	76,7±9,5	744±20	88±15
	375	4,43±0,27	12,77±1,33	28,6±14,5	82,5±18,6	756±59	82±17
	520 кг/га	4,65±0,31	12,99±2,03	24,5±10,3	79,2±37,9	739±33	85±24
	НСР05*	0,18	0,41	2,2	4,8	9	3
Требования для пшеницы 2-го класса			не менее 13,5	не менее 28,0	43–77	не менее 750	не менее 60
Требования для пшеницы 3-го класса			не менее 12,0	не менее 23,0	18–102	не менее 730	не менее 40
Требования для пшеницы 4-го класса			не менее 10,0	не менее 18,0	18–102	не менее 710	не ограничивается

Примечание к табл. 1–3. * – наименьшая существенная разность при 5%-м уровне значимости.

лейцина и изолейцина – 1,2-1,5; серина – 0,8–1,0; глицина – 0,6–0,9; фенилаланина – 0,6–0,8; треонина – 0,5–0,7; аланина – 0,5–0,7; тирозина – 0,4–0,7; лизина – 0,3–0,5; триптофана – 0,2–0,3; валина – не более 0,7; гистидина – не более 0,5; метионина – не более 0,4; цистина – менее 0,1 (табл. 2).

В опытах прослеживается, что минеральный состав зерна яровой пшеницы изменяется по годам исследования, но мало отличается по вариантам в течение года (табл. 3). Так, содержание Mg, Ca, и NO₃ незначительно отличалось по

годам, содержание Na, P, и Cl было больше в 2018 г., а K и S было больше в 2019. Исключение составляет ион аммония, содержание которого зависит от доз минеральных удобрений. С их увеличением также повышалась его концентрация в зерне: в 2018 г. она увеличилась с 0,51% на контрольном варианте до 0,60% при норме минеральных удобрений 220 кг/га, и до 0,76% при норме 520 кг/га. А в 2019 г. – с 0,56% на контрольном варианте до 0,65% при норме 375 кг/га. Это связано с увеличением поступления доступного азота, который был внесен с удобрениями.

Таблица 2. Аминокислотный состав зерна
Table 2. Amino acid composition of grain

Год	Вариант (количество внесенного минерального удобрения, кг/га)	Содержание аминокислот в зерне, % (n = 3)		
		Глутаминовая кислота + глутамин	Аспарагиновая кислота + аспарагин	Аргинин
2018	Контроль	3,6±1,8	< 0,5	5,1±1,6
	220	4,5±1,4	< 0,5	4,2±5,0
	375	5,4±2,1	0,7±0,7	1,5±2,1
	520	5,3±2,5	0,7±0,7	1,0±0,7
	НСР05*	0,6	0,1	1,1
2019	Контроль	5,0±0,7	0,8±0,1	1,9±0,9
	220	4,8±3,5	1,0±0,4	1,6±0,8
	375	5,6±0,3	1,2±0,1	1,2±0,4
	520	5,3±2,1	0,9±0,5	1,3±0,4
	НСР05*	0,5	0,1	0,2

Таблица 3. Минеральный состав зерна
Table 3. Mineral composition of grain

Содержание иона аммония в зерне NH ₄ , % (n = 3)					
Год	Вариант (количество внесенного минерального удобрения, кг/га)				НСР05*
	Контроль	220	375	520	
2018	0,51±0,11	0,60±0,09	0,63±0,23	0,76±0,33	0,06
2019	0,56±0,12	0,57±0,04	0,65±0,22	0,61±0,04	0,04
Содержание элементов и нитрат-иона в зерне, % (n = 12)					
Год	K	Na	Mg	Ca	
2018	0,49±0,03	0,14±0,02	0,20±0,01	0,25±0,02	
2019	0,56±0,03	0,08±0,02	0,20±0,01	0,25±0,04	
	Cl	S	NO ₃	P	
2018	0,110±0,006	0,033±0,007	0,076±0,006	0,367±0,022	
2019	0,065±0,004	0,075±0,024	0,077±0,004	0,336±0,016	

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований установлено, что в климатических условиях Западной Сибири возможно получить урожай яровой пшеницы до 5,4 т/га зерна 3-го класса, которое может использоваться на пищевые и кормовые цели.

Эффективность применения минеральных

удобрений под яровую пшеницу зависит от почвенных и погодных условий. При оптимальных условиях она может отсутствовать. В менее благоприятных условиях применение минеральных удобрений позволяет увеличить сбор зерна на 1,6 т/га, содержание белка в нем – на 3,67%, сырой клейковины – на 9,9%.

Увеличение нормы минеральных удобрений

приводит к росту содержания глутаминовой и аспарагиновой кислот до 5,6 и 1,2% соответственно. Содержание аргинина снижается до 1,0%. Элементный состав зерна яровой пшеницы (К, Na, Mg, Ca, Cl, S, P) не зависит от нормы минеральных удобрений, но меняется в зависимости от погодных условий. Увеличение норм минеральных удобрений повышает концентра-

цию иона аммония в зерне яровой пшеницы до 0,76%.

Установлена тесная взаимосвязь между технологическими свойствами зерна яровой пшеницы и уровнем обеспеченности растения элементами питания, что является основой для развития научно обоснованного применения минеральных удобрений.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Wang X., Cai D., Grant C., Hoogmoed W.B., Oenema O. Factors controlling regional grain yield in China over the last 20 years // *Agronomy for Sustainable Development*. 2015. Vol. 35. P. 1127–1138. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0288-z>
2. Mukherjee A., Wang S.-Y.S., Promchote P. Examination of the climate factors that reduced wheat yield in Northwest India during the 2000s // *Water*. 2019. Vol. 11. Issue 2. P. 343–355. <https://doi.org/10.3390/w11020343>
3. Xue C., Matros A., Mock H.P., Mühling K.H. Protein composition and baking quality of wheat flour as affected by split nitrogen application // *Frontiers in Plant Science*. 2019. Vol. 10. 11 p. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00642>
4. Zörb C., Ludewig U., Hawkesford M.J. Perspective on wheat yield and quality with reduced nitrogen supply // *Trends in plant science*. 2018. Vol. 23. Issue 11. P. 1029–1037. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.08.012>
5. Schierhorn F., Müller D., Prishchepov A., Faramarzi M., Balmann A. The potential of Russia to increase its wheat production through cropland expansion and intensification // *Global Food Security*. 2014. Vol. 3. Issues 3-4. P. 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2014.10.007>
6. Corrêa J.C., Grohskopf M.A., Nicoloso R. da S., Lourenço K., Martini R. Organic, organomineral, and mineral fertilizers with urease and nitrification inhibitors for wheat and corn under no-tillage // *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2016. Vol. 51. Issue 8. P. 916–924. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000800003>
7. Efreteui A., Gooding M., White E., Spink J., Hackett R. Effect of nitrogen fertilizer application timing on nitrogen use efficiency and grain yield of winter wheat in Ireland // *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. 2016. Vol. 55. Issue 1. P. 63–73. <https://doi.org/10.1515/ijafr-2016-0006>
8. Rezig F.A., Elhadi E.A., Mubarak A.R. Impact of organic residues and mineral fertilizer application on soil–crop systems I: yield and nutrients content // *Archives of Agronomy and Soil Science*. 2013. Vol. 59. Issue 9. P. 1229–1243. <https://doi.org/10.1080/03650340.2012.709622>
9. Mulvaney R.L., Khan S.A., Ellsworth T.R. Synthetic nitrogen fertilizers deplete soil nitrogen: a global dilemma for sustainable cereal production // *Journal of Environmental Quality*. 2009. Vol. 38. Issue 6. P. 2295–2314. <https://doi.org/10.2134/jeq2008.0527>
10. Beyenesh Z., Nigussie D. Effect of mineral fertilizer, farmyard manure, and compost on yield of bread wheat and selected soil chemical properties in Enderta District, Tigray Regional State, Northern Ethiopia // *East African Journal of Sciences*. 2018. Vol. 12. Issue 1. P. 29–40.
11. Ma G., Liu W., Li S., Zhang P., Wang C., Lu H., et al. Determining the optimal N input to improve grain yield and quality in winter wheat with reduced apparent N loss in the North China Plain // *Frontiers in Plant Science*. 2019. Vol. 10. P. 181. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00181>
12. Ullah G., Khan E.A., Awan I.U., Khan M.A., Khakwani A.A., Baloch M.S., et al. Wheat response to application methods and levels of nitrogen fertilizer: I. phenology, growth indices and protein content // *Pakistan Journal of Nutrition*. 2013. Vol. 12. Issue 4. P. 365–370. <https://doi.org/10.3923/pjn.2013.365.370>
13. Yu Z., Juhasz A., Islam S., Diepeveen D., Zhang J., Wang P., et al. Impact of mid-season sulphur deficiency on wheat nitrogen metabolism and biosynthesis of grain protein // *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8. Issue 1. P. 2499. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20935-8>
14. Zhang P., Ma G., Wang C., Lu H., Li S., Xie Y., et al. Effect of irrigation and nitrogen application on grain amino acid composition and protein quality in winter wheat // *Public Library of Science one*. 2017. Vol. 12. Issue 6. P. e0178494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178494>
15. Hawkesford M.J. Reducing the reliance on nitrogen fertilizer for wheat production // *Journal of Cereal Science*. 2014. Vol. 59. Issue 3. P. 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.12.001>
16. Bogard M., Allard V., Brancourt-Hulmel M., Heumez E., Machet J.-M., Jeuffroy J.-H., et al. Deviation from the grain protein concentration–grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat // *Journal of Experimental Botany*. 2010. Vol. 61. Issue 15. P. 4303–4312. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq238>
17. Hřivna L., Kotková B., Buresova I. Effect of sulphur fertilization on yield and quality of wheat grain // *Cereal Research Communications*. 2015. Vol. 1. P. 1–9. <https://doi.org/10.1556/CRC.2014.0033>
18. Abewa A., Adgo E., Yitaferu B., Alemayehu G., Assefa K., Solomon J.K.Q., et al. Teff grain physical and chemical quality responses to soil

physicochemical properties and the environment // *Agronomy*. 2019. Vol. 9. Issue 6. P. 283. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060283>

19. Hussain A., Larsson H., Kuktaite R., Johansson E. Mineral composition of organically grown wheat genotypes: contribution to daily minerals intake // *Environmental Research and Public Health*. 2010. Vol. 7. Issue 9. P. 3442–3456. <https://doi.org/10.3390/ijerph7093442>

20. Svecnjak Z., Jenel M., Bujan M., Vitali D., Dragojević I.V. Trace element concentrations in the grain of wheat cultivars as affected by nitrogen fertilization // *Agricultural and Food Science*. 2013. Vol. 22. Issue 4. P. 445–451. <https://doi.org/10.23986/afsci.8230>

21. Gaj R., Gorski D. Effects of different phosphorus and potassium fertilization on contents and uptake of macronutrients (N, P, K, Ca, Mg) in winter wheat I. Content of macronutrients // *Journal of Central European Agriculture*. 2014. Vol. 15. Issue 4. P. 169–187. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/15.4.1526>

22. Suchowilska E., Wiwart M., Kandler W., Krska R. A comparison of macro- and microelement concentrations in the whole grain of four *Triticum* species // *Plant, Soil and Environment*. 2012. Vol. 58. P. 141–147. <https://doi.org/10.17221/688/2011-PSE>

23. Kovačević V., Kadar I., Rastija M., Sudar R. Impacts of NPK fertilization on chemical composition of wheat grain. In: *Proceedings of the 48th Croatian and 8th International Symposium on Agriculture*. 2013. P. 510–514.

24. Shoup F.K., Pomeranz Y., Deyoe C.W. Amino acid composition of wheat varieties and flours varying widely in bread-making potentialities // *Journal of Food Science*. 1966. Vol. 31. Issue 1. P. 94–101. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1966.tb15420.x>

25. Mosse J., Huet J.C., Baudet J. The amino acid composition of wheat grain as a function of nitrogen content // *Journal of Cereal Science*. 1985. Vol. 3. Issue 2. P. 115–130. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(85\)80022-9](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(85)80022-9)

26. Baudet J., Huet J.-C., Mossé J. The amino acid composition of wheat grain as related to its pro-

tein content // *Amino Acid Composition and Biological Value of Cereal Proteins*. 1985. P. 439–450.

27. Чикишев Д.В., Абрамов Н.В., Ларина Н.С., Шерстобитов С.В. Влияние азотных удобрений на аминокислотный состав зерна яровой пшеницы // *Вестник Башкирского государственного аграрного университета*. 2019. N 3 (51). С. 20–25. <https://doi.org/10.31563/1684-7628-2019-51-3-20-26>

28. Joy W.K. Ammonia, glutamine and asparagine: A carbon-nitrogen interface // *Canadian Journal of Botany*. 1988. Vol. 66. Issue 10. P. 2103–2109. <https://doi.org/10.1139/b88-288>

29. Shewry P.R., Tatham A. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution // *The Biochemical Journal*. 1990. Vol. 267. P. 1–12. <https://doi.org/10.1042/bj2670001>

30. Winter G., Todd C.D., Trovato M., Forlani G., Funck D. Physiological implications of arginine metabolism in plants // *Frontiers in Plant Science*. 2015. Vol. 6. P. 00534. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00534>

31. Семизоров С.А., Гунгер М.В. Влияние различных норм припосевного внесения аммиачной селитры на урожайность яровой пшеницы // *Вестник Мичуринского государственного аграрного университета*. 2018. N 4. С. 85–88.

32. Богомазов С.В., Левин А.А., Ткачук О.А., Лянденбургская А.В. Урожайность и качество зерна яровой мягкой пшеницы в зависимости от применения гуминового и минеральных удобрений // *Нива Поволжья*. 2019. N 3 (52). С. 68–73.

33. Синявский И.В., Еликбаева С.А. Влияние сочетаний органических и минеральных удобрений на урожайность и качество зерна яровой пшеницы в звене зернопарового севооборота // *Вестник Курганской ГСХА*. 2019. N 2 (30). С. 34–37.

34. Sherstobitov S. The results of the differential mineral fertilization in the automatic mode according to the task map // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2019. Vol. 537. Issue 6. P. 062011. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/537/6/062011>

REFERENCES

1. Wang X, Cai D, Grant C, Hoogmoed WB, Oenema O. Factors controlling regional grain yield in China over the last 20 years. *Agronomy for Sustainable Development*. 2015;35:1127–1138. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0288-z>

2. Mukherjee A, Wang S-YS, Promchote P. Examination of the climate factors that reduced wheat yield in Northwest India during the 2000s. *Water*. 2019;11(2):343–355. <https://doi.org/10.3390/w11020343>

3. Xue C, Matros A, Mock HP, Mühling KH. Protein composition and baking quality of wheat flour as affected by split nitrogen application. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10. 11 p. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00642>

4. Zörb C, Ludewig U, Hawkesford MJ. Perspec-

tive on wheat yield and quality with reduced nitrogen supply. *Trends in plant science*. 2018;23(11):1029–1037. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.08.012>

5. Schierhorn F, Müller D, Prishchepov A, Faramarzi M, Balmann A. The potential of Russia to increase its wheat production through cropland expansion and intensification. *Global Food Security*. 2014;3(3-4):133–141. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2014.10.007>

6. Corrêa JC, Grohskopf MA, Nicoloso R da S, Lourenço K, Martini R. Organic, organomineral, and mineral fertilizers with urease and nitrification inhibitors for wheat and corn under no-tillage. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2016;51(8):916–924. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000800003>

7. Efreteui A, Gooding M, White E, Spink J, Hackett R. Effect of nitrogen fertilizer application timing on nitrogen use efficiency and grain yield of winter wheat in Ireland. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. 2016;55(1):63–73. <https://doi.org/10.1515/ijaf-2016-0006>
8. Rezig FA, Elhadi EA, Mubarak AR. Impact of organic residues and mineral fertilizer application on soil–crop systems I: yield and nutrients content. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 2013;59(9):1229–1243. <https://doi.org/10.1080/03650340.2012.709622>
9. Mulvaney RL, Khan SA, Ellsworth TR. Synthetic nitrogen fertilizers deplete soil nitrogen: a global dilemma for sustainable cereal production. *Journal of Environmental Quality*. 2009;38(6):2295–2314. <https://doi.org/10.2134/jeq2008.0527>
10. Beyenesh Z, Nigussie D. Effect of mineral fertilizer, farmyard manure, and compost on yield of bread wheat and selected soil chemical properties in Enderta District, Tigray Regional State, Northern Ethiopia. *East African Journal of Sciences*. 2018;12(1):29–40.
11. Ma G, Liu W, Li S, Zhang P, Wang C, Lu H, et al. Determining the optimal N input to improve grain yield and quality in winter wheat with reduced apparent N loss in the North China Plain. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10:181. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00181>
12. Ullah G, Khan E.A, Awan IU, Khan MA, Khakwani AA, Baloch MS, et al. Wheat response to application methods and levels of nitrogen fertilizer: I. phenology, growth indices and protein content. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2013;12(4):365–370. <https://doi.org/10.3923/pjn.2013.365.370>
13. Yu Z, Juhasz A, Islam S, Diepeveen D, Zhang J, Wang P, et al. Impact of mid-season sulphur deficiency on wheat nitrogen metabolism and biosynthesis of grain protein. *Scientific Reports*. 2018;8(1):2499. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20935-8>
14. Zhang P, Ma G, Wang C, Lu H, Li S, Xie Y, et al. Effect of irrigation and nitrogen application on grain amino acid composition and protein quality in winter wheat. *Public Library of Science one*. 2017;12(6);e0178494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178494>
15. Hawkesford MJ. Reducing the reliance on nitrogen fertilizer for wheat production. *Journal of Cereal Science*. 2014;59(3):276–283. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.12.001>
16. Bogard M, Allard V, Brancourt-Hulmel M, Heumez E, Mchet J-M, Jeuffroy J-H, et al. Deviation from the grain protein concentration–grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat. *Journal of Experimental Botany*. 2010;61(15):4303–4312. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq238>
17. Hřivna L, Kotková B, Buresova I. Effect of sulphur fertilization on yield and quality of wheat grain. *Cereal Research Communications*. 2015;1:1–
9. <https://doi.org/10.1556/CRC.2014.0033>
18. Abewa A, Adgo E, Yitaferu B, Alemayehu G, Assefa K, Solomon JKQ, et al. Teff grain physical and chemical quality responses to soil physico-chemical properties and the environment. *Agronomy*. 2019;9(6):283. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060283>
19. Hussain A, Larsson H, Kuktaite R, Johansson E. Mineral composition of organically grown wheat genotypes: contribution to daily minerals intake. *Environmental Research and Public Health*. 2010;7(9):3442–3456. <https://doi.org/10.3390/ijerph7093442>
20. Svecnjak Z, Jenel M, Bujan M, Vitali D, Dragojević IV. Trace element concentrations in the grain of wheat cultivars as affected by nitrogen fertilization. *Agricultural and Food Science*. 2013;22(4):445–451. <https://doi.org/10.23986/afsci.8230>
21. Gaj R, Gorski D. Effects of different phosphorus and potassium fertilization on contents and uptake of macronutrients (N, P, K, Ca, Mg) in winter wheat I. Content of macronutrients. *Journal of Central European Agriculture*. 2014;15(4):169–187. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/15.4.1526>
22. Suchowilska E, Wiwart M, Kandler W, Krska R. A comparison of macro- and microelement concentrations in the whole grain of four *Triticum* species. *Plant, Soil and Environment*. 2012;58:141–147. <https://doi.org/10.17221/688/2011-PSE>
23. Kovačević V, Kadar I, Rastija M, Sudar R. Impacts of NPK fertilization on chemical composition of wheat grain. In: *Proceedings of the 48th Croatian and 8th International Symposium on Agriculture*. 2013:510–514.
24. Shoup FK, Pomeranz Y, Deyoe CW. Amino acid composition of wheat varieties and flours varying widely in bread-making potentialities // *Journal of Food Science*. 1966;31(1):94–101. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1966.tb15420.x>
25. Mosse J, Huet JC, Baudet J. The amino acid composition of wheat grain as a function of nitrogen content. *Journal of Cereal Science*. 1985;3(2):115–130. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(85\)80022-9](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(85)80022-9)
26. Baudet J, Huet J-C, Mossé J. The amino acid composition of wheat grain as related to its protein content. *Amino Acid Composition and Biological Value of Cereal Proteins*. 1985;439–450.
27. Chikishev D, Abramov N, Larina N, Sherstobitov S. Effect of nitrogen fertilizers on amino acid composition of spring wheat grain. *Vestnik Bashkirskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Vestnik Bashkir State Agrarian University*. 2019;3:20–25. (In Russian) <https://doi.org/10.31563/1684-7628-2019-51-3-20-26>
28. Joy WK. Ammonia, glutamine and asparagine: A carbon-nitrogen interface. *Canadian Journal of Botany*. 1988;66(10):2103–2109. <https://doi.org/10.1139/b88-288>
29. Shewry PR, Tatham A. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolu-

tion. *The Biochemical Journal*. 1990;267:1–12.
<https://doi.org/10.1042/bj2670001>

30. Winter G, Todd CD, Trovato M, Forlani G, Funck D. Physiological implications of arginine metabolism in plant. *Frontiers in Plant Science*. 2015;6:00534. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00534>

31. Semizorov S, Gunger M. Influence of various rates of ammonium salt pter starter application on the spring wheat yield. *Vestnik Michurinskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Bulletin of Michurinsk State Agrarian University*. 2018;4:85–88. (In Russian)

32. Bogomazov SV, Levin AA, Tkachuk OA, Lyanderburgskaya AV. Yield and quality of grain of

spring soft wheat depending on the application of humic and mineral fertilizers. *Niva Povolzhya = Volga Region Farmland*. 2019;3:68–73. (In Russian)

33. Sinyavskiy IV, Elikbaeva SA. Influence of combinations of organic and mineral fertilizers on yield and quality of spring wheat grain in the room of grain sparing. *Vestnik Kurganskoi GSHA = Bulletin of the Kurgan State Agricultural Academy*. 2019;2:34–37. (In Russian)

34. Sherstobitov S. The results of the differential mineral fertilization in the automatic mode according to the task map. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2019;537(6):062011. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/537/6/062011>

Критерии авторства

Чикишев Д.В., Абрамов Н.В., Ларина Н.С., Шерстобитов С.В. выполнили экспериментальную работу. Авторы совместно обобщили результаты, написали рукопись, имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Чикишев Дмитрий Владимирович, аспирант кафедры почвоведения и агрохимии, Государственный аграрный университет Северного Зауралья, 625003, г. Тюмень, ул. Республики, 7, Российская Федерация, ✉ e-mail: 79088690714@yandex.ru

Абрамов Николай Васильевич, д.с.-х.н., профессор, заведующий кафедрой почвоведения и агрохимии, Государственный аграрный университет Северного Зауралья, 625003, г. Тюмень, ул. Республики, 7, Российская Федерация, e-mail: vip.anv.55@mail.ru

Ларина Наталья Сергеевна, к.х.н., профессор кафедры органической и экологической химии, Тюменский государственный университет, 625003, г. Тюмень, ул. Володарского, 6, Российская Федерация, e-mail: nslarina@yandex.ru

Contribution

Dmitry V. Chikishev, Nikolay V. Abramov, Natalya S. Larina, Sergey V. Sherstobitov carried out the experimental work. The authors on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. All authors have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict interests

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

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

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Dmitry V. Chikishev, Postgraduate Student, Department of Soil Science and Agrochemistry, Northern Trans-Ural State Agricultural University, 7, Republica St., Tyumen, 625003, Russian Federation, ✉ e-mail: 79088690714@yandex.ru

Nikolay V. Abramov, Dr. Sci. (Agriculture), Professor, Head of the Department of Soil Science and Agrochemistry, Northern Trans-Ural State Agricultural University, 7, Respubliki St., Tyumen, 625003, Russian Federation, e-mail: vip.anv.55@mail.ru

Natalya S. Larina, Cand. Sci. (Chemistry), Professor, Department of Organic and Environmental Chemistry, University of Tyumen, 6, Volodarski St., Tyumen, 625003, Russian Federation, e-mail: nslarina@yandex.ru

Шерстобитов Сергей Владимирович,
к.х.н., доцент кафедры почвоведения
и агрохимии,
Государственный аграрный университет
Северного Зауралья,
625003, г. Тюмень, ул. Республики, 7,
Российская Федерация,
e-mail: sv5888857@yandex.ru

Sergey V. Sherstobitov,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Department of Soil Science and Agrochemistry,
Northern Trans-Ural State Agricultural University,
7, Respubliki St., Tyumen, 625003,
Russian Federation,
e-mail: sv5888857@yandex.ru

Оригинальная статья / Original article

УДК 579.66

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-506-514>



Разработка расчетной зависимости для оценки величины потери массы при лиофилизации диагностических препаратов

© А.В. Комиссаров^{*,**}, Д.Н. Бибиков^{*}, С.А. Бадарин^{*}, Н.В. Сеницына^{*},
Н.И. Костылева^{*}, М.В. Овчинникова^{*}, Г.И. Коровкина^{*}, О.С. Зинина^{*},
И.А. Плотников^{*}, А.К. Никифоров^{*,**}

*Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»,
г. Саратов, Российская Федерация

**Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова,
г. Саратов, Российская Федерация

Резюме: Цель исследования – разработка расчетных зависимостей для оценки величины потери массы при лиофилизации диагностических препаратов в зависимости от температурно-временных режимов досушивания. В качестве модельного раствора при лиофилизации использовали бульон Хоттингера со стабилизаторами: желатин (1,5%) и пептон (10%). Для достижения цели был спланирован и реализован полный факторный эксперимент 2^3 , в котором исследуемыми факторами являлись температура и время досушивания, а также количество препарата в первичной упаковке. В результате проведения полного факторного эксперимента при использовании ампул в качестве первичной упаковки было получено уравнение регрессии. Проведенная статистическая обработка полученного уравнения показала адекватность математической модели. При ее интерпретации было установлено, что с увеличением температуры и времени досушивания величина потери массы при высушивании уменьшается, а при повышении количества препарата во вторичной упаковке – увеличивается. В результате проведения экспериментов выявлено соответствие опытных и расчетных значений потери массы при высушивании. Изучено влияние высоты высушиваемого материала на потерю массы при высушивании для лиофилизации эквивалентного количества вещества во флаконах. Обоснованная ранее математическая модель для сушки в ампулах модернизирована для описания процесса лиофилизации во флаконах. Результаты подтверждающих экспериментов показали возможность вычисления потери массы при высушивании для полученной модели. Разработанные расчетные зависимости позволяют оценивать текущее значение величины потери массы при лиофилизации препаратов, что приобретает особую значимость для уменьшения затрат при обосновании температурно-временных параметров досушивания новых биопрепаратов, нормативных производственных режимов при изменении количества продукта, вида первичной упаковки, условий десорбции.

Ключевые слова: лиофилизация, потеря массы при высушивании, полный факторный эксперимент, ампулы, флаконы, расчетная зависимость

Информация о статье: Дата поступления 22 октября 2019 г.; дата принятия к печати 31 августа 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2020 г.

Для цитирования: Комиссаров А.В., Бибиков Д.Н., Бадарин С.А., Сеницына Н.В., Костылева Н.И., Овчинникова М.В., Коровкина Г.И., Зинина О.С., Плотников И.А., Никифоров А.К. Разработка расчетной зависимости для оценки величины потери массы при лиофилизации диагностических препаратов. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 3. С. 506–514. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-506-514>

Calculation of dependences for estimating the amount of weight loss during lyophilization of diagnostic preparations

Alexander V. Komissarov^{*,**}, Dmitry N. Bibikov^{*}, Sergey A. Badarin^{*},
Nataliya V. Sinitsyna^{*}, Nataliya I. Kostyleva^{*}, Marya V. Ovchinnikova^{*},
Galina I. Korovkina^{*}, Olga S. Zinina^{*}, Igor A. Plotnikov^{*}, Aleksey K. Nikiforov^{*,**}

*Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russian Federation

**N.I. Vavilov Saratov State Agrarian University, Saratov, Russian Federation

Abstract: *In this study, we aimed to calculate dependencies for assessing the value of weight loss during lyophilization of diagnostic preparations depending on the drying temperature and time. A model solution for lyophilization was Hottinger broth with gelatin (1.5%) and peptone (10%) used as stabilizers. To achieve the aim, a full factorial experiment 2^3 was planned and implemented, the investigated factors in which were the temperature and time of final drying, as well as the amount of substance in the primary packaging. Using ampoules as containers for primary packaging, a regression equation was obtained. The conducted statistical processing of the obtained equation showed the feasibility of the developed mathematical model. According to the model, an increase in the drying temperature and time leads to a decrease in the amount of weight loss; however, weight loss increases under an increase in the amount of substance in the secondary packaging. As a result of the experiments, a correspondence between the experimental and calculated values of weight loss during drying was revealed. The effect of the height of the material under drying on the weight loss was studied when drying an equivalent amount of substance in vials. The developed mathematical model for drying in ampoules was modified to describe the process of lyophilization in vials. The experimental results confirmed the possibility of calculating weight loss during drying using the proposed model. The developed dependencies can be used for estimating the value of weight loss during lyophilization of various substances, which is of particular importance in terms of reducing costs when establishing the temperature and time parameters of drying new biological products and modifying production regimes when changing the amount of product, type of primary packaging or desorption conditions.*

Keywords: *lyophilization, weight loss on drying, full factorial experiment, ampoules, vials, calculated dependence*

Information about the article: *Received October 22, 2019; accepted for publication August 31, 2020; available online September 30, 2020.*

For citation: Komissarov AV, Bibikov DN, Badarin SA, Sinitsyna NV, Kostyleva NI, Ovchinnikova MV, Korovkina GI, Zinina OS, Plotnikov IA, Nikiforov AK. Calculation of dependences for estimating the amount of weight loss during lyophilization of diagnostic preparations. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2020;10(3):506–514. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-506-514>

ВВЕДЕНИЕ

Процесс лиофилизации дифференцируется по трем фазам: заморозка, сублимация и десорбция. Заморозка определяет структуру вещества, от которой зависит протекание последующих стадий процесса и, как правило, характеристики готового продукта [1–5]. При сублимации удаляется основной объем замороженной несвязанной влаги (до 90%), после чего она завершается [6, 7]. С целью десорбции связанной жидкости используют повышение температуры вещества до установления необходимой величины потери в массе при высушивании (ПМВ) [8, 9].

Скорость десорбции обуславливается интенсивностью диффузии влаги. Установлено, что значение ПМВ определяется температурой процесса десорбции и площадью вещества и не зависит от значения вакуума в лиофилизаторе и высоты высушиваемого продукта [10, 11]. Уровень ПМВ сухого продукта определяется прежде всего температурно-временными параметрами досушивания: чем больше температура продукта и время досушивания, тем меньше значение ПМВ.

При конструировании лиофилизаторов биопрепаратов, а также при высушивании существующих продуктов следует иметь представление о достигаемом в процессе десорбции значении

ПМВ вещества при варьировании температурно-временных характеристик процесса.

Известно, что целевые свойства лиофилизаторов биопрепаратов лучше сохраняются при определенном значении ПМВ, при этом конкретное значение данного параметра является индивидуальным для каждого продукта [12–15]. Таким образом, задача обоснования температурно-временных режимов десорбции приобретает большое значение.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве модельного раствора использовали бульон Хоттингера со стабилизаторами: желатин (ГОСТ 11293-89) и пептон (ГОСТ 13805-76), расчетная концентрация 1,5 и 10% соответственно. Соединение бульона Хоттингера со средой высушивания осуществляли в соотношении 1:1. Бульон Хоттингера применяется при выращивании фагов, а вышеназванные стабилизаторы – при лиофилизации препаратов в производстве чумного Л-413С, Покровского (П) и псевдотуберкулезного диагностических бактериофагов.

Лиофилизация образцов осуществлялась на сублимационной сушильной установке Martin Christ Epsilon 2-6 (Германия). Образцы разливали в ампулы типа ШП-6 объемом 6 см³ или флаконы ФО-10 вместимостью 10 мл, замораживали

до -50°C на полках продуктового отсека машины, сублимировали в зоне эвтектики в соответствии с методическими приемами, обоснованными ранее [16], и досушивали при различных температурно-временных режимах. Потерю массы при высушивании устанавливали с применением анализатора влажности Sartorius MA 150 (Германия). Объем серий составлял 400 ампул. Эксперименты проводились в трех повторностях.

Для нахождения базовой модели и расчетной зависимости ПМВ от технологических параметров лиофилизации использован математический метод планирования экспериментов, в частности, полный факторный эксперимент (ПФЭ) 2^n . Базовая модель содержала линейные члены и их взаимодействия различного порядка:

$$Y(b, X) = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{\substack{i=1 \\ k=i+1}}^n b_{ik} X_i X_k + \sum_{\substack{i=1 \\ k=i+1 \\ l=k+1}}^n b_{ikl} X_i X_k X_l + \dots, \quad (1)$$

где $Y(b, X)$ – целевая функция; $X_{i,k,l}$ – фактор независимой переменной в кодированном виде; N – число исследуемых факторов; b_i – коэффициенты при линейных факторах; b_{ij} – коэффициенты при парных взаимодействиях факторов; b_{ijk} – коэффициенты при взаимодействии трех факторов.

Планирование, реализацию и обработку данных полного факторного эксперимента осуществляли по следующему алгоритму:

- кодировка исследуемых факторов;
- построение матрицы планирования эксперимента в кодированных переменных;
- вычисление коэффициентов уравнения регрессии;
- проверка найденных коэффициентов на значимость;
- проверка адекватности полученного уравнения регрессии;
- интерпретация полученной модели;
- преобразование уравнения регрессии от кодированных к натуральным переменным.

Кодировка исследуемых факторов осуществлялась по формуле:

$$X_i = \frac{Z_i - Z_i^0}{\lambda_i}, \quad (2)$$

где Z – фактор независимой переменной в натуральном виде; Z_i^0 – основной (нулевой) уровень факторов; λ_i – интервал варьирования факторов.

Z_i^0 и λ_i находили по следующим соотношениям:

$$Z_i^0 = \frac{Z_i^+ + Z_i^-}{2}. \quad (3)$$

$$\lambda_i = \frac{Z_i^+ - Z_i^-}{2}. \quad (4)$$

Коэффициенты уравнения регрессии находили с помощью метода наименьших квадратов, применяя следующие выражения:

$$b_0 = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \bar{Y}_j, \\ b_i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \bar{Y}_j X_{i,j}, \quad i = \overline{1, k}, \quad (5) \\ b_{r,p} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \bar{Y}_j X_{j,r} X_{j,p}, \quad r < p, \quad r = \overline{1, k}, \quad p = \overline{1, k}.$$

Проверка найденных коэффициентов на значимость осуществлялась по критерию Стьюдента: при $|b| > t_{кр} S_{\text{коэф}}$ b считали значимым. В противном случае коэффициент признавали незначимым и принимали его равным нулю. Критическую точку $t_{кр}$ находили из таблиц распределения Стьюдента [5] по числу степеней свободы $n(m-1)$ и заданной вероятности P . $S_{\text{коэф}}$ вычисляли по формуле:

$$S_{\text{коэф}} = \sqrt{\frac{S_y^2}{nm}}. \quad (6)$$

Дисперсию воспроизводимости рассчитывали, используя формулу:

$$S_y^2 = \frac{1}{n(m-1)} \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^m (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2, \quad (7)$$

где n – число экспериментов (строк в матрице ПФЭ); m – число опытов в каждом эксперименте; Y_{ij} – результат отдельного i -ого наблюдения в j -м наблюдении; \bar{Y}_j – среднее выборочное значение для j -го эксперимента.

Проверка адекватности полученного уравнения регрессии проводилась по критерию Фишера, при этом уравнение считали адекватным, если соблюдалось неравенство: $F_{\text{расч}} < F_{\text{табл}}$.

$F_{\text{расч}}$ вычисляли по формуле:

$$F_{\text{расч}} = \frac{S_{\text{ост}}^2}{S_y^2}, \quad (8)$$

где $S_{\text{ост}}^2$ – остаточная дисперсия, определяемая в соответствии с выражением:

$$S_{\text{ост}}^2 = \frac{m}{n-r} \sum_{j=1}^n (\tilde{Y}_j - \bar{Y}_j)^2, \quad (9)$$

где r – число значимых коэффициентов в уравнении регрессии; \tilde{Y}_j – значение изучаемого параметра, определенное по уравнению регрессии со значимыми коэффициентами для j -го эксперимента.

$F_{табл}$ находили из таблиц критических точек распределения Фишера [17] по заданной вероятности и соответствующим степеням свободы $k_1=n-r$, $k_2=n(m-1)$.

Интерпретация полученной модели осуществлялась по уравнению регрессии в кодированных переменных. При этом знак «плюс» у коэффициента говорит о том, что с увеличением данного фактора увеличивается исследуемый параметр, а при знаке «минус», наоборот, уменьшается.

Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли по стандартной методике определения грубых ошибок. Расчеты осуществляли с помощью Microsoft Office Excel 2010 и Mathcad (версия 15.0).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С целью получения расчетной зависимости для оценки величины ПМВ диагностических препаратов использованы математические методы планирования экспериментов. Был спланирован и реализован полный факторный эксперимент 2^3 . Исследуемыми факторами, влияющими на значение ПМВ, были: температура досушивания, время досушивания и количество препарата в ампуле. Значения названных параметров брались в интервалах, применяемых при производстве лиофилизации диагностических препаратов.

Уровни варьирования факторов и зависимость кодированной переменной X_i от натуральной Z_i , а также матрица планирования полного факторного эксперимента с его результатами представлены в табл. 1, 2.

В наших исследованиях базовая модель (1) приняла следующий вид:

$$Y(b, X) = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_1X_2 + b_5X_1X_3 + b_6X_2X_3 + b_7X_1X_2X_3, \quad (10)$$

Применяя метод наименьших квадратов по методике статистической обработки результатов экспериментов, представленной в разделе «Экспериментальная часть», были определены коэффициенты b_i выбранной модели при переменных X_1 , X_2 , X_3 и их взаимодействиях, а также точностные характеристики, определяющие значимость коэффициентов b_i и адекватность модели.

Данные статистической обработки результатов проведенного эксперимента представлены в табл. 3.

В результате обработки данных проведенного эксперимента было получено следующее уравнение регрессии:

$$Y = 1,15 - 0,45X_1 - 0,3X_2 + 0,175X_3 - 0,025X_{2,3} - 0,025X_{1,2} - 0,025X_{1,2,3}. \quad (11)$$

Таблица 1. Уровни варьирования факторов и зависимость кодированной переменной X_i от натуральной Z_i

Table 1. Rate of factor variation and dependence of coded variable X_i on natural one Z_i

Фактор	Основной уровень (нулевой)	Интервал варьирования	Верхний уровень (+)	Нижний уровень (-)	Зависимость кодированной переменной от натуральной
Z_1 – температура досушивания, °C	25,0	5,0	30,0	20,0	$X_1 = \frac{Z_1 - 25}{5}$
Z_2 – время досушивания, ч	10	5	15	5	$X_2 = \frac{Z_2 - 10}{5}$
Z_3 – количество препарата в ампуле, мл	1,25	0,75	2,0	0,5	$X_3 = \frac{Z_3 - 1,25}{0,75}$

Таблица 2. План многофакторного эксперимента и его результаты

Table 2. Scheme of multifactorial experiment and its results

Номер варианта	Факторы			Потеря массы при высушивании (Y), %			
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	Y_{cp}
1	+	+	+	0,5	0,4	0,6	0,5
2	-	+	+	1,5	1,5	1,5	1,5
3	+	-	+	1,0	1,2	0,8	1,2
4	-	-	+	2,0	2,1	2,2	2,1
5	+	+	-	0,3	0,2	0,4	0,3
6	-	+	-	1,1	1,1	1,1	1,1
7	+	-	-	0,8	1,0	0,6	0,8
8	-	-	-	1,6	1,7	1,8	1,7

Таблица 3. Данные статистической обработки результатов эксперимента
 Table 3. Statistical processing of experimental results

b_0	b_1	b_2	b_3	$b_{1,2}$	$b_{1,3}$	$b_{2,3}$	$b_{1,2,3}$	$t_{кр} S_{коэф}$
1,15	0,45	-0,3	0,175	0	-0,025	-0,025	-0,025	0,19
$F_{табл}=3,01; F_{расч}=2,25$								

Последующая статистическая обработка выражения (11) с принятой вероятностью $P = 95\%$ значимости коэффициентов b_i при $t_{кр}=2,12$ и адекватности модели $F_{расч}=2,25$ выявила, что коэффициенты регрессии для факторов $X_{1,3}; X_{2,3}; X_{1,2,3}$ не являются значимыми, их можно не учитывать. Следовательно, уравнение (11) выглядит следующим образом:

$$Y = 1,15 - 0,45X_1 - 0,3X_2 + 0,175X_3. \quad (12)$$

Или в натуральных величинах факторов:

$$Y = 1,15 - 0,45 \left(\frac{Z_1 - 25}{5} \right) - 0,3 \left(\frac{Z_2 - 10}{5} \right) + 0,175 \left(\frac{Z_3 - 1,25}{0,75} \right). \quad (13)$$

Представляло определенный интерес выявление соответствия расчетных и полученных ПМВ при тех значениях температуры и времени досушивания, а также количества препарата в ампуле, при которых исследования не проводились. Для проведения экспериментов были выбраны следующие значения вышеназванных технологических факторов: 35 °С, 12 ч и 1,0 мл. Рассчитанная величина ПМВ составляла 0,07%, а определенная экспериментально – 0,05%. Данные значения являются дополнительным подтверждением адекватности уравнения (13).

Множители при X_1 (температура досушивания) и X_2 (время досушивания) отрицательны. Это свидетельствует о том, что при увеличении данных технологических параметров уменьшается величина ПМВ. Множитель при X_3 положительный. Это говорит о том, что при увеличении количества препарата в ампуле величина ПМВ, наоборот, увеличивается.

Следует отметить, что полученное уравнение регрессии (13) успешно используется при промышленном производстве диагностических бактериофагов: чумного Л-413С, Покровского (П) и

псевдотуберкулезного.

Представляло определенный научно-практический интерес изучение влияния высоты высушиваемого материала на ПМВ. С этой целью были спланированы и проведены эксперименты по лиофилизации эквивалентного количества продукта (имеющего одинаковую высоту) во флаконах ФО-10 вместимостью 10 мл и ампулах типа ШП-6 объемом 6 см³. Фасовка в ампулы составляла 2,0 мл (высота материала 15 мм), соответственно эквивалентное количество продукта во флаконе – 4 мл (коэффициент соотношения между количеством высушиваемого материала составил 0,5). Технологические параметры досушивания были следующие: температура – 30 °С, продолжительность – 15 ч. ПМВ как в ампулах, так и во флаконах составила 0,5%. Необходимо заметить, что значения ПМВ материала, высушенного в ампулах, идентичны рассчитанным по зависимости (13).

Преобразованная формула для вычисления ПМВ при лиофилизации во флаконах будет иметь вид:

$$Y = 1,15 - 0,45 \left(\frac{Z_1 - 25}{5} \right) - 0,3 \left(\frac{Z_2 - 10}{5} \right) + 0,175 \left(\frac{0,5Z_{флз} - 1,25}{0,75} \right), \quad (14)$$

где 0,5 $Z_{флз}$ – количество препарата во флаконе, мл.

Результаты подтверждающих экспериментов при количестве препарата во флаконе 2 мл представлены в табл. 4.

Анализ данных, представленные в табл. 4, свидетельствует об удовлетворительной сходимости расчетных и экспериментальных значений. Это позволяет говорить о возможности применения выражения (14) для вычисления технологических характеристик.

Таблица 4. Результаты подтверждающих экспериментов при количестве препарата во флаконе 2 мл
 Table 4. Results of confirmation experiments, with 2 ml of preparation per flask

Режимы досушивания		ПМВ, %	
		рассчитанная	определенная экспериментально
Температура, °С	Время, ч		
25	5	1,27	1,3
25	15	0,67	0,7
20	5	1,72	1,75
20	15	0,8	0,8

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработанные нами математические выражения (13) и (14) дают возможность:

– предсказывать, а также определять в процессе лиофилизации текущие величины промежуток величин ПМВ сухого биопрепарата при различных технологических параметрах десорбции;

– прогнозировать время процедуры десорбции для установления требуемого значения ПМВ при установленных температурно-временных параметрах;

– определить температуру биопрепарата при установленной длительности десорбции.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Гусаров Д.А. Лиофилизация биофармацевтических белков (миниобзор) // Биофармацевтический журнал. 2010. Т. 2. N 5. С. 3–7.

2. Комиссаров А.В., Бибиков Д.Н., Волох О.А., Бадарин С.А., Синицына Н.В., Костылева Н.И. [и др.]. Лиофилизация живых вакцин // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2018. Т. 14. N 3. С. 56–73.

3. Komissarov A.V., Bibikov D.N., Volokh O.A., Badarin S.A., Sinitsyna N.V., Kostyleva N.I., et al. Lyophilisation of inactivated vaccines // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9. N 3. С. 403–419. <http://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-3-403-419>

4. Pikal M.J., Rambhatla S., Ramot R. The impact of the freezing stage in lyophilization: effects of the ice nucleation temperature on process design and product quality // American Pharmaceutical Review. 2002. Vol. 5. P. 48–53.

5. Tang X., Pikal M.J. Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice // Pharmaceutical Research. 2004. Vol. 21. Issue 2. P. 191–200. <https://doi.org/10.1023/b:pham.0000016234.73023.75>

6. Franks F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 1998. Vol. 45. Issue 3. P. 221–229. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(98\)00004-6](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(98)00004-6)

7. Collier L.H. The development of a stable smallpox vaccine // Epidemiology and Infection. 1955. Vol. 53. P. 76–101. <https://doi.org/10.1017/S002217240000053X>

8. Colandene J.D., Maldonado L.M., Creagh A.T., Vrettos J.S. Lyophilization cycle development for a high-concentration monoclonal antibody formulation lacking a crystalline bulking agent // Journal of Pharmaceutical Sciences. 2007. Vol. 96. Issue 6. P. 1598–1608. <https://doi.org/10.1002/jps.20812>

9. Meister E., Gieseler H. Freeze-dry microscopy of protein/sugar mixtures: Drying behavior, interpretation of collapse temperatures and a comparison to

corresponding glass transition Data // Journal of Pharmaceutical Sciences. 2009. Vol. 98. Issue 9. P. 3072–3087. <https://doi.org/10.1002/jps.21586>

10. Constantino H.R., Pikal M.J. Lyophilization of Biopharmaceuticals. Arlington, VA, USA: AAPS Press, 2004. 686 p.

11. Bhatnagar B.S., Pikal M.J., Bogner R.H. Study of the individual contributions of ice formation and freeze-concentration on isothermal stability of lactate dehydrogenase during freezing // Journal of Pharmaceutical Sciences. 2008. Vol. 97. Issue 2. P. 798–814. <https://doi.org/10.1002/jps.21017>

12. Нежута А.А., Сербис Е.С. Разработка научно-обоснованных режимов сублимационной сушки биопрепаратов // Биотехнология. 2001. N 6. С. 59–67.

13. Будыка Д.А., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Гостищева С.Е., Фисун А.А., Ляпустина Л.В. Сравнительный анализ экспериментальных серий вакцины чумной живой по показателям жизнеспособности и термостабильности // Проблемы особо опасных инфекций. 2009. N 4 (102). С. 68–71. [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2009-4\(102\)-68-71](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2009-4(102)-68-71)

14. Будыка Д.А., Абзаева Н.В., Гостищева С.Е., Ракитина Е.Л., Иванова Г.Ф., Фисун А.А. Биотехнология стабилизации живых микроорганизмов в биомассе и в препарате чумной вакцины // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6. N 1. С. 87–92.

15. Нежута А.А., Сербис Е.С., Диденко А.А., Головлева С.И. Некоторые аспекты сублимационного высушивания биоматериалов // Фармацевтические технологии и упаковка. 2012. N 4. С. 38–40.

16. Комиссаров А.В., Овчинникова М.В., Бадарин С.А., Бибиков Д.Н., Синицына Н.В., Костылева Н.И. [и др.]. Экспериментальное обоснование новой формы выпуска холерных диагностических сывороток // Проблемы особо опасных инфекций. 2017. N 4. С. 38–40. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-4-38-40>

17. Адлер Ю.П., Маркова Е.В., Грановский Ю.В. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. М.: Наука, 1976. 279 с.

REFERENCES

1. Gusarov DA. Freeze-drying of biopharmaceutical proteins (mini-review). *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Journal of Biopharmaceutics*. 2010;2(5): 3–7. (In Russian)

2. Komissarov AV, Bibikov DN, Volokh OA, Badarin SA, Sinitsyna NV, Kostyleva NI, et al. Lyophilization of live vaccines. *Vestnik biotekhnologii i fizi-*

ko-khimicheskoi biologii imeni Yu.A. Ovchinnikova. 2018;14(3):56–73. (In Russian)

3. Komissarov AV, Bibikov DN, Volokh OA, Badarin SA, Sinitsyna NV, Kostyleva NI, et al. Lyophilisation of inactivated vaccines. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and*

Biotechnology. 2019;9(3):403–419. <http://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-3-409-419>

4. Pikal MJ, Rambhatla S, Ramot R. The impact of the freezing stage in lyophilization: effects of the ice nucleation temperature on process design and product quality. *American Pharmaceutical Review*. 2002;5:48–53.

5. Tang X, Pikal MJ. Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice. *Pharmaceutical Research*. 2004;21(2):191–200. <https://doi.org/10.1023/b:pham.0000016234.73023.75>

6. Franks F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1998;45(3): 221–229. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(98\)0004-6](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(98)0004-6)

7. Collier LH. The development of a stable smallpox vaccine. *Epidemiology and Infection*. 1955;53:76–101. <https://doi.org/10.1017/S002217240000053X>

8. Colandene JD, Maldonado LM, Creagh AT, Vrettos JS. Lyophilization cycle development for a high-concentration monoclonal antibody formulation lacking a crystalline bulking agent. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007;96(6):1598–1608. <https://doi.org/10.1002/jps.20812>

9. Meister E, Gieseler H. Freeze-dry microscopy of protein/sugar mixtures: drying behavior, interpretation of collapse temperatures and a comparison to corresponding glass transition data. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;98(9):3072–3087. <https://doi.org/10.1002/jps.21586>

10. Constantino HR, Pikal MJ. *Lyophilization of Biopharmaceuticals*. Arlington, VA, USA: AAPS Press; 2004. 686 p.

11. Bhatnagar BS, Pikal MJ, Bogner RH. Study of the individual contributions of ice formation and

freeze-concentration on isothermal stability of lactate dehydrogenase during freezing. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97():798–814. <https://doi.org/10.1002/jps.21017>

12. Nezhuta AA, Serbis ES. Development of scientifically grounded modes of freeze drying of biological products. *Biotehnologiya = Biotechnology*. 2001;6:59–67. (In Russian)

13. Budyka DA, Abzaeva NV, Ivanova GF, Gostischeva SE, Fissun AA, Lyapustina LV. Comparative Analysis of Experimental Series of Plague Live Vaccine as for Viability and Thermostability Indices. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2009;102:68–71. (In Russian) [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2009-4\(102\)-68-71](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2009-4(102)-68-71)

14. Budyka DA, Abzaeva NV, Gostischeva SE, Rakitina EL, Ivanova GF, Fissun AA. Living microorganism's stabilization in biomass biotechnology and plague vaccine preparation. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*. 2016;6(1):87–92. (In Russian)

15. Nezhuta AA, Serbis ES, Didenko AA, Golovleva SI. Some aspects of freeze drying of biomaterials. *Farmatsevticheskie tekhnologii i upakovka*. 2012;4:38–40. (In Russian)

16. Komissarov AV, Ovchinnikova MV, Badarin SA, Bibikov DN, Sinitsyna NV, Kostyleva NI, et al. Experimental Substantiation of New Presentation Form of Cholera Diagnostic Sera. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2017;4:38–40. (In Russian) <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-4-38-40>

17. Adler YuP, Markova EV, Granovskii YuV. *Planning an experiment to find optimal conditions*. Moscow: Nauka; 1976. 279 p. (In Russian)

Критерии авторства

Комиссаров А.В., Бибиков Д.Н., Бадарин С.А., Сеницына Н.В., Костылева Н.И., Овчинникова М.В., Коровкина Г.И., Зинина О.С., Плотников И.А., Никифоров А.К. выполнили работу, на основании полученных результатов провели обобщение и написали рукопись. Авторы имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Contribution

Alexander V. Komissarov, Dmitry N. Bibikov, Sergey A. Badarin, Nataliya V. Sinitsyna, Nataliya I. Kostyleva, Marya V. Ovchinnikova, Galina I. Korovkina, Olga S. Zinina, Igor A. Plotnikov, Aleksey K. Nikiforov carried out the experimental work, on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. All authors have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict of 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.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Комиссаров Александр Владимирович,
д.б.н., доцент, главный научный сотрудник,
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
Российский научно-исследовательский
Противочумный институт «Микроб»,
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
Российская Федерация;
профессор кафедры микробиологии,
биотехнологии и химии,
Саратовский государственный аграрный
университет им. Н.И. Вавилова,
410012, г. Саратов, Театральная пл., 1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: Komissarov-9@yandex.ru

Бибиков Дмитрий Николаевич,
младший научный сотрудник,
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
Российская Федерация,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Бадарин Сергей Анаторльевич,
научный сотрудник,
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
Российская Федерация,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Синицына Наталья Викторовна,
научный сотрудник,
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
Российская Федерация,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Костылева Наталья Ивановна,
научный сотрудник,
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
Российская Федерация,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Овчинникова Мария Владимировна,
к.б.н., ведущий научный сотрудник,
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
Российская Федерация,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Alexander V. Komissarov,
Dr. Sci. (Biology), Associate Professor,
Chief Researcher,
Russian Research Anti-Plague Institute
«Microbe»,
46, Univesitetskaya St., Saratov, 410005,
Russian Federation;
Professor,
Microbiology, Biotechnology, and Chemistry De-
partment,
N.I. Vavilov Saratov State Agrarian University,
1, Teatral'naya Sq., Saratov, 410012,
Russian Federation,
✉ e-mail: Komissarov-9@yandex.ru

Dmitry N. Bibikov,
Junior Researcher,
Russian Research Anti-Plague Institute
«Microbe»,
46, Univesitetskaya St., Saratov, 410005,
Russian Federation,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Sergey A. Badarin,
Researcher,
Russian Research Anti-Plague Institute
«Microbe»,
46, Univesitetskaya St., Saratov, 410005,
Russian Federation,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Nataliya V. Sinitsyna,
Researcher,
Russian Research Anti-Plague Institute
«Microbe»,
46, Univesitetskaya St., Saratov, 410005,
Russian Federation,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Nataliya I. Kostyleva,
Researcher,
Russian Research Anti-Plague Institute
«Microbe»,
46, Univesitetskaya St., Saratov, 410005,
Russian Federation,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Marya V. Ovchinnikova,
Cand. Sci. (Biology),
Russian Research Anti-Plague Institute
«Microbe»,
46, Univesitetskaya St., Saratov, 410005,
Russian Federation,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Коровкина Галина Ивановна,
к.м.н., старший научный сотрудник,
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
Российская Федерация,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Зинина Ольга Сергеевна,
к.м.н., старший научный сотрудник,
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
Российская Федерация,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Плотников Игорь Аркадьевич,
научный сотрудник,
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
Российская Федерация,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Никифоров Алексей Константинович,
д.б.н., доцент, заместитель директора,
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
Российская Федерация;
профессор кафедры микробиологии,
биотехнологии и химии,
Саратовский государственный аграрный
университет им. Н.И. Вавилова,
410012, г. Саратов, Театральная пл., 1,
Российская Федерация,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Galina I. Korovkina,
Cand. Sci. (Medicine), Senior Researcher,
Russian Research Anti-Plague Institute
«Microbe», Candidate of medical sciences,
46, Univesitetskaya St., Saratov, 410005,
Russian Federation,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Olga S. Zinina,
Cand. Sci. (Medicine), Senior Researcher,
Russian Research Anti-Plague Institute
«Microbe»,
46, Univesitetskaya St., Saratov, 410005,
Russian Federation,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

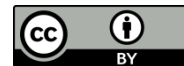
Igor A. Plotnikov,
Researcher,
Russian Research Anti-Plague Institute
«Microbe»,
46, Univesitetskaya St, Saratov, 410005,
Russian Federation,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Aleksey K. Nikiforov,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Deputy Director on the research
and Manufacturing activities,
Russian Research Anti-Plague Institute
«Microbe»,
46, Univesitetskaya St., Saratov, 410005,
Russian Federation;
Professor,
Microbiology, Biotechnology, and Chemistry
Department,
N.I. Vavilov Saratov State Agrarian University,
1, Teatral'naya Sq., Saratov, 410012,
Russian Federation,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Оригинальная статья / Original article

УДК 66.097.3-039.7

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-515-521>



Особенности поведения фермента панкреатической липазы при рециклизации в процессах синтеза бутилбутирата в неводных средах

© В.С. Гамаюрова, Г.А. Давлетшина

Казанский национальный исследовательский технологический университет,
г. Казань, Российская Федерация

Резюме: Душистые вещества находят сегодня широкое применение при создании различных отдушек для косметических и моющих средств, медицинских препаратов наружного применения, а также в пищевой промышленности. Ферменты, полученные с помощью методов «зеленой химии», особенно ценны ввиду своей экологичности. Поэтому ферментативный синтез сложных эфиров алифатических кислот и спиртов, многие из которых являются душистыми веществами, представляет большой практический интерес. Данный метод имеет существенные преимущества в сравнении с химическим: процесс ведется при низкой температуре, при проведении ферментативных трансформаций практически отсутствуют побочные продукты, вследствие чего не требуется применения специальных методов очистки. Однако стоимость ферментных препаратов достаточно высока, но иммобилизованные ферменты возможно использовать многократно. В настоящей работе была исследована возможность использования неиммобилизованной лиофильно высушенной липазы (*Lipase from porcine pancreas, Type 11*) для многократной этерификации бутилового спирта масляной кислотой. Процесс синтеза проводился в среде гексана. Полнота протекания процесса контролировалась путем титрования водно-спиртовой щелочью остаточной кислоты в реакционной среде. После завершения процесса синтеза эфира ферментный препарат отделялся от реакционной смеси и повторно использовался в реакции с новой порцией субстрата. Показано, что фермент может использоваться в более 10 циклах. Обнаружено, что начиная со второго цикла активность фермента возрастает в зависимости от его концентрации в среде. При этом конверсия масляной кислоты увеличивается на 6–180% и только после 10-го цикла сравнивается с исходной. Необычный эффект повышения ферментативной активности липазы в рециклах можно объяснить явлением автокатализа, а именно, активацией фермента водой, выделившейся в результате этерификации, и особенностями строения активного центра панкреатической липазы.

Ключевые слова: бутилбутират, панкреатическая липаза, конверсия, рециклизация, автокатализ

Информация о статье: Дата поступления 19 мая 2020 г.; дата принятия к печати 31 августа 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2020 г.

Для цитирования: Гамаюрова В.С., Давлетшина Г.А. Особенности поведения фермента панкреатической липазы при рециклизации в процессах синтеза бутилбутирата в неводных средах. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 3. С. 515–521. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-515-521>

Behaviour of pancreatic lipase enzyme during recyclization when synthesizing butyl butyrate in non-aqueous media

Valentina S. Gamaurova, Guzel A. Davletshina

Kazan National Research Technological University, Kazan, Russian Federation

Abstract: Aromatic substances are widely applied in the creation of fragrances for cosmetic, detergent and food products, as well as medical preparations for external use. Environmentally friendly enzymes obtained using green chemistry methods are of particular value. Therefore, the enzymatic synthesis of esters of aromatic aliphatic acids and aromatic alcohols is of great practical interest. This approach has significant advantages over chemical methods, since it is carried out at low temperatures without the formation of by-products, thus requiring no special purification techniques. Although the cost of enzyme preparations is ra-

ther high, immobilized enzymes can be used repeatedly and continuously. In the present work, we investigate the possibility of using non-immobilized freeze-dried lipase (Lipase from porcine pancreas, Type 11) for repeated esterification of butyl alcohol with butyric acid. The synthesis was carried out in hexane. The completeness of the process was controlled by titration of the residual acid with aqueous alcoholic alkali in the reaction medium. The resulting enzyme preparation was separated from the reaction mixture and reused with a new portion of the substrate. It is shown that the obtained enzyme can be used for more than 10 cycles. It was found that, starting from the second cycle, the enzyme activity increases depending on its concentration in the medium. In addition, the butyric acid conversion increases by 6–180% reaching the initial level only after the 10th cycle. The unusual effect of increasing the enzymatic activity of lipase in recycles can be explained by both the phenomenon of autocatalysis, i.e. activation of the enzyme by water released as a result of esterification, and structural features of the active site of pancreatic lipase.

Keywords: butyl butyrate, pancreatic lipase, conversion, recycling, autocatalysis

Information about the article: Received May 19, 2020; accepted for publication August 31, 2020; available online September 30, 2020.

For citation: Gamaurova VS, Davletshina GA. Behaviour of pancreatic lipase enzyme during recyclization when synthesizing butyl butyrate in non-aqueous media. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):515–521. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-515-521>

ВВЕДЕНИЕ

Сложные эфиры алифатических кислот и спиртов находят широкое применение в качестве ароматизаторов в пищевой промышленности, при производстве синтетических моющих средств, а также в различных композициях они используются в парфюмерии и ароматерапии¹ [1, 2]. Кроме того, они используются в различных отраслях промышленности в качестве растворителей, пластификаторов, смазочных масел, гидравлических жидкостей. В последние годы сложные эфиры высших спиртов стали рассматриваться как перспективные добавки и присадки к дизельному топливу [3, 4]. Основу самого биодизельного топлива составляют сложные эфиры низших спиртов. В связи с этим резко возрос интерес к получению сложных эфиров из различных источников, в том числе и с использованием ферментативного катализа с применением липаз [5–10].

В случае применения ферментативного катализа важным моментом является выявление возможности повторного или даже многократного использования ферментного препарата для реализации синтеза, что, безусловно, позволяет снизить его расход и вклад в себестоимость готовой продукции. Многократное использование ферментов характерно для иммобилизованных препаратов, которые имеют более высокую термическую и механическую устойчивость [11–13]. Так, при ферментативном катализе душистых веществ алифатического ряда с использованием иммобилизованных коммерческих препаратов было показано, что биокатализатор Novozyme

435 сохранял до 80% ферментативной активности при использовании в 9 циклах, а биокатализатор Lipozyme RM-IM – до 5 циклов [14]. Иммобилизованная липаза *Candida antarctica* (CALB) сохраняла до 65% ферментативной активности после 10 циклов синтеза эфиров ацетоина и жирных кислот [15]. Рекомбинантная липаза *rPicha/lip*, иммобилизованная на двуокиси кремния, сохраняет высокую активность и стабильность до 40 циклов при этерификации насыщенных жирных кислот (C4-18) со спиртами (C5-16) [16]. Однако неиммобилизованные ферменты имеют меньшую устойчивость, и возможность их использования в рециклах менее вероятна.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве фермента использовался коммерческий препарат Lipase from porcine pancreas (далее – панкреатическая липаза), Type 11, лиофильно высушенный. Активность – 25,0 ед./мг белка при использовании оливкового масла в качестве субстрата. Определение активности липазы проводилось стандартным модифицированным методом Ота и Ямада^{2,3}.

Ферментативный катализ проводился в безводной среде, в качестве растворителя применялся гексан, масляная кислота, бутанол и гексан – х.ч.

Контроль над процессом осуществлялся методом титрования по уменьшению количества кислоты в системе. Титрование проводили 0,1 N спиртовым раствором NaOH (в 80%-м этиловом спирте) при температуре 20 °С, в качестве инди-

¹Братус И.Н. Химия душистых веществ: учебник для учащихся техникумов; 2-е изд., перераб. и доп. М.: Агропромиздат. 1992. 240 с.

²Грачева И.М. Технология ферментативных препаратов. М.: Агропромиздат, 1987. 335 с.

³Гамаюрова В.С., Зиновьева М.Е. Ферменты. Лабораторный практикум. СПб.: Проспект науки, 2017. 256 с.

катора использовался 1%-й спиртовой раствор фенолфталеина, Контрольный образец не содержал ферментного препарата.

Конверсию кислоты, B , %, рассчитывали по формуле:

$$B = (K - O) / K \cdot 100,$$

где K – количество спиртового раствора NaOH, затраченное на титрование контроля, мл; O – количество спиртового раствора NaOH, затраченное на титрование пробы, мл.

Процесс осуществлялся следующим образом: в колбу помещали субстрат, представляющий собой смесь масляной кислоты и бутанола в мольном соотношении 1:1 (масляная кислота использовалась в виде 0,1 N раствора в гексане), и ферментный препарат панкреатической липазы. Синтез эфиров проводился при 35 °C и варьировании скорости перемешивания.

Все эксперименты проводили в 12-ти повторностях. Результаты обрабатывали с помощью пакета статистических программ Statistica 6.0. Достоверность отличий контрольных и экспериментальных результатов оценивали при помощи t -критерия Стьюдента. Погрешность измерений не превышала 7%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Липазы представляют большой интерес в практической реализации органического синтеза сложных эфиров. Они позволяют получать достаточно чистые целевые продукты, не загрязненные побочными веществами, ввиду высокой специфичности ферментов. Ферментативный синтез, как правило, проводится при низких температурах, что привлекательно, поскольку процесс малозатратен. Экономическая эффективность таких процессов также связана с возможностью многократного использования иммобилизованных ферментных препаратов. В этой работе была проверена возможность рециклизации (многократного использования) *неиммобилизованного* ферментного препарата – панкреатической липазы, в синтезе бутилбутирата при проведении процесса в среде гексана. В эксперименте реакционная среда через 24 ч отделялась от ферментного препарата, к которому затем приливали новую порцию субстрата. Результаты повторных циклов синтеза с тем же количеством ферментного препарата при внесении свежей порции субстрата в начале каждого цикла приведены на рис. 1.

Как видно из диаграммы, приведенной на рис. 1, при повторном использовании панкреатической липазы конверсия масляной кислоты увеличилась с 72 до 87% и только на 10-й цикл она сравнялась с первоначальной. При повторении эксперимента с тем же количеством субстрата при меньшем количестве ферментного препара-

та в смеси (2,6 мг/мл) получены результаты, представленные на рис. 2. В этом случае конверсия масляной кислоты уже на 2-ой цикл увеличилась в 1,8 раза и до 8-го цикла держалась в 1,5 раза выше по сравнению с первоначальной.

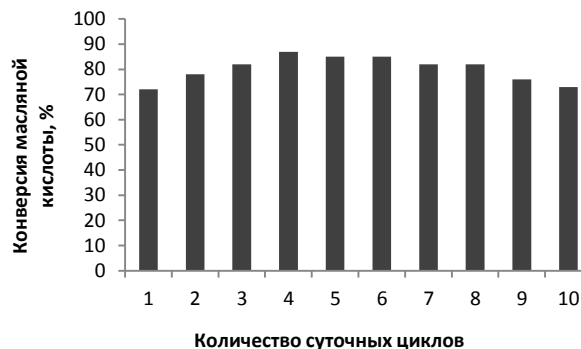


Рис. 1. Ферментативный синтез бутилбутирата панкреатической липазой: концентрация препарата – 5 мг/мл; температура процесса – 35 °C; скорость перемешивания – 70 об./мин

Fig. 1. Enzymatic synthesis of butyl butyrate by pancreatic lipase: drug concentration – 5 mg/ml; process temperature – 35 °C; stirring speed – 70 rpm

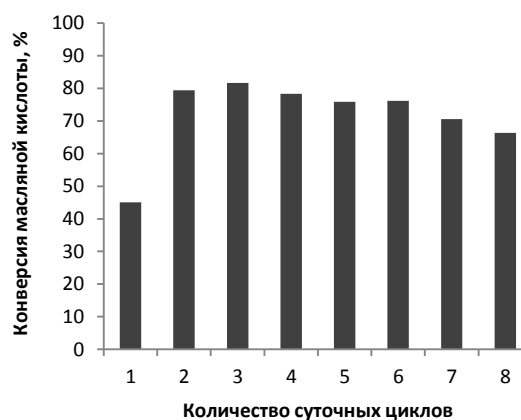


Рис. 2. Ферментативный синтез бутилбутирата панкреатической липазой: концентрация препарата – 2,6 мг/мл; температура процесса – 35 °C; скорость перемешивания – 70 об./мин

Fig. 2. Enzymatic synthesis of butyl butyrate by pancreatic lipase: drug concentration – 2.6 mg/ml; process temperature – 35 °C; stirring speed – 70 rpm

В другой серии опытов синтез бутилбутирата проведен при увеличении содержания фермента в реакционной смеси до 20 мг/мл и мольном соотношении кислота:спирт 1:2, без перемешивания, при температуре процесса 35 °C (рис. 3).

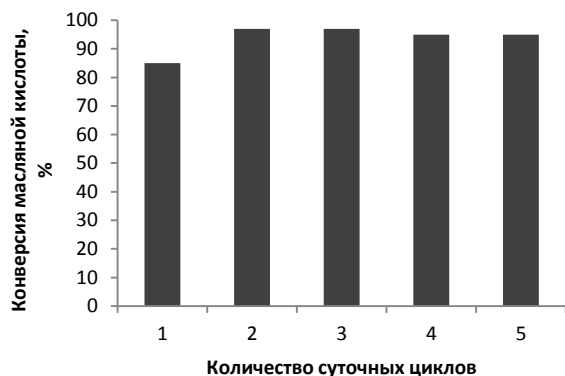


Рис. 3. Ферментативный синтез бутилбутирата панкреатической липазой: концентрация препарата 20 мг/мл; температура процесса – 35 °С; без перемешивания

Fig. 3. Enzymatic synthesis of butyl butyrate by pancreatic lipase: drug concentration 20 mg/ml; process temperature – 35 °C; without stirring

Следует отметить, что уже после первого цикла процесса уровень конверсии масляной кислоты превышал 80%, а последующее четырехкратное помещение отделенного из реакционной массы фермента в свежую порцию субстрата позволило повысить уровень конверсии до 96%.

Проведенные эксперименты показали, что панкреатическую липазу можно многократно использовать для синтеза эфира. Парадоксальность ситуации заключается в том, что при повторных использованиях ферментного препарата конверсия кислоты увеличивалась по сравнению с исходной. Во всех исследованных ситуациях уже на вторые сутки (второй рецикл) конверсия кислоты увеличивалась на 6–15%, а при малой концентрации препарата (2,6 мг/мл) – в 1,8 раза. Только после десятикратного рецикла ферментного препарата конверсия кислоты

начала приближаться к первоцикличной. Таким образом, обозначены предпосылки уникального процесса – многократного использования неиммобилизованного фермента для синтеза сложных эфиров.

Обнаруженный факт нарастания ферментативной активности в рециклах свидетельствует об активации фермента уже после первых циклов этерификации. Этот факт может служить показателем наличия в системе автокатализа. Это явление может быть объяснено следующим образом. В процессе этерификации выделяется вода, которая может активировать высушенную сублимацией панкреатическую липазу. Формально это может быть названо автокатализом. Это подтверждает, что, несмотря на протекание синтеза в безводной среде, собственно катализ липазой реализуется в активном центре на границе раздела фаз липид (субстрат)/вода, следовательно, присутствие некоторого количества воды необходимо для реализации процесса синтеза. Такое необычное поведение панкреатической липазы также можно объяснить тем, что в трехмерной структуре некоторых липаз присутствует полипептидная цепь липофильного альфа-спирального домена, прикрывающего активный центр фермента, так называемая «крышка», регулирующая доступ молекул к активному центру [11, 17]. Открытие активного центра фермента может произойти под воздействием субстрата или других факторов среды. Косвенным подтверждением этого может служить тот факт, что при сравнении этерифицирующей способности некоторых липаз (панкреатическая липаза, Lipozyme CALB и Lipozyme TL IM) при синтезе бутилбутирата в равных условиях для ферментов (концентрация кислоты 0,1 N, мольное соотношение кислота:спирт = 1:2) нами обнаружено, что панкреатическая липаза, в отличие от других ферментов, показывает индукционный период около одного часа, когда процесс практически не идет (рис. 4) [18].

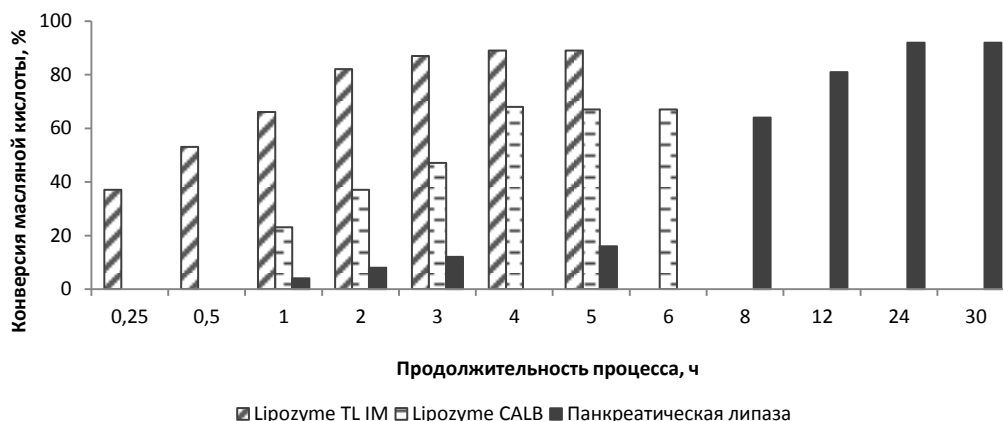


Рис. 4. Ферментативный синтез бутилбутирата различными липазами

Fig. 4. Enzymatic synthesis of butyl butyrate by various lipases

Как видно из представленных на рис. 4 данных, через 24 ч синтеза конверсия кислоты с помощью панкреатической липазы достигает 90% наравне с другими липазами, которые достигают такой конверсии кислоты за 4–5 ч. Имобилизованные липазы, имеющие стабильную и более жесткую структуру, не обнаруживают такого эффекта. Кроме того, нужно учесть, что сравниваемые нами липазы, синтезируемые микроорганизмами, так же, как и панкреатическая липаза, могут иметь множественные молекулярные формы и по свойствам могут быть неидентичны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, сублимированная неимобилизованная панкреатическая липаза при ката-

лизе реакций этерификации в неводных средах на начальных этапах рециклизации показывает увеличение ферментативной активности. Это указывает на то, что при синтезе в безводной среде для реализации акта катализа необходимо присутствие в активном центре липазы некоторого количества воды, которое при недостатке восполняется выделением воды в процессе этерификации. Формально это можно назвать явлением автокатализа. Кроме того, нужно учесть особенность упаковки активного центра липазы, которая также может повысить активацию липазы за счет постепенного более полного раскрытия «крышки» и тем самым повысить доступность активного центра липазы.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Войткевич С.А. 865 душистых веществ для парфюмерии и бытовой химии. М.: Пищевая промышленность, 1994. 594 с.
2. Хейфиц Л.А., Дашунин В.М. Душистые вещества и другие продукты для парфюмерии. М.: Химия, 1994. 226 с.
3. Гамаюрова В.С., Зиновьева М.Е., Шнайдер К.Л., Давлетшина Г.А. Липазы в реакциях этерификации: обзор // Катализ в промышленности. 2020. Т. 20. N 3. С. 216–233. <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2020-3-216-233>
4. Кондрашева Н.К., Кондрашев Д.О., Еремеева А.М. Получение и исследование биодизельного топлива на основе кукурузного масла и бутилового спирта // Академический журнал Западной Сибири. 2014. Т. 10. N 2 (51). С. 24.
5. Гарабаджиу А.В., Голынкин В.А., Карсев М.М., Козлов Г.В., Лисицкая Т.Б. Основные аспекты использования липаз для получения биодизеля (обзор) // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). 2010. N 7 (33). С. 63–67.
6. Росс М.Ю., Стребков Д.С. Биодизельное топливо из водорослей: монография. М.: ГНУ ВИЭСХ, 2008. 252 с.
7. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Беклемишев А.Б., Яковлева Е.Ю., Пыхтина М.Б. Биокаталитические гетерогенные процессы переэтерификации растительных масел в биодизель // Катализ в промышленности. 2014. N 6. С. 71–79.
8. Varfolomeev S.D., Krylova L.P., Efremenko E.N. Biofuels // Russian Chemical Reviews. 2010. Vol. 79. Issue 6. P. 544–564. <https://doi.org/10.1070/RC2010v079n06ABEH004138>
9. Firdaus M.Y., Brask J., Nielsen P.M., Guo Z., Fedorov S. Kinetic model of biodiesel production catalyzed by free liquid lipase from *Thermomyces* // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2016. Vol. 133. P. 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.07.011>
10. Самойлова Ю.В., Сорокина К.Н., Пилигев А.В., Пармон В.Н. Применение бактериальных термостабильных липолитических ферментов в современных биотехнологических процессах // Катализ в промышленности. 2018. Т. 18. N 6. С. 61–73. <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2018-6-61-73>
11. Тырсин Ю.А., Шеламова С.А. Механизмы гидролиза, синтеза и переэтерификации в пищевой биотехнологии: монография. Воронеж: Научная книга, 2012. 212 с.
12. Matte C.R., Bordinhao C., Poppe J.K., Rodrigues R.C., Hertz P.F., Ayub A.Z. Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150 // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2016. Vol. 127. P. 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.02.016>
13. Gubicza L., Kabriri-Badr A., Keoves E., Belafi-Bako K. Large-scale enzymatic production of natural flavor esters in organic solvent with continuous water removal // Journal of Biotechnology. 2001. Vol. 84. P. 193–196. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00352-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00352-7)
14. Martins A.B., da Silva A.M., Schein M.F., Garcia-Galan C., Záchia Ayub M.A., Fernandez-Lafuente R., et al. Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different flavor esters // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2014. Vol. 105. P. 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.03.021>
15. Xiao Z., Hou X., Lyu X., Zhao J.-Y., Xi L., Li J., et al. Enzymatic synthesis of aroma acetoin fatty acid esters by immobilized *Candida antarctica* lipase B. // Biotechnology Letters. 2015. Vol. 37. Issue 8. P. 1671–1677. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1834-0>
16. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Беклемишев А.Б., Мамаев А.Л. Биокаталитические гетерогенные процессы этерификации насыщенных жирных кислот с алифатическими спиртами // Катализ в промышленности. 2017. Т. 17. N 5. С. 399–406. <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2017-399-406>

5-399-406

17. Bezborodov A.M., Zagustina N.A. Lipases in catalytic reactions of organic chemistry // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2014. Vol. 50. Issue 4. P. 313–337. <https://doi.org/10.1134/S0003683814040024>

18. Gamayurova V.S., Jamai M.J., Zaripova S.K., Shnaider K.L., Bildanova N.I., Chernykh M.N. Comparison of esterifying ability of some lipases // *Journal of Advanced Chemical Sciences*. 2018. Vol. 4. Issue 11. P. 531–533. <https://doi.org/10.30799/jacs.179.18040102>

REFERENCES

1. Voitkevich SA. *865 fragrances for perfumery and household chemicals*. Moscow: Pishchevaya promyshlennost'; 1994. 594 p. (In Russian)

2. Heifits LA, Dashunin VM. *Fragrances and other products for perfumery*. Moscow: Khimiya; 1994. 226 p. (In Russian)

3. Gamayurova VS, Zinovieva ME, Shnaider KL, Davletshina GA. Lipases in esterification reactions: a review. *Kataliz v promyshlennosti = Catalysis in Industry*. 2020;20(3):216–233. (In Russian) <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2020-3-216-233>

4. Kondrasheva NK, Kondrashev DO, Eremeeva AM. Production and research of biodiesel fuel based on corn oil and butyl alcohol. *Akademicheskii zhurnal Zapadnoi Sibiri = Academic Journal of West Siberia*. 2014;10(2):24. (In Russian)

5. Garabadzhiu AV, Golyntkin VA, Karasev MM, Kozlov GV, Lisitskaya TB. The main aspects of the use of lipases for biodiesel production (review). *Izvestiya Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo instituta (tekhnicheskogo universiteta) = Bulletin of St. Petersburg Institute of Technology (Technical University)*. 2010;7:63–67. (In Russian)

6. Ross MYu, Strebkov DS. *Biodiesel from algae*. Moscow: Russian Scientific Research Institute of Electrification of Agriculture; 2008. 252 p. (In Russian)

7. Kovalenko GA, Perminova LV, Beklemishev AB, Yakovleva EYu, Pykhtina M B. Biocatalytic heterogeneous processes of interesterification of vegetable oils into biodiesel. *Kataliz v promyshlennosti = Catalysis in Industry*. 2014;6:71–79. (In Russian)

8. Varfolomeev SD, Krylova LP, Efremenko EN. Biofuels. *Russian Chemical Reviews*. 2010;79(6): 544–564. <https://doi.org/10.1070/RC2010v079n06ABEH004138>

9. Firdaus MY, Brask J, Nielsen PM, Guo Z, Fedorov S. Kinetic model of biodiesel production catalyzed by free liquid lipase from *Thermomyces*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2016;133:55–64. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.07.011>

10. 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;18(6):61–73. <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2018-6-61-73>

18412/1816-0387-2018-6-61-73 (In Russian)

11. Tyrsin YuA, Shelamova SA. *Mechanisms of hydrolysis, synthesis and transesterification in food biotechnology*. Voronezh: Nauchnaya kniga; 2012. 212 p. (In Russian)

12. Matte CR, Bordinhao C, Poppe JK, Rodrigues RC, Hertz PF, Ayub AZ. Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2016;127:67–75. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.02.016>

13. Gubicza L, Kabriri-Badr A, Keoves E, Belafi-Bako K. Large-scale enzymatic production of natural flavor esters in organic solvent with continuous water removal. *Journal of Biotechnology*. 2001;84: 193–196. [https://doi.org/10.1016/s01681656\(00\)00352-7](https://doi.org/10.1016/s01681656(00)00352-7)

14. Martins AB, da Silva AM, Schein MF, Garcia-Galan C, Záchia Ayub MA, Fernandez-Lafuente R, et al. Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different flavor esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2014;105:18–25. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.03.021>

15. Xiao Z, Hou X, Lyu X, Zhao J-Y, Xi L, Li J, et al. Enzymatic synthesis of aroma acetoin fatty acid esters by immobilized *Candida antarctica* lipase B. *Biotechnology Letters*. 2015;37(8):1671–1677. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1834-0>

16. Kovalenko GA, Perminova LV, Beklemishev AB, Mamamev AL, Patrushev YuV. Heterogeneous biocatalytic processes of esterification of saturated fatty acids with aliphatic alcohols. *Kataliz v promyshlennosti = Catalysis in Industry*. 2017;17(5):399–406. (In Russian) <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2017-5-399-406>

17. Bezborodov AM, Zagustina NA. Lipases in catalytic reactions of organic chemistry. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2014;50(4):313–337. <https://doi.org/10.1134/S0003683814040024>

18. Gamayurova VS, Jamai MJ, Zaripova SK, Shnaider KL, Bildanova NI, Chernykh MN. Comparison of esterifying ability of some lipases. *Journal of Advanced Chemical Sciences*. 2018;4(11):531–533. <https://doi.org/10.30799/jacs.179.18040102>

Критериум авторства

Гамаюрова В.С., Давлетшина Г.А. выполнили экспериментальную работу. Авторы совместно

Contribution

Valentina S. Gamaurova, Guzel A. Davletshina carried out the experimental work. The authors on

обобщили результаты, написали рукопись, имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Гамаюрова Валентина Семеновна,
д.х.н., профессор кафедры пищевой биотехнологии,
Казанский национальный исследовательский технологический университет,
420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68,
Российская Федерация,
✉ e-mail: gamaur@kstu.ru

Давлетшина Гузель Адгамовна,
к.х.н., доцент кафедры пищевой биотехнологии,
Казанский национальный исследовательский технологический университет,
420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68,
Российская Федерация,
e-mail: guzeladgamovna@gmail.com

the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. All authors have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict interests

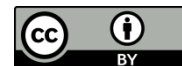
The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

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

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Valentina S. Gamaurova,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Department of Food Biotechnology,
Kazan National Research Technological University,
68, K. Marx St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
✉ e-mail: gamaur@kstu.ru

Guzel A. Davletshina,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Department of Food Biotechnology,
Kazan National Research Technological University,
68, K. Marx St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
e-mail: guzeladgamovna@gmail.com



Исследование состава и свойств нефти Ичѣдинского месторождения

© О.В. Белозерова, В.В. Коваленко, Э.В. Шакирова

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

Резюме: Представлены результаты исследования особенностей химического состава и товарных свойств нефти Ичѣдинского месторождения. Построен график атмосферной перегонки, по кривой истинных температур кипения определено потенциальное содержание товарных фракций. Данные нефти были исследованы по индивидуальному углеводородному составу широкой бензиновой фракции, что позволило рассчитать ее групповой состав, который представлен следующими углеводородными соединениями: алкановые – 53,12% отн., циклоалкановые – 27,21% отн., ароматические – 18,45% отн. По содержанию серы нефть Ичѣдинского месторождения относится к первому классу – малосернистая. Одной из особенностей нефти данного месторождения является ее неспособность образовывать устойчивые эмульсии, так как в составе имеется низкое содержание твердых парафинов. Также представлены искусственные эмульсии с добавлением пластовой воды к нефти с получением 30% обводненности. Готовая эмульсия исследовалась двумя способами: анализ проводился в процессе гравитационного отстаивания в течение 120 мин при температуре 50 °С, а также с помощью прибора LUMiFuge. Таким образом, в ходе исследований установлено, что нефть Ичѣдинского месторождения малосернистая, легкая, с высоким содержанием светлых дистиллятов. Известно, что низкое содержание серы приводит к меньшей коррозии промышленного оборудования и, как следствие, к меньшим затратам на поставку нефти потребителю. Такие нефти являются высококачественным и перспективным сырьем для производства нефтепродуктов.

Ключевые слова: Ичѣдинское нефтяное месторождение, углеводороды, алканы, нафтенны, арены, бензиновая фракция, эмульсии

Информация о статье: Дата поступления 13 июня 2019 г.; дата принятия к печати 31 августа 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2020 г.

Для цитирования: Белозерова О.В., Коваленко В.В., Шакирова Э.В. Исследование состава и свойств нефти Ичѣдинского месторождения. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 3. С. 522–528. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-522-528>

Study of the composition and properties of crude oil mined at the Ichyodinskoye field

Olga V. Belozerova, Valentin V. Kovalenko, Elvira V. Shakirova

Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation

Abstract: This study was aimed at investigating the chemical composition and commercial properties of crude oil mined at the Ichyodinskoye field. A graph of atmospheric distillation was constructed. The content of commercial fractions was determined from the curve of true boiling temperatures. The obtained data were analysed according to the hydrocarbon composition of the gasoline fraction, which was found to comprise alkane, cycloalkane and aromatic compounds in the amount of 53.12%, 27.21% and 18.45%, respectively. In terms of sulphur, the oil mined at the Ichyodinskoye field is considered to be low-sulphur, thus belonging to the 1st class. A distinctive feature of this oil consists in its inability to form stable emulsions due to a low content of solid paraffins in its composition. In the study, artificial emulsions of the oil and deposit water with a watercut value of 30% were obtained. The developed emulsions were investigated by analysing the process of gravitational settling for 120 min at a temperature of 50 °C, as well as using a LUMiFuge device. It was found that the oil mined at the Ichyodinskoye field is low-sulphur and light, containing a high content of light distillates. It is known that low-sulphur oils are safer for field equipment in terms of corrosion, thereby decreasing costs of supplying oil to consumers. Such oils are a high-quality and promising raw material for the production of oil products.

Keywords: Ichyodinskoye oil field, hydrocarbons, alkanes, naphthenes, arenes, gasoline fraction, emulsions

Information about the article: Received June 13, 2019; accepted for publication August 31, 2020; available online September 30, 2020.

For citation: Belozerova OV, Kovalenko VV, Shakirova EV. Study of the composition and properties of crude oil mined at the Ichyodinskoye field *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):522–528. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-522-528>

ВВЕДЕНИЕ

Подготовка нефти на промыслах занимает промежуточное положение среди основных процессов, связанных с добычей, сбором и транспортированием товарной нефти потребителю. От того, как нефть подготовлена, зависят эффективность и надежность работы магистрального трубопровода. Перекачка вместе с нефтью 1–2% балласта в виде эмульгированных глобул воды или частиц механических примесей способствует более интенсивному коррозионному износу насосного оборудования, снижает пропускную способность нефтепроводов и повышает опасность их порывов [1].

Нефть – это сложная гетерогенная система, большая часть которой представлена кинетически устойчивыми коллоидными частицами различного размера, ядро которых состоит из керогенных включений, асфальтенов и парафиновых соединений, окруженных оболочкой высокополярных, высокоароматических, высокомолекулярных смолистых веществ [2, 3]. Нефть состоит из органических и минеральных соединений [4–7], скопления которых обнаружены во всех типах пород и могут быть открыты в самых неожиданных местах. Темпы и объемы добычи нефти и газа зависят от многих факторов как природного, так и техногенного характера. Прогноз развития флюидных систем разных типов и их режима имеет важное значение для оценки ресурсов вод, условий их эксплуатации, а также для проектирования и разработки месторождений углеводородных соединений (УВ) [8].

Восточная Сибирь сегодня – один из самых инвестиционно привлекательных регионов нашей страны [9]. На территории Иркутской области находится наибольшее число крупных нефтегазоносных бассейнов России, расположенных на Сибирской платформе [10, 11]. Ичѣдинское месторождение расположено на севере Иркутской области, занимает территорию в десятки тысяч квадратных километров и относится к Лено-Тунгускому нефтегазоносному бассейну. Месторождение было открыто в 2012 г., пробная эксплуатация ведется с 2015 г.

Цель настоящих исследований – изучение особенностей состава и свойств нефти Ичѣдинского месторождения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследованы пробы нефти Ичѣдинского месторождения. Кинетику водонефтяных эмульсий определяли на аналитической центрифуге LUMi-Fuge. Эксплуатационные характеристики прямой бензиновой фракции, в том числе октановые числа (ОЧ), определяли с помощью прибора «Октанометр» SHATOX SX-300. Углеводородный состав изучали на газовом хроматографе Agilent 7820A фирмы Agilent Technologies с селективным масс-спектрометром и детектором HP 5975. Энергия ионизации – 70 эВ. Кварцевая колонка длиной 30 м и диаметром 0,25 мм со стационарной фазой (95% диметил - 5% дифенилполисилоксан). Идентификацию соединений осуществляли с использованием библиотеки масс-спектров «NIST11».

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По своим физико-химическим свойствам нефть Ичѣдинского месторождения относится к марке Brent и обладает уникальными особенностями, которые имеют большое значение при выборе поставщиков и потребителей, например ее температура застывания равна минус 45 °С (табл. 1).

Фракционный состав нефти определен по ГОСТ 2177-99 с целью построения кривой истинных температур кипения (ИТК) и определения количественного состава фракций.

Одной из ключевых характеристик нефти по ГОСТ Р 51858-2002 предусмотрен фракционный состав. По результатам наших исследований, в нефти Ичѣдинского месторождения доля светлых дистиллятов с температурой выкипания до 200 °С составила до 30% об., фракции, выкипающие до 300 °С, – 47,5% об. (относятся к типу легких нефтей). Остаток после отбора светлых дистиллятов составил 40,5% об. График атмосферной перегонки нефти до 350 °С показан на рис. 1.

Таблица 1. Физико-химические свойства нефти Ичѣдинского месторождения
Table 1. Physical and chemical properties of oil from the Ichyodinskoye pool

Показатель	Значение	Стандарт
Плотность при 20 °С, кг/м ³	808,0	ГОСТ 3900-85
Температура застывания, °С	-45,0	ГОСТ 20287-91
Содержание, % масс.:		
твердых парафинов	1,15	ГОСТ 11851-85
серы	0,1114	ГОСТ Р 51947-2002

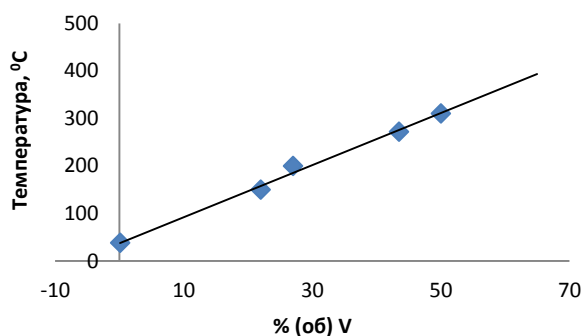


Рис. 1. Фракционный состав нефти Ичѣдинского месторождения

Fig. 1. Fractional composition of Ichyadinskoy oil

Анализ полученных данных показал, что исследуемая нефть характеризуется достаточно высоким содержанием легких фракций, что привело нас к более детальному анализу бензиновой фракции. Потенциальное содержание товарных фракций определено по кривой ИТК и представлено в табл. 2.

Таблица 2. Результаты разгонки нефти Ичѣдинского месторождения

Table 2. The results of the distillation of Ichedinskoye oil

Пределы выкипания фракций, °C	Выход, % об.
Бензиновые:	
н.к.–120	14,0
60–160	16,0
н.к.–00	30,0
Дизельные:	
140–350	38,5
180–350	31,5

Примечание. Н.к. – температура начала кипения.

Для бензиновой фракции 38–200 °C были определены эксплуатационные характеристики: октановые числа, плотность и содержание общей серы (табл. 3).

Таблица 3. Эксплуатационные характеристики бензиновой фракции

Table 3. Performance characteristics of the gasoline fraction

Параметр	Значение
Октановое число, моторный метод (ОЧММ)	46,5
Октановое число, исследовательский метод (ОЧИМ)	53,9
Плотность при 20 °C, кг/м ³	745,0
Содержание общей серы, % масс.	0,0101

Фракция 38–200 °C не удовлетворяет требованиям ГОСТ Р 51105-97 по детонационной стойкости автомобильных бензинов, тем не менее базовая фракция (60–160°C), используемая для получения автобензинов, составляет 16% об., а низкое содержание серы позволяет с

меньшими затратами применять гидроочистку [12, 13]. При компаундировании фракции оксигенатами, концентратом ароматических углеводородов и др. может быть получен товарный бензин марок АИ-92 и АИ-95 [14–16].

При исследовании углеводородного состава бензиновой фракции идентифицированы 85 индивидуальных углеводородов (УВ) от 2-метилпропана (1,49%) до тетрадекана (1,71%). Метановых УВ содержится более 50%, количество нормальных алканов в них заметно меньше – в 2–3 раза ($\approx 2,77$ раза), чем разветвленных. Количественное соотношение моно-, ди- и тризамещенных структур составляет 2 : 4 : 1 соответственно. В группе нафтеновых соединений бензиновой фракции преобладают циклогексановые структуры, причем соотношение моно- : ди- : тризамещенных циклогексанов составляет 2 : 1,4 : 1 соответственно. Среди ароматических углеводородов большая доля приходится на моноциклические соединения.

Относительное содержание идентифицированных соединений вычисляли по площадям пиков без корректирующих коэффициентов чувствительности.

Полученные данные по индивидуальному углеводородному составу широкой бензиновой фракции позволили рассчитать ее групповой состав, который представлен следующими УВ, % отн.: алкановые – 53,12; нафтеновые – 27,21; ароматические – 18,45 (табл. 4).

Бензины, в которых преобладают парафиновые углеводороды, характеризуются низкими октановыми числами. Тем не менее, например, прямогонный бензин легкой нефти Вознесенского месторождения, богатый парафинами, отличается высоким октановым числом.

Одной из особенностей нефти Ичѣдинского месторождения является ее неспособность образовывать устойчивые эмульсии, что связано, возможно, с низким содержанием парафинов.

Устойчивость – одна из важнейших характеристик нефтяных дисперсных систем, которая определяет эффективность проведения многих нефтехимических процессов, а также получения различных нефтепродуктов, склонных к расслоению, без значительного изменения качества в процессе хранения и применения [17, 18].

Нами проведены опыты с искусственной эмульсией с добавлением пластовой воды к нефти с получением 30% обводненности. Модель пластовых вод представляет собой попутные воды, отобранные с Осинского продуктивного горизонта Ичѣдинского нефтяного месторождения. Общая минерализация составляет 455300 мг/дм³, воды относятся к хлоридно-кальциевому типу (по В.А. Сулину), имеют высокую минерализацию и плотность. Образец водонефтяной смеси общим объемом 100 мл тщательно перемешивался лопастной мешалкой со

Таблица 4. Групповой углеводородный состав широкой бензиновой фракции от температуры начала кипения до 200 °С

Table 4. Group hydrocarbon composition of a wide gasoline fraction on temperature the beginning of boiling up to 200 °С

Число атомов углерода	Содержание на фракцию н.к.-200 °С, % отн.					
	Всего	Алканы		Нафтенy	Арены	Неизвестные
		изостроения	н-строения			
C ₄	1,49	1,49	–	–	–	–
C ₅	5,23	2,31	2,92	–	–	–
C ₆	6,82	2,31	4,51	–	–	–
C ₇	15,49	0,39	–	15,1	–	–
C ₈	24,13	8,19	–	7,59	7,54	0,81
C ₉	11,68	3,87	–	4,40	3,41	–
C ₁₀	20,22	14,93	4,95	0,12	–	0,22
C ₁₁	2,85	2,85	–	–	–	–
C ₁₂	2,38	0,37	–	–	1,82	0,19
C ₁₃	0,62	0,62	–	–	–	–
C ₁₄	9,09	1,70	1,71	–	5,68	–
Всего	100	39,03	14,09	27,21	18,45	1,22

скоростью более 600 об./мин в течение 10 мин, тем самым обеспечивая различную дисперсность приготавливаемой эмульсии. Готовая эмульсия анализировалась двумя способами. Эмульсия исследовалась в процессе гравитационного отстаивания в течение 120 мин при температуре 50 °С. Уже через 60 мин образец показал четкое расслоение. Объем нижнего слоя (вода) составил 30% об. Второй способ представлял собой исследование эмульсии с помощью аналитической центрифуги LUMiFuge, мгновенно измеряющей затухание света, проходящего по всей длине образца, используя инновационную технологию STEP. Технология STEP позволяет непрерывно измерять интенсивность света, проходящего через всю высоту кюветы с образцом. Прибор позволяет быстро и объективно оценить кинетику процессов. Процесс проводили при температуре 50 °С, скорости перемешивания 2000 об./мин в течение 16 мин, light factor – 0,25. По результатам проведенных исследований получена зависимость положения границы раздела фаз эмульсии в определенный момент времени, что позволило в режиме реального времени наблюдать за процессами, происходящими в дисперсной системе. На рис. 2 графически представлена кинетика (седиментация) водонефтяной эмульсии. Эмульсия разделилась на два слоя – нефть и воду. Данная дисперсная система абсолютно просвечиваемая, на участке 115–130 мм кюветы отчетливо видна отделившаяся вода. Степень поведения различных образцов эмульсий зависит как от ее состава, так и от температуры среды.

Определение «истинной» устойчивости нефтяных дисперсных систем легкой нефти возможно в тех редких случаях, когда седиментационное разделение в системе достигается под действием центробежных сил в отсутствие растворителя. Одна из главных проблем извлечения пластового флюида и его транспортировки – коррозионный износ металлических труб и

наземного оборудования. В работах [19, 20] показано, что основными из веществ, вызывающих коррозию, являются соединения серы и вода. Использование нефти Ичѣдинского месторождения, не образующей устойчивых эмульсий и содержащей в своем составе малое количество общей серы (см. табл. 1), снизит коррозию промышленного оборудования, что в свою очередь приведет к меньшим затратам на ее добычу, подготовку и поставку потребителю.

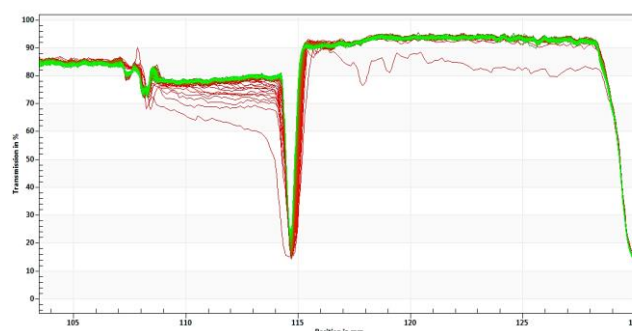


Рис. 2. Расслоение искусственной водонефтяной эмульсии Ичѣдинского месторождения во временном интервале

Fig. 2. Stratification of the artificial water-oil emulsion of the Ichedinskoe oil pool in time interval

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования установлено, что нефть Ичѣдинского месторождения относится к легким малопарафинистым нефтям и не образует с водой устойчивой эмульсии.

В дальнейшем необходимо исследовать образующиеся водонефтяные эмульсии в различных температурных условиях с целью детального представления механизма стабилизации и разрушения нефтяных дисперсных систем, что поможет в оптимизации технологии подготовки и переработки нефти.

Интересен и тот факт, что в химическом со-

стае бензиновой фракции преобладают алканы изостроения, а эксплуатационный показатель октанового числа низкий, что требует более детального изучения. Поскольку данная нефть малосернистая, легкая, с высоким содержанием светлых дистиллятов, ее относят к марке Brent. На нефти таких марок приходится большая часть мирового спроса, что позволяет направлять их на переработку по топливному варианту.

Разведанные в пределах Сибирского феде-

рального округа запасы углеводородного сырья позволяют рассматривать Восточную Сибирь в качестве региона, перспективного для создания современных центров добычи и переработки нефти, газа и газоконденсата. Ичѣдинское месторождение является значимым не только для Иркутской нефтяной компании, но и для всего топливно-энергетического комплекса нашей страны.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Позднышев Г.Н. Стабилизация и разрушение нефтяных эмульсий. М.: Недра, 1982. 221 с.
2. Тронов В.П. Промысловая подготовка нефти. Казань: Фэн, 2000. 416 с.
3. Титов В.И., Жданов С.А. Особенности состава и свойств остаточных нефтей (обзор) // Нефтяное хозяйство. 1989. N 4. С. 28–32.
4. Камьянов В.Ф., Аксенов В.С., Титов В.И. Гетероатомные компоненты нефти. Новосибирск: Наука, 1983. 238 с.
5. Данилов В.И., Усачев Б.П., Усачев В.Н. Об изменении нефтей в залежах в процессе их разработки. Проблемы освоения нефтяных месторождений с аномальными свойствами. Куйбышев: Гипровостокнефть, 1983. 126 с.
6. Бахтизин Р.Н., Каримов Р.М., Мастобаев Б.Н. Влияние высокомолекулярных компонентов на реологические свойства в зависимости от структурно-группового и фракционного состава нефти // SOCAR Proceedings. 2016. N 1. С. 42–50.
7. Надилов Н.К., Котова А.В., Камьянов В.Ф. Новые нефти Казахстана и их использование: Металлы в нефтях. Алма-Ата: Наука, 1984. 448 с.
8. Абукова Л.А., Карцев А.А. Флюидные системы осадочных нефтегазоносных бассейнов (типы, основные процессы, пространственное распространение) // Отечественная геология. 1999. N 2. С. 11–16.
9. Махмудова М.М., Королева А.М., Шакирова Э.В., Ефименко Е.Л. Инвестиционная привлекательность Северного региона // Известия высших учебных заведений. Социология. Экономика. Политика. 2016. N 1 (48). С. 27–32.
10. Белонин М.Д., Арчegov В.Б., Григоренко Ю.Н., Якуцени В.П., Маргулис Л.С. Газовый потенциал Восточной Сибири – основа энергетических проектов в Азиатско-Тихоокеанском альянсе. В сб.: Нефтегазовая геология на рубеже веков. Прогноз, поиск, разведка и освоение месторождений. Т. 3. Сырьевая база нефтяной промышленности России, её структура и перспективы развития. СПб.: Изд-во ВНИГРИ, 1999. С. 89–98.
11. Averkina E.V., Shakirova E.V. Specifics of drilling wells in the abnormally-high-pressure rock beds in the oil-and-gas fields of Eastern Siberia // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2019. Vol. 229. 6 p. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/229/1/012032>
12. Алиев Р.Р., Ёлшин Н.А. Стратегия усовершенствования процесса гидроочистки нефтяных фракций // Нефтепереработка и нефтехимия. Научно-технические достижения и передовой опыт. 2013. N 4. С. 8–10.
13. Константинов Г.И., Курдюмов С.С., Максимов Ю.В., Бухтенко О.В., Цодиков М.В. Бифункциональный катализатор парового риформинга метана, устойчивый к H₂S: активность и структурная эволюция // Катализ в промышленности. 2017. Т. 17. N 3. С. 201–209. <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2017-3-201-209>
14. Лукьянова Л.И., Фидурова С.Н., Тараканов Г.В., Попадин Н.В. Методика расчета рецептур смешения компонентов при производстве газоконденсатных автомобильных бензинов // Нефтепереработка и нефтехимия. Научно-технические достижения и передовой опыт. 2012. N 8. С. 8–11.
15. Урматов Р.К., Салахов И.И. Разработка рецептуры автомобильных бензинов марок АИ-92 и АИ-95 // Аллея науки. 2018. Т. 6. N 5 (21). С. 715–721. [Электронный ресурс]. URL: [https://alleyscience.ru/domains_data/files/514MAY2018/\(20.10.2019\)](https://alleyscience.ru/domains_data/files/514MAY2018/(20.10.2019)).
16. Солопова А.А., Долганов И.М. Оптимизация процесса компаундирования товарных бензинов с учетом изменения состава вовлекаемых компонентов // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XIX Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых им. проф. Л.П. Кулѣва (г. Томск, 21–24 мая 2018 г.). Томск: Из-во ТПУ, 2018. С. 389–390.
17. Сафиева Р.З. Физикохимия нефти. Физико-химические основы технологии переработки нефти. М.: Химия, 1998. 448 с.
18. Физико-химические свойства нефтяных дисперсных систем и нефтегазовые технологии: сб. статей / под ред. Р.З. Сафиевой, Р.З. Сюняева. Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2007. 580 с.
19. Улиг Г.Г., Ревн Р.У. Коррозия и борьба с ней. Введение в коррозионную науку и технику / пер. с англ.; под ред. А.М. Сухотина. Л.: Химия, 1989.
20. Ибрагимов Н.Г., Шаталов А.Н., Сахабутдинов Р.З., Шипилов Д.Д., Ануфриев А.А., Гарифуллин Р.М. Повышение эффективности без-

реагентных методов очистки нефти от сероводорода // Нефтяное хозяйство. 2017. N 6. С. 58–61.

<https://doi.org/10.24887/0028-2448-2017-6-58-61>

REFERENCES

1. Pozdnyshv GN. *Stabilization and destruction of oil emulsions*. Moscow: Nedra; 1982. 223 p. (In Russian)
2. Tronov VP. *Field preparation of oil*. Kazan: Fen; 2000. 416 p. (In Russian)
3. Titov VI, Zhdanov SA. Features of the composition and properties of residual oils (review). *Neftyanoe hozyaistvo = Oil industry*. 1989;4:28–32. (In Russian)
4. Kamyranov VF, Aksenov VS, Titov VI. *Heteroatomic components of crude oil*. Novosibirsk: Nauka; 1983. 238 p. (In Russian)
5. Danilov VI, Usachev BP, Usachev VN. *On the change in oils in deposits in the course of their development. Problems of development of oil fields with anomalous properties*. Kuibyshev: Giprovostokneft'; 1983. 126 p. (In Russian)
6. Bahtizin RN, Karimov RM, Mastobaev BN. The Effect of High-Molecular Components on Flow Properties, Depending on the Structural-Group and Fractional Oil Content. 2016;1:42–50. (In Russian)
7. Nadirov NK, Kotova AV, Kamyranov VF. *New oils of Kazakhstan and their use: Metals in oils*. Alma-Ata: Science; 1984. 448 p. (In Russian)
8. Abukova LA, Kartsev AA. Fluid systems of sedimentary oil and gas basins (types, basic processes, spatial distribution). *Otechestvennaya Geologiya = National Geology*. 1999;2:11–16. (In Russian)
9. Makhmudova MM, Koroleva AM, Shakirova EV, Efimenko EL. Investment attractiveness of the Northern region. *Izvestiya vysshih uchebnyh zavedenii. Sociologiya. Ekonomika. Politika = Proceedings of Higher Educational Institutions. Sociology. Economy. Politics*. 2016;1:27–32. (In Russian)
10. Belonin MD, Arhegov VB, Grigorenko YuN, Yakutseni VP, Margulis LS. *Gas potential of Eastern Siberia and the Far East – the basis for energy projects in the Asia-Pacific alliance. Petroleum Geology at the turn of the century. Forecast, prospecting, exploration and development of fields*. Vol. 3. *Resources base of Russian oil industry, its structure and development prospects*. St Petersburg: Izdatel'stvo Vserossiiskogo neftyanogo nauchno-issledovatel'skogo geologorazvedochnogo instituta; 1999. P. 89–98. (In Russian)
11. Averkina EV, Shakirova EV. Specifics of drilling wells in the abnormally-high-pressure rock beds in the oil-and-gas fields of Eastern Siberia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2019;229. 6 p. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/229/1/012032>
12. Aliev RR, Yolshin NA. The strategy of improving the hydrotreating process of oil fractions. *Neftpererabotka i neftekhimiya. Nauchno-tekhnichekie dostizheniya i peredovoi opyt = Refining oil and petrochemistry. Scientific and technical achievements and best practices*. 2013;4:8–10. (In Russian)
13. Konstantinov GI, Kurdyumov SS, Maksimov YuV., Bukhtenko OV, Tsodikov MV. Bifunctional catalyst of methane steam reforming, resistant to H₂S: activity and structural evolution. *Kataliz v promyshlennosti = Catalysis in industry*. 2017;17(3):201–209. (In Russian) <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2017-3-201-209>
14. Lukyanova L.I., Fidurova S.N., Tarakanov G.V., Popadin N.V. Method for calculating compounding formulas for mixing components in the production of gas-condensate automobile gasoline. *Neftpererabotka i neftekhimiya. Nauchnotekhnicheskie dostizheniya i peredovoi opyt = Refining oil and petrochemistry. Scientific and technical achievements and best practices*. 2012;8:8–11. (In Russian)
15. Urmatov RK, Salakhov II. Development of recipes of motor gasoline AR-92 and AR-95. *Alleya nauki*. 2018;6(5):715–721. Available from: https://alleyscience.ru/domains_data/files/514MAY2018/ [Accessed 22th October 2019]. (In Russian)
16. Solopova AA, Dolganov IM. Optimization of the compounding process of commercial gasolines taking into account changes in the composition of the components involved. In: *Chemistry and chemical technology in the XXI century: Proceedings of the XIX International Scientific and Practical Conference named after professor L.P. Kulev of students and young scientists*. 21–24 May 2018, Tomsk. Tomsk: Izdatel'stvo Tomskogo politekhnicheskogo universiteta, 2018, p. 389–390. (In Russian)
17. Safieva RZ. *Physicochemistry of oil. Physical and chemical foundations of oil refining technology*. Moscow: Khimiya; 1998. 448 p. (In Russian)
18. Safieva RZ, Syunyaev RZ. *Physical and chemical properties of oil dispersed systems and oil and gas technologies*. Izhevsk: Institut komp'yuternykh issledovaniy; 2007. 580 p. (In Russian)
19. Uhlig HH, Revie RW. *Corrosion and corrosion control. An introduction to corrosion science and engineering*. USA, 1985, 436 p. (Russ. ed.: Ulig HH, Revi RU. *Korroziya i bor'ba s nei. Vvedenie v korroziionnyu nauku i tekhniku*. Leningrad: Khimiya; 1989. 456 p.)
20. Ibragimov NG, Shatalov AN, Sakhabutdinov RZ, Shipilov DD, Anufriev AA, Garifullin RΦM. Improving the efficiency of reagent-free methods for purifying oil from hydrogen sulfide. *Neftyanoe hozyaistvo = Oil industry*. 2017;6:58–61. (In Russian) <https://doi.org/10.24887/0028-2448-2017-6-58-61>

Критерии авторства

Белозерова О.В., Коваленко В.В., Шакирова Э.В. выполнили экспериментальную работу, на основании полученных результатов провели обобщение и написали рукопись. Белозерова О.В., Коваленко В.В., Шакирова Э.В. имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Белозерова Ольга Викторовна,
к.х.н., доцент кафедры химической технологии,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
✉ e-mail: ovbelozerova@list.ru

Коваленко Валентин Валерьевич,
бакалавр,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: valentine-99@bk.ru

Шакирова Эльвира Венеровна,
к.п.н., доцент кафедры нефтегазового дела,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: viva160@mail.ru

Contribution

Olga V. Belozerova, Valentin V. Kovalenko, Elvira V. Shakirova carried out the experimental work, on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. Olga V. Belozerova, Valentin V. Kovalenko, Elvira V. Shakirova have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict of interests

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

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

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Olga V. Belozerova,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Department of Chemical Technology,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
✉ e-mail: ovbelozerova@list.ru

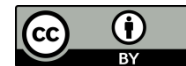
Valentin V. Kovalenko,
Bachelor,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: valentine-99@bk.ru

Elvira V. Shakirova
Cand. Sci. (Political) Associate Professor,
Department of Oil and Gas Business,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: viva160@mail.ru

Оригинальная статья / Original article

УДК 678.743.22

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-529-535>



ИК-спектроскопия и рентгенография промышленного суспензионного поливинилхлорида

© В.В. Баяндин, Н.С. Шаглаева, Т.А. Подгорбунская, Н.Д. Лукьянов, Н.В. Минаев, С.С. Макаров

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

Резюме: Объемы мирового производства поливинилхлорида уступают только полиолефинам. Поливинилхлорид может перерабатываться почти всеми известными методами. Он обладает высокой прочностью, хорошими изоляционными свойствами, устойчив к кислотам, окислителям и растворителям. В то же время он имеет очень высокую вязкость расплава и недостаточно устойчив при температурах переработки в изделия: выделяющийся при его нагревании хлорид водорода катализирует дальнейший процесс разложения полимера. Поскольку температура размягчения поливинилхлорида оказывается выше температуры его разложения, он не может перерабатываться в чистом виде. Все материалы на его основе являются композиционными. Варьируя состав композиций, можно получать пластические массы как очень мягкие (пластикаты), так и жесткие (винилпласты). Свойства полимерных изделий на основе поливинилхлорида во многом будут определяться структурой и морфологией полимера. Авторами настоящей работы впервые подробно исследованы свойства промышленного суспензионного поливинилхлорида (АО «Саянскхимпласт», Иркутская область). Молекулярная масса полимера, определенная вискозиметрическим методом, составляет $1,0 \cdot 10^6$. Начало потери массы поливинилхлорида при проведении термогравиметрического анализа наблюдалось при температуре 160 °С. Осуществлена полная расшифровка ИК-спектра полимера и установлено, что исследуемый поливинилхлорид не содержит посторонних веществ в полимере (примеси стабилизаторов, эмульгаторов и присадок). Дифракционная кривая полимера качественно аналогична дифракционным кривым частично кристаллических полимеров и содержит два аморфных гало при углах рассеяния $24^\circ 30'$ и $39^\circ 30'$ и группу кристаллических пиков над ними. Также определена степень кристалличности поливинилхлорида и предложены механизмы образования его регулярного и нерегулярного строения.

Ключевые слова: суспензионный промышленный поливинилхлорид, молекулярная масса, инфракрасная спектроскопия, дифракционная кривая

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-08-00342).

Информация о статье: Дата поступления 27 ноября 2019 г.; дата принятия к печати 31 августа 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2020 г.

Для цитирования: Баяндин В.В., Шаглаева Н.С., Подгорбунская Т.А., Лукьянов Н.Д., Минаев Н.В., Макаров С.С. ИК-спектроскопия и рентгенография промышленного суспензионного поливинилхлорида. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 3. С. 529–535. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-529-535>

IR spectroscopy and X-ray diffraction analysis of industrial polyvinyl chloride suspension

Victor V. Bayandin, Nina S. Shaglaeva, Tatiana A. Podgorbunskaya,
Nikita D. Lukyanov, Nikolai V. Minaev, Svyatoslav S. Makarov

Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation

Abstract: In terms of the contemporary plastic industry, world production of polyvinyl chloride is second only to polyolefins. Recyclable by almost all known methods, polyvinyl chloride offers high strength, good insulating properties, as well as resistance to acids, oxidising agents and solvents. At the same time, the ability to process polyvinyl chloride into products is limited by its lack of stability at high melt viscosity temperatures, since hydrogen chloride released during its heating catalyses further process of polymer decomposition. Thus, due to the softening temperature of polyvinyl chloride being higher than its decomposition temperature, it cannot be processed in its pure form. Consequently, functional polyvinyl chloride-based materials

tend to be composites. By varying the composition of mixtures, plastic masses characterised by either very soft (plastic compounds) or hard (vinyl plastics) structures can be obtained. The properties of polyvinyl chloride-based polymer products are largely determined by the structure and morphology of the polymer. In the present work, the properties of industrial suspension polyvinyl chloride (Sayanskkhimplast JSC, Irkutsk Oblast) were studied in detail for the first time. The molecular weight of the polymer determined by the viscometric method was 1.0·10⁶. Thermogravimetric analysis showed that polyvinyl chloride mass loss started to occur at 160 °C. Following the complete IR band assignment of the polymer, the polyvinyl chloride under study was established to contain no foreign substances (impurities of stabilisers, emulsifiers and additives). The diffraction curve of the polymer was established to be qualitatively similar to equivalent partially crystalline polymers. Two amorphous halos were detected at 2θ of 24° 30' and 39° 30' below a group of crystalline peaks. The crystallinity degree of polyvinyl chloride was determined and mechanisms for the formation of its regular and irregular structure were proposed.

Keywords: suspension industrial polyvinyl chloride, molecular weight, infrared spectroscopy, diffraction curve

Acknowledgment: This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (no. 19-08-00342).

Information about the article: Received November 27, 2019; accepted for publication August 31, 2020; available online September 30, 2020.

For citation: Bayandin VV, Shaglaeva NS, Podgorbunskaya TA, Lukyanov ND, Minaev NV, Makarov CC. IR spectroscopy and X-ray diffraction analysis of industrial polyvinyl chloride suspension. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):529–535. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-529-535>

ВВЕДЕНИЕ

Мировой рынок поливинилхлорида (ПВХ) является одним из наиболее динамично развивающихся рынков полимеров. По данным компании «Nagiman», мировые мощности по производству ПВХ с 2000 по 2006 г. выросли с 30 до 40 млн т/год соответственно, в 2007 г. они составили более 45 млн т, а к 2010 г. их рост прогнозировался (до кризиса 2008 г.) до 60 млн т. ПВХ в России является дефицитным продуктом. Так, в 2013 г. его производство составило лишь 604 тыс. т, тогда как потребление – 967 тыс. т [1, 2].

Полимер выпускается в двух основных видах в зависимости от особенностей производства и рынков потребления: суспензионный (ПВХ-с) и эмульсионный (ПВХ-э).

Основными сферами применения ПВХ является изготовление оконных профилей, погонажных изделий, пленок, труб, фитингов, различных покрытий, медицинских инструментов и других изделий [2–5]. Основной и серьезный недостаток полимера – невозможность переработки ПВХ в чистом виде, так как температура переработки находится выше температуры его разложения [6–8]. Это вынуждает вводить в ПВХ стабилизаторы (термостабилизаторы), пластификаторы, модификаторы, промолотые плавители, смазки, наполнители [9–12]. Характеристики исходного ПВХ (молекулярная масса, строение полимерной цепи, температура разложения, степень кристалличности полимера и др.) в значительной мере определяют поведение полимера при его переработке и влияют на свойства готового изделия.

Целью данной работы являлось исследование свойств промышленного суспензионного

ПВХ производства АО «Саянскимпласт» (Иркутская область).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ПВХ — промышленный суспензионный полимер. Характеристическую вязкость $[\eta]$ ПВХ раствора измеряли в циклогексаноне с использованием вискозиметра Убеллоде при 25 °C. Значение характеристической вязкости $[\eta]$ для исследуемого ПВХ составило 1,1 дл·г⁻¹. Молекулярную массу ПВХ ($1,0 \cdot 10^6$) вычисляли, подставляя полученные значения $[\eta]$, K и α в уравнение Марка – Куна – Хаувинка:

$$[\eta] = K \cdot M^\alpha,$$

где K и α – константы для данной системы полимер – растворитель при температуре 25 °C, их значения ($2,4 \cdot 10^{-5}$ и 0,77 соответственно) взяты из работы [13].

Элементный анализ продуктов реакции проводили на газоанализаторе фирмы «Thermo Finnigan». Найдено, %: С – 38,2; Н – 4,8; Cl – 57,0. Вычислено, %: С – 38,4; Н – 4,8; Cl – 56,8.

Кривые термогравиметрического анализа образцов снимали на дериватографе Q-1500 (МОН, Венгрия), максимальная температура – 850 °C, скорость нагрева на воздухе – 10 °C мин⁻¹.

ИК-спектры сополимеров получены на спектрометрах Specord IR-75 и Bruker IFS-25 в таблетках КВг и в вазелиновом масле.

Дифракционные кривые сняты на установке XRD-7000 фирмы Shimadzu (Япония) в области углов рассеяния $2\theta = 0-70$ °C. Фокусировка проводилась по Брэггу – Brentано [14].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Суспензионный промышленный ПВХ производства АО «Саянскимпласт» представляет собой твердый продукт белого цвета, хорошо растворимый в трихлорбензоле, дихлорэтано, диметилформамиде, диметилсульфоксиде и циклогексаноне.

Начальная температура разложения ПВХ – 160 °С, при 250 °С потеря массы полимера составляет 50%, а при температуре 300 °С указанная величина увеличивается до ~85% (рис. 1).

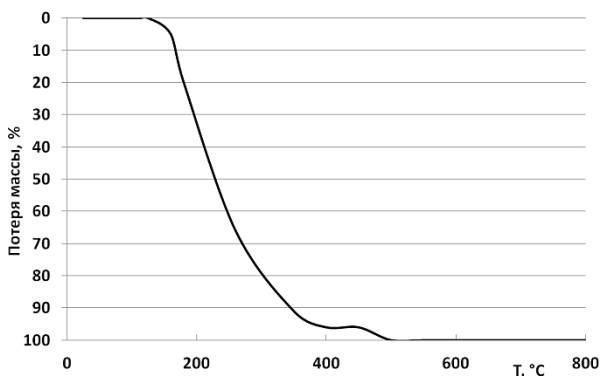


Рис. 1. Кривая потери массы суспензионного поливинилхлорида

Fig. 1. Mass loss curve of suspension polyvinyl chloride

Полная расшифровка ИК-спектра полимера (рис. 2) проведена на основании анализа литературных данных [15–17]. Характеристические полосы ПВХ приведены в таблице.

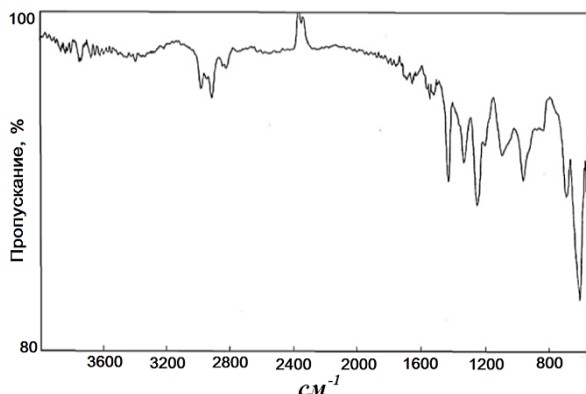


Рис. 2. ИК-спектр суспензионного поливинилхлорида

Fig. 2. IR spectrum of suspension polyvinyl chloride

Следует отметить присутствие триплета в области с частотами 2973, 2939 и 2906 cm^{-1} , который относится к остаточным алифатическим CH_2 - и CH -группам ПВХ и полос поглощения валентных колебаний связи $\text{C}-\text{Cl}$, регистрируемые при 611 и 678 cm^{-1} .

На основании анализа ИК-спектра можно сделать заключение, что исследуемый ПВХ не содержит посторонних веществ в полимере

(примеси стабилизаторов, эмульгаторов и при-садок).

Полосы поглощения в ИК-спектре суспензионного поливинилхлорида

Absorption bands in the IR spectrum of suspension polyvinyl chloride

Волновое число (измеренное), cm^{-1}	Колебание и тип симметрии
2973	$\nu(\text{CH})$, A_1 , B_1
2939	$\nu_a(\text{CH}_2)$, B_1
2907	$\nu_s(\text{CH}_2)$, A_1
2838	$\nu_s(\text{CH}_2)$, A_1
2821	$\nu_s(\text{CH}_2)$, A_1
1430	$\delta(\text{CH}_2)$, A_1
1332	$\gamma_t(\text{CH}_2) + \delta(\text{CH})$, A_1
1248	$\delta(\text{CH})$
1093	$\gamma_w(\text{CH})$
960	$\gamma_r(\text{CH}_2)$, B_1
836	$\gamma_r(\text{CH}_2)$, B_2
691	$\nu(\text{CCl})$
611	$\nu(\text{CCl})$
559	$\nu(\text{CCl})$

Дифракционная кривая ПВХ, $I_1(\theta)$ (рис. 3, кривая 1) построена путем сплайновой интерполяции по экспериментальным данным в программе MathCad. Дифракционная кривая ПВХ имеет четыре аморфных гало при углах рассеяния $19^\circ 10'$, 24° , $35^\circ 40'$ и $40^\circ 2\theta$ и группу кристаллических пиков над ними. Точки кривой при углах 12 , $20,4$, $30-34$, $36,7$, $49^\circ 2\theta$ принимаются за точки аморфного гало. По данным точкам аналогично, методом сплайновой интерполяции, строится кривая $I_2(\theta)$ (рис. 3, кривая 2). Точки полученной дифрактограммы при 12 и $49^\circ 2\theta$ соединяются прямой линией, служащей основанием аморфного гало (рис. 3, кривая 3). Уравнение этой линии можно выразить следующим равенством:

$$I_3(\theta) = 117,811 - 0,568 \cdot \theta.$$

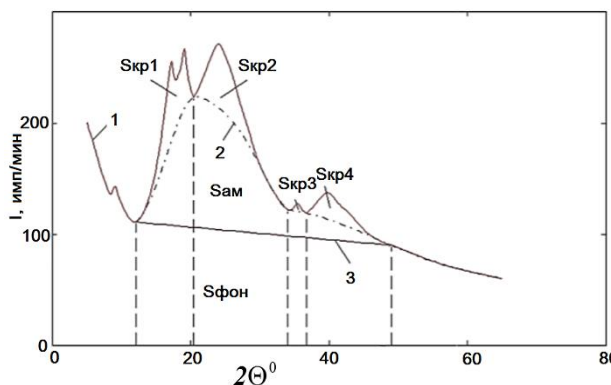


Рис. 3. Дифрактограмма суспензионного поливинилхлорида

Fig. 3. Diffraction pattern of suspension polyvinyl chloride

Для определения степени кристалличности полимера необходимо определить площади кристаллических рефлексов ($\text{Skp}1-\text{Skp}4$), заключен-

ных между линией дифрактограммы (см. рис. 3, кривая 1) и верхней границей гало (см. рис. 3, кривая 2), а также площадь аморфной составляющей $S_{ам}$, заключенной между верхней границей гало и основанием (см. рис. 3, кривая 3). Поскольку кривые 1 и 2 имеют математическое описание в виде интерполяционной функции, а кривая 3 – в виде линейной функции, то их можно интегрировать на любых заданных интервалах в рамках исследованного диапазона, используя программу MathCad.

Таким образом, площади кристаллических рефлексов равны:

$$S_{кр1} = \int_{12}^{20,4} I_1(\theta) - \int_{12}^{20,4} I_2(\theta) = 1623,5 - 1403,9 = 219,6;$$

$$S_{кр2} = \int_{20,4}^{34} I_1(\theta) - \int_{20,4}^{34} I_2(\theta) = 2768,8 - 2498,5 = 270,3;$$

$$S_{кр3} = \int_{34}^{36,7} I_1(\theta) - \int_{34}^{36,7} I_2(\theta) = 333,3 - 300,6 = 32,7;$$

$$S_{кр4} = \int_{36,7}^{49} I_1(\theta) - \int_{36,7}^{49} I_2(\theta) = 1413,2 - 1301,8 = 111,4;$$

$$S_{кр} = S_{кр1} + S_{кр2} + S_{кр3} + S_{кр4} = 219,6 + 270,3 + 32,7 + 111,4 = 634,0.$$

Далее определили площадь аморфной составляющей:

$$S_{ам} = \int_{12}^{49} I_2(\theta) - \int_{12}^{49} I_3(\theta) = 5504,8 - 3718,5 = 1786,3.$$

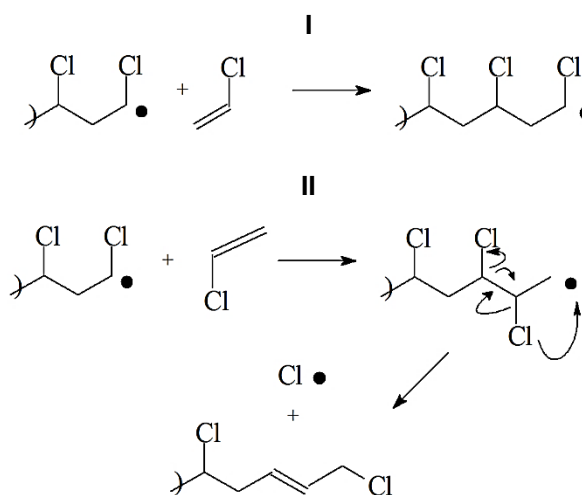
Определение степени кристалличности ПВХ проводили на основе закона сохранения интегральной интенсивности рассеяния и различного рода допущениях при разделении на «кристаллические» ($S_{кр}$) и «аморфные» ($S_{ам}$) составляющие [18]. Поэтому степень кристалличности рассчитывается по формуле:

$$X = S_{кр} / (S_{кр} + S_{ам}) = 634 / (634 + 1786,3) = 0,2619 \text{ или } 26,19\%.$$

Обнаруженные рефлексы на рентгенограммах можно объяснить наличием синдиотактических участков в полимерной цепи. Известно, что

кристаллический ПВХ обладает повышенной степенью синдиотактичности, о чем свидетельствует наличие интенсивной полосы в области 611 см^{-1} и слабой полосы при 691 см^{-1} [19], причем кристаллизуются могут те макромолекулы ПВХ, в которых имеются синдиотактические участки, содержащие не менее 12 мономерных звеньев [18, 20].

При радикальной суспензионной полимеризации ПВХ в промышленности возможны два маршрута образования последовательностей мономерных звеньев винилхлорида: «голова к голове» (I) и «голова к хвосту» (II):



Первый путь способствует получению ПВХ с достаточно длинными отрезками цепей, имеющих регулярное строение, а второй – получению нерегулярного полимера, который в процессе переработки может подвергаться дегидрохлорированию. Поскольку в исследуемом промышленном ПВХ наблюдается устойчивое существование аморфной и кристаллической фаз, то процесс образования полимера осуществляется по двум маршрутам. Существование аморфной и кристаллической фаз в исследуемом промышленном ПВХ можно объяснить тем, что процесс образования полимера осуществляется по двум маршрутам.

ВЫВОДЫ

Впервые определена степень кристалличности суспензионного ПВХ производства АО «Саянскимпласт» методом рентгенографии.

Предложен новый способ построения рентгеновской дифракционной кривой путем сплайновой интерполяции по экспериментальным данным в программе MathCad.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Braun D. Poly(vinyl chloride) on the way from the 19th century to the 21st century // Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry. 2004.

Vol. 42. Issue 3. P. 578–586. <https://doi.org/10.1002/pola.10906>

2. Киячков А.А. Производство ПВХ в России:

состояние и перспективы // Пластикс. 2014. N 5 (134). С. 42–47.

3. Wypych G. *PVC Degradation and Stabilisation*. 3rd Edition. Toronto: ChemTec Publishing, 2015. 441 p.

4. Шаглаева Н.С., Султангареев Р.Г., Орхокова Е.А., Прозорова Г.Ф., Дмитриева Г.В., Дамбинова А.С. [и др.]. Протонпроводящие мембраны на основе модифицированного поливинилхлорида // Мембраны и мембранные технологии. 2011. Т. 1. N 3. С. 213–219. <https://doi.org/10.1134/S0965544111080093>

5. Choi J.K., Kim Y.W., Koh J.H., Kim J.H. Proton conducting membranes based on poly(vinyl chloride) graft copolymer electrolytes // *Polymers for Advanced Technologies*. 2008. Vol. 19. Issue 7. P. 915–921. <https://doi.org/10.1002/pat1060>

6. Krongauz V.V., Lee Y., Bourassa A. Kinetics of thermal degradation of poly(vinyl chloride) // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2011. Vol. 106. P. 139–149. <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1703-6>

7. Liu J., Lv Y., Luo Z., Wang H., Wei Z. Molecular chain model construction, thermo-stability, and thermo-oxidative degradation mechanism of poly(vinyl chloride) // *Royal Society of Chemistry Advances*. 2016. Vol. 6. Issue 39. P. 31898–31905. <https://doi.org/10.1039/C6RA02354A>

8. Шаглаева Н.С., Султангареев Р.Г., Забанова Е.А., Лебедева О.В., Трофимова К.С. Нуклеофильное замещение атомов хлора в поливинилхлориде // *Журнал прикладной химии*. 2008. Т. 81. Вып. 1. С. 136–139. <https://doi.org/10.1007/s11167-008-1029-8>

9. Szarka G., Iván B. Thermal properties, degradation and stability of poly(vinyl chloride) predegraded thermooxidatively in the presence of dioctyl phthalate plasticizer // *Journal of Macromolecular Science: Part A: Pure and Applied Chemistry*. 2013. Vol. 50. Issue 2. P. 208–214. <https://doi.org/10.1080/10601325.2013.742804>

10. Лакеев С.Н., Майданова И.О., Муллахметов Р.Ф., Давыдова О.В. Сложноэфирные пластификаторы поливинилхлорида (обзор) // *Журнал прикладной химии*. 2016. Т. 89. N 1. С. 3–18.

11. Navarro R., Perrino M.P., Tardaios M.G., Reinecke H. Phthalate Plasticizers Covalently Bound to PVC: Plasticization with Suppressed Migration // *Macromolecules*. 2010. Vol. 43. P. 2377–2381. <https://doi.org/10.1021/ma902740t>

12. McCoy C.P., Irwin N.J., Hardy J.G., Kennedy S.J., Donnelly L., Cowley J.F., et al. Systematic optimization of poly(vinyl chloride) surface modification with an aromatic thiol // *European Polymer Journal*. 2017. Vol. 97. P. 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.09.030>

13. Рафиков С.Р., Павлова С.А., Твердохлебова И.И. Методы определения молекулярных весов и полидисперсности высокомолекулярных соединений. М.: Изд-во АН СССР, 1963. 335 с.

14. Брандон Д., Каплан У. Микроструктура материалов. Методы исследования и контроля. М.: Техносфера, 2004. 384 с.

15. Goldstein M., Stephenson D., Maddams W.F. The far infra-red spectrum of poly(vinyl chloride) // *Polymer*. 1983. Vol. 24. Issue 7. P. 823–826. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(83\)90197-0](https://doi.org/10.1016/0032-3861(83)90197-0)

16. Kowalonek J. Surface studies of UV-irradiated poly(vinyl chloride)/poly(methyl methacrylate) blends // *Polymer Degradation and Stability*. 2016. Vol. 133. P. 367–377. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.09.016>

17. Moore W.H., Krimm S. The vibrational spectrum of crystalline syndiotactic. Poly(vinyl chloride) // *Macromolecular Chemistry and Physics*. 1975. Vol. 1. Issue S19751 P. 491–506. <https://doi.org/10.1002/macp.1975.020011975134>

18. Лебедев В.П., Окладнов Н.А., Минскер К.С., Штаркман Б.Н. Рентгенографическое исследование поливинилхлорида // *Высокомолекулярные соединения*. 1965. Т. 7. N 4. С. 655–670.

19. Получение и свойства поливинилхлорида / под ред. Е.Н. Зильбермана. М.: Химия, 1968. 432 с.

20. Глазковский Ю.В., Завьялов А.Н., Бакарджиев Н.М., Новак И.И. Исследование методом ИК-спектроскопии изменения упорядоченности структуры аморфизованного поливинилхлорида // *Высокомолекулярные соединения*. 1970. Т. XII (A). N 12. С. 2697–2701.

REFERENCES

1. Braun D. Poly(vinyl chloride) on the way from the 19th century to the 21st century. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. 2004;42(3):578–586. <https://doi.org/10.1002/pola.10906>

2. Kilyachkov AA. PVC production in Russia: condition and prospects. *Plastiks*. 2014;5:42–47. (In Russian)

3. Wypych G. *PVC Degradation and Stabilisation*. 3rd Ed. Toronto: ChemTec Publishing, 2015. 441 p.

4. Shaglaeva NS, Sultangareev RG, Orhokova EA, Prozorova GF, Dmitrieva GV, Dambinova AS,

et al. Proton Conductive Membranes Based on Modified Polyvinyl Chloride. *Membrany i Membranye Tekhnologii = Membranes and Membrane Technologies*. 2011;1(3):213–219. (In Russian) <https://doi.org/10.1134/S0965544111080093>

5. Choi JK, Kim YW, Koh JH, Kim JH. Proton conducting membranes based on poly(vinyl chloride) graft copolymer electrolytes. *Polymers for Advanced Technologies*. 2008;19(7):915–921. <https://doi.org/10.1002/pat1060>

6. Krongauz VV, Lee Y, Bourassa A. Kinetics of thermal degradation of poly(vinyl chloride). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*.

2011;106:139–149. <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1703-6>

7. Liu J, Lv Y, Luo Z, Wang H, Wei Z. Molecular chain model construction, thermo-stability, and thermo-oxidative degradation mechanism of poly(vinyl chloride). *Royal Society of Chemistry Advances*. 2016;6(38):31898–31905. <https://doi.org/10.1039/C6RA02354A>

8. Shaglaeva NS, Sultangareev RG, Zabanova EA, Lebedeva OV, Trofimova KS. Nucleophilic substitution of chlorine atoms in polyvinyl chloride. *Zhurnal prikladnoi khimii = Russian Journal of Applied Chemistry*. 2008;81:136–139. (In Russian)

9. Szarka G, Iván B. Thermal properties, degradation and stability of poly(vinyl chloride) predegraded thermooxidatively in the presence of dioctyl phthalate plasticizer. *Journal of Macromolecular Science: Part A: Pure and Applied Chemistry*. 2013;50(2):208–214. <https://doi.org/10.1080/10601325.2013.742804>

10. Lakeev SN, Maydanova IO, Mullakhmetov RF, Davydova OV. Ester plasticizers for polyvinyl chloride (review). *Zhurnal prikladnoi khimii = Russian Journal of Applied Chemistry*. 2016;89(1):3–18. (In Russian)

11. Navarro R, Perrino MP, Tardaios MG, Reinecke H. Phthalate Plasticizers Covalently Bound to PVC: Plasticization with Suppressed Migration. *Macromolecules*. 2010;43:2377–2381. <https://doi.org/10.1021/ma902740t>

12. McCoy CP, Irwin NJ, Hardy JG, Kennedy SJ, Donnelly L, Cowley JF, et al. Systematic optimization of poly(vinyl chloride) surface modification with an aromatic thiol. *European Polymer Journal*. 2017;97:40–48. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.09.030>

2017.09.030

13. Rafikov SR, Pavlova SA, Tverdokhlebova II. *Methods for determination of molecular weights and polydispersity of high-molecular compounds*. Moscow: Izdatel'stvo AN SSSR; 1973. 335 p. (In Russian)

14. Brandon D, Kaplan U. *Microstructure of materials. Research and control methods*. Moscow: Tekhnosfera; 2004. 384 p. (In Russian)

15. Goldstein M, Stephenson D, Maddams WF. The far infra-red spectrum of poly(vinyl chloride). *Polymer*. 1983;24(7):823–826. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(83\)90197-0](https://doi.org/10.1016/0032-3861(83)90197-0)

16. Kowalonek J. Surface studies of UV-irradiated poly(vinyl chloride)/poly(methyl methacrylate) blends. *Polymer Degradation and Stability*. 2016;133:367–377. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.09.016>

17. Moore WH, Krimm S. The vibrational spectrum of crystalline syndiotactic. Poly(vinyl chloride). *Macromolecular Chemistry and Physics*. 1975;1(S19751):491–506. <https://doi.org/10.1002/macp.1975.020011975134>

18. Lebedev VP, Okladnov NA, Minsker KS, Shtarkman BN. X-ray study of polyvinylchloride. *Vysokomolekulyarnye soedineniya*. 1965;7(4):655–670. (In Russian)

19. *Production and properties of polyvinyl chloride*. Ed.: E.N. Zil'berman. Moscow: Khimiya; 1968.432 p. (In Russian)

20. Glazkovskii YuV, Zav'yalov AN, Bakarzhiev NM, Novak II. Changes in amorphized polyvinylchloride structure as studied by IR-spectroscopy. *Vysokomolekulyarnye soedineniya*. 1970;XII(12):2697–2701. (In Russian)

Критерии авторства

Баяндин В.В., Шаглаева Н.С., Подгорбунская Т.А., Лукьянов Н.Д., Минаев Н.В., Макаров С.С. выполнили экспериментальную работу, на основании полученных результатов провели обобщение и написали рукопись. Авторы имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

онфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Баяндин Виктор Владимирович,
к.х.н., доцент кафедры химической технологии,
Иркутский национальный исследовательский

Contribution

Victor V. Bayandin, Nina S. Shaglaeva, Tatiana A. Podgorbunskaya, Nikita D. Lukyanov, Nikolai V. Minaev, Svyatoslav S. Makarov carried out the experimental work, analyzed the experimental results and prepared the text of the manuscript. All authors have equal author's right and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict of interests

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

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

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Victor V. Bayandin,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Chemical Technology Department,

технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: bayandinvv@yandex.ru

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

Подгорбунская Татьяна Анатольевна,
к.х.н., доцент кафедры химической технологии,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: tpodgor@istu.edu

Лукьянов Никита Дмитриевич,
к.т.н., доцент кафедры автоматизированных
систем,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: lukyanovnd@istu.edu

Минаев Николай Владимирович,
инженер,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: minaev@istu.edu

Макаров Святослав Станиславович,
магистрант,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: makarov@istu.edu

Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: bayandinvv@yandex.ru

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

Tatiana A. Podgorbunskaya,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Chemical Technology Department,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: tpodgor@istu.edu

Nikita D. Lukyanov,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Department of Automated Systems,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk 664074,
Russian Federation,
e-mail: lukyanovnd@istu.edu

Nikolai V. Minaev,
Engineer,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk 664074,
Russian Federation,
e-mail: minaev@istu.edu

Svyatoslav S. Makarov,
Student,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: makarov@istu.edu

Оригинальная статья / Original article

УДК 541.64: 547.792:547.678.74

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-536-540>



Новые функциональные сополимеры 1-винил-1,2,4-триазола с аллиламином

© Г.Ф. Прозорова, А.И. Емельянов, С.А. Коржова

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

Резюме: Новые водорастворимые функциональные сополимеры на основе 1-винил-1,2,4-триазола и аллиламина синтезированы в условиях свободно-радикального инициирования под действием динитрила азобисизомасляной кислоты. Варьированием условий реакции получены сополимеры разного состава с молекулярной массой 1287–30204 Да. Структуру, молекулярную массу и физико-химические свойства сополимеров определяли с помощью методов элементного анализа, ИК- и ЯМР ^1H -спектроскопии, гель-проникающей хроматографии, потенциометрического и турбидиметрического титрования, динамического светорассеяния, термogravиметрического анализа. Установлено, что сополимеры проявляют свойства высокоомных органических полупроводников, характеризуются удельной электрической проводимостью порядка 10^{-13} – 10^{-14} См/см, обладают высокой стойкостью к термической деструкции (до 260–280 °С). Полученные сополимеры являются перспективными в качестве стабилизирующих полимерных матриц при формировании водорастворимых гибридных органико-неорганических наноконкомпозитов, обладающих биологической активностью.

Ключевые слова: 1-винил-1,2,4-триазол, аллиламин, радикальная сополимеризация

Благодарности: Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-03-00168). Основные результаты получены с использованием оборудования Байкальского аналитического центра коллективного пользования СО РАН.

Информация о статье: Дата поступления 2 февраля 2020 г.; дата принятия к печати 31 августа 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2020 г.

Для цитирования: Прозорова Г.Ф., Емельянов А.И., Коржова С.А. Новые функциональные сополимеры 1-винил-1,2,4-триазола с аллиламином. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 3. С. 536–540. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-536-540>

New functional copolymers of 1-vinyl-1,2,4-triazole with allylamine

Galina F. Prozorova, Artem I. Emel'yanov, Svetlana A. Korzhova

A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

Abstract: New water-soluble functional copolymers based on 1-vinyl-1,2,4-triazole and allylamine were synthesized under the action of free-radical initiation conditions and azobisisobutyric acid dinitrile. Copolymers of various compositions with a molecular weight of 1287–30204 Da were obtained by varying reaction conditions. The structure, molecular weight and physicochemical properties of the copolymers were determined using elemental analysis, IR and NMR ^1H -spectroscopy, gel permeation chromatography, potentiometric and turbidimetric titration, as well as dynamic light scattering and thermogravimetric analysis. It was established that the obtained copolymers, exhibiting the properties of high-resistance organic semiconductors, are characterized by a specific electrical conductivity of 10^{-13} – 10^{-14} S/cm and high resistance to thermal destruction (up to 260–280 °C). These copolymers are promising as stabilizing polymer matrices in the formation of biologically active water-soluble hybrid organic-inorganic nanocomposites.

Keywords: 1-vinyl-1,2,4-triazole, allylamine, radical copolymerization

Acknowledgments: The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research within the framework of the research project No. 18-03-00168. The main results were obtained using the equipment of the Baikal Analytical Centre for Collective Use of the SB RAS.

Information about the article: Received February 02, 2020; accepted for publication August 31, 2020; available online September 30, 2020.

For citation: Prozorova GF, Emel'yanov AI, Korzhova SA. New functional copolymers of 1-vinyl-1,2,4-triazole with allylamine. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):536–540. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-536-540>

ВВЕДЕНИЕ

Актуальным направлением в полимерной химии является разработка новых функциональных полимеров с широким комплексом практически значимых свойств. В зависимости от природы полимеров можно создавать эффективные полимерные материалы для решения ряда проблем развивающихся технологий: прочности, перерабатываемости, пластичности, стойкости к агрессивным средам и т.п. [1–4]. Наиболее эффективным способом усиления функциональности полимеров является направленная сополимеризация различных мономеров, позволяющая синтезировать оригинальные сополимеры с синергическим сочетанием уникальных свойств сомономеров. Особое внимание уделяется водорастворимым полимерам, перспективным для разработки современных медико-биологических материалов. Ранее нами была показана возможность синтеза новых полимеров и сополимеров, в том числе водорастворимых, на основе 1-винил-1,2,4-триазола, а также получения, в зависимости от условий реакции и природы сомономера, (со)полимеров и нанокомпозитов, имеющих высокие термостойкость [5, 6], биологическую активность [7–9], сорбционную способность [10].

В настоящей работе представлены результаты синтеза и исследования физико-химических свойств новых сополимеров 1-винил-1,2,4-триазола (ВТ) с аллиламином (АА). Основная цель заключалась в разработке новых перспективных полимерных материалов с практически значимыми свойствами, а именно, в усилении биологической активности наноматериалов на основе ВТ путем введения в макроструктуру аллиламинного фрагмента, обладающего фунгистатическим и фунгицидным действием.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

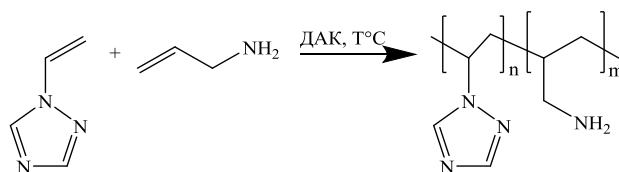
Элементный анализ выполняли на анализаторе Thermo Finnigan Flash EA 1112 (Thermo Fisher Scientific, Великобритания). ИК-спектры регистрировали на спектрометре FT-IR Bruker Vertex 70 (Bruker Corporation, Германия). Молекулярные массы измеряли методом гелепроникающей хроматографии на приборе Shimadzu LC-20 (Shimadzu Corporation, Япония). Гидродинамический диаметр макромолекул определяли с помощью фотонного анализатора Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd, Великобритания). Электрическую проводимость измеряли на тераомметре Е6-13А. Устойчивость сополимеров к термоокислительной деструкции изучали методами термогравиметрического ана-

лиза и дифференциальной сканирующей калориметрии с использованием дериватографа STA 449 Jupiter (Netzsch, Германия). Измерения проводили в интервале температур 25–700 °С при скорости нагрева 10 °С/мин в воздушной атмосфере. Масса образцов составляла 5 мг. ВТ синтезировали по методике, представленной в работе [11], аллиламин и динитрил азобисизомасляной кислоты (ДАК) (Aldrich) использовали без дополнительной очистки.

Синтез сополимеров. Сополимеризацию ВТ с АА проводили в запаянных ампулах в атмосфере аргона в воде в присутствии ДАК (1% масс. от массы мономеров) при 60 °С в течение 72 ч при разном соотношении мономеров. Сополимеры выделяли двукратным осаждением из раствора ДМФА в диэтиловый эфир, сушили в вакууме при 40 °С над P₂O₅ до постоянной массы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сополимеризацию 1-винил-1,2,4-триазола (ВТ) с аллиламином (АА) проводили в условиях свободно-радикального иницирования с использованием динитрила азобисизомасляной кислоты (ДАК) в качестве инициатора. Реакции осуществляли в воде при 60 °С в течение 72 ч при разном соотношении мономеров. Сополимеризация протекает по винильным группам мономеров, в результате образуются соответствующие сополимеры:



Варьированием соотношения мономеров в исходной реакционной смеси синтезированы сополимеры разного состава с молекулярной массой 1287–30204 Да, которые представляют собой порошки белого цвета, хорошо растворимые в воде и биполярных органических растворителях (ДМФА, ДМСО, ДМАА) (таблица).

Из полученных результатов следует, что с увеличением содержания АА в исходной реакционной смеси происходит понижение выхода и уменьшение молекулярной массы сополимеров. Это обусловлено характерным поведением аллильных соединений в реакциях полимеризации, а именно, деградационной передачей цепи на мономер, что связано с большой подвижностью аллильного водорода и стабилизацией образующегося аллильного радикала вследствие

Условия синтеза и характеристики сополимеров 1-винил-1,2,4-триазола с аллиламином
Synthesis conditions and characteristics of the copolymers of 1-vinyl-1,2,4-triazole with Allylamine

Состав исходной смеси, мол. %		Выход, %	Состав сополимера, мол. %		M_w , Да*	M_w/M_n **	d , нм***	T , °C
BT	AA		BT	AA				
70	30	61	73	27	30204	2,40	19,67	280
50	50	43	67	33	6222	2,73	18,96	270
30	70	14	59	41	1287	1,44	17,45	260

* M_w – молекулярная масса;

** M_w/M_n – молекулярно-массовое распределение;

*** d – средний диаметр макромолекулы.

делокализации неспаренного электрона на π -орбитали. Из-за малой активности аллильный радикал не может инициировать реакцию роста и участвует лишь в реакциях бимолекулярного обрыва. Поэтому из-за передачи цепи на мономер полимеризация аллиловых мономеров протекает с малой скоростью и приводит к образованию низкомолекулярных продуктов. Ширина молекулярно-массового распределения (M_w/M_n) уменьшается от 2,40 до 1,44, что свидетельствует о более узкой дисперсности молекулярно-массового распределения в сополимере с большим содержанием аллиламинных звеньев (41 мол.%).

В ИК-спектрах сополимеров отсутствует полоса поглощения валентных колебаний связей $C=C$ винильной группы (1654 см^{-1}) и сохраняются характерные полосы поглощения мономеров, см^{-1} : валентные и деформационные колебания триазольного цикла 1503–1505 ($C=N$), 1430–1433 ($C-N$), 1273–1275 ($N-N$), 1001–1004 ($C-H$), 660–665 ($C-N$); аллиламина 909 ($N-H$), 1135–1250 ($C-N$), 1658 ($N-H$) и полимерной цепи 3110 (CH), 2922–2925 (CH_2). Широкая полоса с центром при 3430 см^{-1} относится к колебаниям группы $-OH$ молекулярной воды, взаимодействующей с сополимером.

Об образовании истинных сополимеров свидетельствуют результаты турбидиметрического титрования. Характер кривых (отсутствие площадок и перегибов, плавный ход зависимости оптической плотности от доли осадителя) соответствуют однокомпонентной системе.

Методом динамического светорассеяния бы-

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Tiantian G.T., Gu X., Guo S., Wang G. Synthesis, self-assembly of perfluoropolyether based ABA-triblock copolymers for superhydrophobic surface applications // *Polymer*. 2020. Vol. 205. 122732.
2. Shinde S., Gavvalapall N. Impact of amine additives on the mechanical properties of hydrogen bonding π -conjugated polymers // *Polymer*. 2020. Vol. 204. 122856.
3. Zezin A.A. Synthesis of metal-polymer complexes and functional nanostructures in films and coatings of interpolyelectrolyte complexes // *Polymer Science. Series A*. 2019. Vol. 61. Issue 6. P.

ли измерены средние диаметры макромолекул сополимеров в водно-солевых растворах. Соплимеры характеризуются мономодальным распределением частиц по размерам с максимумами, соответствующими средним диаметрам (d) 17,45–19,67 нм. Макромолекулы сополимера с меньшей молекулярной массой (1287 Да) характеризуются меньшим гидродинамическим диаметром (17,45 нм).

Синтезированные сополимеры проявляют свойства высокоомных органических полупроводников: характеризуются удельной электрической проводимостью порядка 10^{-13} – 10^{-14} См/см. По данным термогравиметрического анализа сополимеры обладают высокой термостойкостью, которая уменьшается с 280 до 260 °C при уменьшении доли триазольных фрагментов в макромолекулах сополимеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, методом радикальной сополимеризации синтезированы новые водорастворимые сополимеры 1-винил-1,2,4-триазола с аллиламином разного состава и различной молекулярной массы. Соплимеры проявляют свойства высокоомных органических полупроводников и обладают высокой стабильностью к термоокислительной деструкции. Наличие в макромолекулах сополимеров триазольных циклов и аллил-аминных фрагментов обуславливает их перспективность для разработки новых водорастворимых гибридных нанокомпозитов с высокой биологической активностью.

754–764. <https://doi.org/10.1134/S0965545X19060154>

4. Dağaç D.E., Danelyan G.V., Ghaffarlou M., Zezina E.A., Abramchuk S.S., Feldman V.I., et al. Generation of spatially ordered metal-polymer nanostructures in the irradiated dispersions of poly(acrylic acid)-poly(vinylimidazole)- Cu^{2+} complexes // *Colloid and Polymer Science*. 2020. Vol. 298. Issue 2. P. 193–202. <https://doi.org/10.1007/s00396-019-04592-5>

5. Прозорова Г.Ф., Ермакова Т.Г., Кузнецова Н.П., Коржова С.А., Емельянов А.И. Новые термостойкие функциональные сополимеры // *Известия*

вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2018. Т. 8. N 4. С. 192–196. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2018-8-4-192-196>

6. Pozdnyakov A.S., Emel'yanov A.I., Kuznetsova N.P., Ermakova T.G., Korzhova S.A., Khutsishvili S.S., et al. Synthesis and characterization of silver-containing nanocomposites based on 1-vinyl-1,2,4-triazole and acrylonitrile copolymer // *Journal of Nanomaterials*. 2019. Article ID 4895192, 7 p. <https://doi.org/10.1155/2019/4895192>

7. Prozorova G.F., Pozdnyakov A.S., Kuznetsova N.P., Korzhova S.A., Emel'yanov A.I., Ermakova T.G., et al. Green synthesis of water-soluble nontoxic polymeric nanocomposites containing silver nanoparticles // *International Journal of Nanomedicine*. 2014. Vol. 9. Issue 1. P. 1883–1889. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57865>

8. Pozdnyakov A.S., Emel'yanov A.I., Kuznetsova N.P., Ermakova T.G., Fadeeva T.V., Sosedova L.M., et al. Nontoxic hydrophilic polymeric nanocomposites containing silver nanoparticles with strong antimicrobial activity // *International Journal*

of Nanomedicine. 2016. Vol. 11. P. 1295–1304. <https://doi.org/10.2147/IJN.S98995>

9. Shurygina I.A., Prozorova G.F., Trukhan I.S., Korzhova S.A., Fadeeva T.V., Pozdnyakov A.S., et al. Nontoxic silver/poly-1-vinyl-1,2,4-triazole nanocomposite materials with antibacterial activity // *Nanomaterials*. 2020. Vol. 10. Issue 8. P. 1477. <https://doi.org/10.3390/nano10081477>

10. Prozorova G., Kuznetsova N., Shaulina L., Bolgova Yu., Trofimova O., Emel'yanov A., et al. Synthesis and sorption activity of novel cross-linked 1-vinyl-1,2,4-triazole(trimethoxysilyl)methyl-2-methacrylate copolymers // *Journal of Organometallic Chemistry*. 2020. Vol. 916. P. 121273. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2020.121273>

11. Pozdnyakov A.S., Ivanova A.A., Emel'yanov A.I., Bolgova Yu.I., Trofimova O.M., Prozorova G.F. Water-soluble stable polymer nanocomposites with AuNPs based on the functional poly(1-vinyl-1,2,4-triazole-co-N-vinylpyrrolidone) // *Journal of Organometallic Chemistry*. 2020. Vol. 922. P. 121352. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2020.121352>

REFERENCES

1. Tiantian GT, Gu X, Guo S, Wang G. Synthesis, self-assembly of perfluoropolyether based ABA-triblock copolymers for superhydrophobic surface applications. *Polymer*. 2020;205:122732.

2. Shinde S, Gavvalapalli N. Impact of amine additives on the mechanical properties of hydrogen bonding π -conjugated polymers. *Polymer*. 2020;204:122856.

3. Zezin AA. Synthesis of metal-polymer complexes and functional nanostructures in films and coatings of interpolyelectrolyte complexes. *Polymer Science. Series A*. 2019;61(6):754–764. 1. <https://doi.org/10.1134/S0965545X19060154>

4. Dağaç DE, Danelyan GV, Ghaffarlou M, Zezina EA, Abramchuk SS, Feldman VI, et al. Generation of spatially ordered metal-polymer nanostructures in the irradiated dispersions of poly(acrylic acid)-poly(vinylimidazole)-Cu²⁺ complexes. *Colloid and Polymer Science*. 2020;298(2):193–202. <https://doi.org/10.1007/s00396-019-04592-5>

5. Prozorova GF, Ermakova TG, Kuznetsova NP, Korzhova SA, Emel'yanov AI. New heat-resistant functional copolymers. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2018;8(4):192–196. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2018-8-4-192-196>

6. Pozdnyakov AS, Emel'yanov AI, Kuznetsova NP, Ermakova TG, Korzhova SA, Khutsishvili SS, et al. Synthesis and characterization of silver-containing nanocomposites based on 1-vinyl-1,2,4-triazole and acrylonitrile copolymer. *Journal of Nanomaterials*. 2019. Article ID 4895192, 7 p. <https://doi.org/10.1155/2019/4895192>

7. Prozorova GF, Pozdnyakov AS, Kuznetsova NP, Korzhova SA, Emel'yanov AI, Ermakova TG, et al. Green synthesis of water-soluble nontoxic polymeric nanocomposites containing silver nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2014;9(1):1883–1889. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57865>

8. Pozdnyakov AS, Emel'yanov AI, Kuznetsova NP, Ermakova TG, Fadeeva TV, Sosedova LM, et al. Nontoxic hydrophilic polymeric nanocomposites containing silver nanoparticles with strong antimicrobial activity. *International Journal of Nanomedicine*. 2016;11:1295–1304. <https://doi.org/10.2147/IJN.S98995>

9. Shurygina IA, Prozorova GF, Trukhan IS, Korzhova SA, Fadeeva TV, Pozdnyakov AS, et al. Nontoxic silver/poly-1-vinyl-1,2,4-triazole nanocomposite materials with antibacterial activity. *Nanomaterials*. 2020;10(8):1477. <https://doi.org/10.3390/nano10081477>

10. Prozorova G, Kuznetsova N, Shaulina L, Bolgova Yu, Trofimova O, Emel'yanov A, et al. Synthesis and sorption activity of novel cross-linked 1-vinyl-1,2,4-triazole(trimethoxysilyl)methyl-2-methacrylate copolymers. *Journal of Organometallic Chemistry*. 2020;916:121273. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2020.121273>

11. Pozdnyakov AS, Ivanova AA, Emel'yanov AI, Bolgova Yul, Trofimova OM, Prozorova GF. Water-soluble stable polymer nanocomposites with AuNPs based on the functional poly(1-vinyl-1,2,4-triazole-co-N-vinylpyrrolidone). *Journal of Organometallic Chemistry*. 2020;922:121352. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2020.121352>

Критерии авторства

Прозорова Г.Ф., Емельянов А.И., Коржова С.А. выполнили экспериментальную работу, на основании полученных Авторы имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Прозорова Галина Фирсовна,
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: prozorova@irioch.irk.ru

Емельянов Артем Иванович,
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: emelyanov@irioch.irk.ru

Коржова Светлана Анатольевна,
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: korzhova@irioch.irk.ru

Contribution

Galina F. Prozorova, Artem I. Emel'yanov, Svetlana A. Korzhova carried out the experimental work, on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. The authors have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict of 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.

AUTORS' INDEX

Galina F. Prozorova
Dr. Sci. (Chemistry), Leading Researcher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, A.E. Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ e-mail: prozorova@irioch.irk.ru

Artem I. Emel'yanov,
Cand. Sci. (Chemistry), Senior Scientist,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, A.E. Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: nkuznetsova@irioch.irk.ru

Svetlana A. Korzhova,
Cand. Sci. (Chemistry), Senior Scientist,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, A.E. Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: korzhova@irioch.irk.ru

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 10 N 3 (34) 2020

12+

PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
Applied chemistry and biotechnology
Volume 10 N 3 2020

Редактор О.А. Терновская
Перевод на английский язык: Thomas A. Beavitt, Christopher JP Scott, Michael Beavitt,
М.В. Стрелецкая, А.Р. Бойко, Н.Г. Попова, Е.А. Привалова
Компьютерный набор и верстка А.В. Куртовой
Ответственный за выпуск Ю.Н. Пожидаев

Дата выхода в свет 30.09.2020. Формат 60 x 90 / 8.
Бумага офсетная. Печать цифровая. Усл. печ. л. 21,5.
Тираж 500 экз. Зак. 166. 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