



МАТЕРИАЛЫ IV МЕЖДУНАРОДНОГО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ФОРУМА «BIOAsia–Altai 2024»



Барнаул, Алтайский край, Россия
23–28 сентября 2024 г.

Министерство науки и высшего образования РФ
Алтайский государственный университет

МАТЕРИАЛЫ
IV МЕЖДУНАРОДНОГО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО
ФОРУМА «BIOAsia-Altai 2024»

г. Барнаул, Алтайский край, Россия
23–28 сентября 2024 г

УДК 577.1:66.01(063)

ББК 28.087.1я431

М 341

Ответственные за выпуск:

Н.Г. Базарнова, доктор химических наук, заведующая кафедрой органической химии Алтайского государственного университета,

А.Н. Иркитова, кандидат биологических наук, директор Инжинирингового Центра «Промбиотех» Алтайского государственного университета,

И.В. Микушина, кандидат химических наук, директор Института химии и химико-фармацевтических технологий Алтайского государственного университета,

О.Н. Мироненко, кандидат биологических наук, директор Алтайского центра прикладной биотехнологии Алтайского государственного университета,

И.Н. Ротанова, кандидат географических наук, доцент кафедры физической географии и геоинформационных систем Алтайского государственного университета,

С.В. Смирнов, кандидат биологических наук, директор Института биологии и биотехнологии Алтайского государственного университета,

Г.Г. Соколова, доктор биологических наук, заведующая кафедрой экологии, биохимии и биотехнологии Алтайского государственного университета,

Д.Н. Щербаков, кандидат биологических наук, директор НИИ биологической медицины Алтайского государственного университета.

М 341 Материалы IV Международного биотехнологического форума «BIOAsia Altai 2024» / отв. за выпуск: Н.Г. Базарнова, А.Н. Иркитова, И.В. Микушина, О.Н. Мироненко, И.Н. Ротанова, С.В. Смирнов, Г.Г. Соколова, Д.Н. Щербаков. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2024. – 588 с.

ISBN 978-5-7904-2869-2

Сборник содержит статьи, подготовленные на основе материалов докладов IV Международного биотехнологического форума «BIOAsia-Altai 2024» (г. Барнаул, 23-28 сентября 2024 г.). Представлены результаты исследований в области промышленной, пищевой и сельскохозяйственной биотехнологии, биоконверсии и молекулярной генетики. Материалы рассчитаны на ученых, преподавателей и учащихся вузов, представителей органов власти, производственных предприятий.

УДК 577.1:66.01(063)

ББК 28.087.1я431

ISBN 978-5-7904-2869-2

© Оформление. Алтайский государственный университет, 2024

БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И СЕЛЬСКОГО ХОЗЙСТВА

УДК 665.931.7:678.004.48

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЖЕЛАТИНА И КСАНТАНОВОЙ КАМЕДИ КАК ГЕЛЕБРАЗОВАТЕЛЕЙ

А.А. Адодина, Н.С. Величкович

Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия

Аннотация. В данной статье представлен сравнительный анализ желатина и ксантановой камеди на примере приготовления геля с использованием кофейного экстракта. В пищевой промышленности существует множество продуктов, которые имеют гелеобразную структуру, также существует и большое количество структурообразующих компонентов, которые могут придавать продукту тянущуюся, вязкую структуру. Работа представляет собой анализ наиболее известных желирующих агентов – желатина и ксантановой камеди. Приведены сравнения органолептических и физико-химических показателей данных продуктов.

Ключевые слова: желатин, ксантановая камедь, гелеобразователи, структурообразователи, желирующий агент, структура, консистенция.

Гелеобразователи – это различные вещества, которые могут образовывать гель. То есть структуру, которая имеет вязкий характер, способна сохранять форму, но при этом тягуча и пластична. Гели используются во многих отраслях промышленности благодаря своей структуре и химической природе – это линейные или разветвленные полимерные цепи с гидрофильными группами [1].

Они используются в косметической отрасли промышленности, для производства бытовой химии, лекарственных препаратов, нашли применение в отрасли нефте- и газодобывающей промышленности, и, конечно, в пищевой промышленности. Некоторые гели могут поглощать воду в количестве, превышающем их собственный вес в 400 раз [2].

Ксантановая камедь – это вещество, которое вырабатывается определенным видом микроорганизмов *Xanthomonascampestris* при ферментации кукурузного крахмала; в пищевой промышленности используется для стабилизации водных систем, придавая им вязкость. Она не прекращает свое действие при изменении рН, в присутствии электролитов или при повышении температуры.

Более известна как пищевая добавка E415, при этом абсолютно безопасно для человеческого организма, относится к группе стабилизаторов [3].

Гидрогели и модифицированные композиты на основе желатина, полученного в результате гидролиза коллагена, распространенного в природе белкового вещества, содержащего все незаменимые аминокислоты (кроме триптофана), широко используются в пищевой индустрии, биомедицине, фармацевтической промышленности и в изготовлении упаковочных материалов для пищевых продуктов благодаря его биосовместимости, биоразлагаемости, неиммуногенности и способности стимулировать клеточную адгезию и пролиферацию. Желатин является важным гидроколлоидом и используется в качестве стабилизатора, загустителя, эмульгатора, пенообразующего и смачивающего агента для пищевого, фармацевтического, медицинского и технического применения из-за его поверхностно-активных свойств, а также для инкапсулирования пищевых добавок и активных веществ [4].

В ходе экспериментов по получению гелеобразной структуры геля были выбраны два образца загустителей и структурообразователей – желатин и ксантановая камедь.

Целью работы является сравнительный анализ популярных структурообразователей – желатина и ксантановой камеди – для определения различий в их свойствах и выборе наиболее подходящего по свойствам для приготовления гелей.

Для приготовления геля были взяты 0,4 г желатина в первом случае и 0,4 г ксантановой камеди на 100 мл кофейного экстракта во втором. Желатин набухал в течение 30 минут, после чего смесь нагревалась до $t=70\text{ }^{\circ}\text{C}$ и охлаждалась до $t=4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ксантановая камедь после внесения в экстракт тщательно перемешивалась до полного растворения, после чего был произведен органолептический анализ двух смесей, результаты которого представлены в табл. 1.

Таблица 1

Сравнительный анализ желатина и ксантановой камеди

Показатель	Желатин	Ксантановая камедь
Внешний вид		
Вкус	Вкус кофе	Вкус кофе
Цвет	Светло-коричневый	Светло-коричневый
Запах	Кофейный	Кофейный
Консистенция	Гелеобразная, тянущаяся, вязкая	Гелеобразная, тянущаяся, пластичная, вязкая с вкраплениями пузырьков воздуха
Диапазон температур, при которых продукт может сохранять структуру	Стабилизируется при температуре ниже $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, при повышении температуры теряет свойства геля	Сохраняет свои структурные свойства при температуре от $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $+120\text{ }^{\circ}\text{C}$

Из таблицы видно, что оба желирующие агента справляются со своей задачей в образовании гелеобразных структур. И желатин и ксантановая камедь никак не влияют на вкус, запах и цвет продукта. Ксантановая камедь, имеет особенность, которая заключается в образовании мелких пузырьков воздуха в структуре геля, но это никак не сказывается на вкусе продукта. Через некоторое время данные пузырьки уменьшаются в количестве. Ксантановая камедь дает структуру более пластичную, чем желатин.

Главным отличием является диапазон температур, при котором гель может сохранять свои структурные свойства. В случае с желатином продукт стабилизируется при температуре ниже $+15\text{ }^{\circ}\text{C}$ и со временем теряет свои свойства при повышении температуры. Таким образом, желатин не подходит для продуктов, условия хранения которых не подразумевают температуру ниже $+15\text{ }^{\circ}\text{C}$. В свою очередь гель, полученный с использованием ксантановой камеди сохраняет свои структурные свойства при температуре от $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $+120\text{ }^{\circ}\text{C}$ и может храниться как при комнатной температуре, так и в условиях, например, холодильной камеры.

Заключение: выполнен сравнительный анализ желатина и ксантановой камеди как гелеобразователей; приведены основные органолептические и физико-химические характеристики продукта с их использованием; наиболее подходящим продуктом для приготовления гелей определена ксантановая камедь, так как диапазон температур, при котором продукт с ее использованием может сохранять свойства геля, более обширен, чем у желатина,

что позволяет хранить такой продукт не только в холодильной камере, но и при комнатной температуре.

Благодарности. Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП «Инструментальные методы анализа в области прикладной биотехнологии» на базе КемГУ.

Статья подготовлена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения

Библиографический список

1. Шевель, А. А. Экспериментальные исследования процесса микрокапсулирования пробиотического компонента в системе «гель в геле» / А. А. Шевель, Н. С. Величкович // Пищевые инновации и биотехнологии : Сборник тезисов XI Всероссийской (национальной) научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Кемерово, 18 мая 2023 года / Под общей редакцией А.Ю. Просекова. – Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2023. – С. 499-503.

2. Попова, П. Н. Натуральные гелеобразователи в косметических средствах / П. Н. Попова, Е. Б. Караваева // Инновационное развитие техники и технологий в промышленности: Сборник материалов Всероссийской научной конференции молодых исследователей с международным участием, Москва, 17–20 апреля 2023 года. Том Часть 3. – Москва: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Российский государственный университет имени А.Н. Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)", 2023. – С. 63–67.

3. Мылов, Д. С. Различия применения ксантановой камеди и камеди рожкового дерева в пищевой промышленности / Д. С. Мылов, Д. И. Шишкина, А. И. Штовхун // Траектории технологического развития. – 2022. – Т. 1, № 2 (2). – С. 4–14.

4. Желатин: источники, получение и применение в пищевой промышленности и биомедицине / Э. О. Шатабаева, Г. А. Мун, Е. М. Шайхутдинов, В. В. Хуторянский // Вестник Казахского национального университета. Серия химическая. – 2020. – Т. 98, № 3. – С. 28–46.

УДК 634.17

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИОННОГО ФОНДА КЛОНОВ ВИДОВ РОДА *CRATAEGUS* L.**Ю.В. Александрова, О.П. Лебедева, Н.А. Бабич***Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова, Наб. Северной Двины, д.17, г. Архангельск, Россия, 163002*

Аннотация: В статье представлены результаты опытов по подбору дезинфицирующих стерилизующих растворов при введении в культуру *in vitro* представителей рода *Crataegus* L. В результате проведенных исследований создана коллекция регенерантов. Созданная коллекция *Crataegus* L. *in vitro* будет использована для решения вопросов в размножении и селекции клонов.

Ключевые слова: *Crataegus* L., асептическая культура, стерилизация, экспланты, коллекция

Введение. Одним из целенаправленных путей обогащения биологического разнообразия насаждений северных регионов является интродукция ценных с точки зрения хозяйственной деятельности растений. Активные исследования данного вопроса проводятся на базе дендрологических и ботанических садов, поскольку расширение и сохранение биологического разнообразия – актуальная проблема современности [1, 3, 4].

На территории Европейского Севера базой для интродукционных испытаний является дендрологический сад имени И.М. Стратоновича. В результате многолетней работы сотрудников сада отобран ряд плодовых растений, ценных в области нутрициологии и фармакологии, адаптированных к суровым климатическим и эдафическим условиям приарктического региона.

На основе проведенных научных изысканий определены перспективные виды интродуцированных культурных плодовых растений к которым относятся представители рода *Crataegus* L. Коллекция боярышников дендрологического сада насчитывает 14 таксонов, которые могут стать базой для селекции районированного посадочного материала альтернативного импортному, что соответствует доктрине продовольственной безопасности согласно Федеральным научно-техническим программам развития сельского хозяйства на 2017-2025 годы.

Однако коллекции растений *ex situ* и *in situ* подвержены различным воздействиям среди которых влияние климатических факторов, болезни, вредители. Таким образом, недостатки традиционных методов сохранения генофонда обуславливают необходимость разработки биотехнологических методов сохранения генетических ресурсов – культивирования изолированных тканей и органов [2].

Целью данной работы является создание коллекционного фонда регенерантов *in vitro* отобранных гибридов представителей рода *Crataegus* L.

Методы и объекты исследования. Исследования проводились на одном из перспективных для выращивания на территории Европейского Севера представителей рода *Crataegus* L. – *C. Russanowii* Cin. В качестве первичных эксплантов использовали отобранные в период активного роста сегменты побегов текущего года длиной 1,0-2,0 см с 2-3 междоузлиями, срезанные с верхней части ветвей. На процесс введения эксплантов в стерильную культуру оказывает влияние ряд факторов: срок введения, тип экспланта, стерилизующий агент, состав питательной среды. Особая роль отводится схеме стерилизации. При неправильно подобранном режиме стерилизации происходит контаминация питательной среды и эксплантов грибной и бактериальной микрофлорой (рис. 1). Наиболее часто в качестве стерилизующих агентов

используют ртутьсодержащие и хлорсодержащие вещества. Из препаратов, содержащих ртуть, применяется раствор сулемы (HgCl_2) с экспозицией от 1 до 10 минут. В качестве хлорсодержащих веществ используют раствор «Белизны» («Homestar») при экспозиции от 10 до 25 минут в зависимости от культуры и типа экспланта [5, 6].



Рисунок 1. Контаминация питательной среды и эксплантов

Режим стерилизации для эксплантов *C. Russanowii* Cin. подбирали экспериментально. Перед введением эксплантов в культуру *in vitro* исходные фрагменты растений предварительно промывали в мыльном растворе и под проточной водой в течение 15-20 минут. Дальнейшие манипуляции проводились в ламинарном боксе. В качестве стерилизующих растворов использовали раствор сулемы (HgCl_2), раствор гипохлорита натрия и спирт. После стерилизации экспланты промывали стерильной дистиллированной водой. Побеги разрезали на фрагменты по 10-15 мм по 2-3 междоузлия и помещали на питательную среду Murashige and Skoog, содержащей гиббереллин 0,4 г/л.

Результаты и обсуждение. Оценку заражения эксплантов патогенами оценивали визуально. Результаты стерилизации эксплантов *C. Russanowii* Cin представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты стерилизации эксплантов *C. Russanowii* Cin

Вид	Режим стерилизации	Инфицированные, %	Стерильные, %	Некроз, %	Здоровые, %
<i>C. Russanowii</i> Cin	Гипохлорит натрия 5% (10 мин.) + Сулема 1% (5 мин.)	0	100	100	0
	Гипохлорит натрия 5% (10 мин.) + Сулема 1% (1 мин.)	90	10	100	0
	Гипохлорит натрия 5% (5 мин.) + Сулема 1% (1 мин.) + Спирт 96% (0,5 мин)	80	20	100	0

	Гипохлорит натрия 2% (20 мин.)+ Сулема 1% (1 мин) + Спирт 96% (0,5 мин)	70	30	90	10
--	--	----	----	----	----

Оценку результатов стерилизации проводили визуально. Анализ полученных данных показал, что растворы хлор- и ртутьсодержащих веществ эффективны при ликвидации поверхностной патогенной флоры, однако также токсичны и для самих эксплантов. При снижении времени экспозиции в стерилизующих растворах наблюдается большое количество инфицированных эксплантов (рис. 1). В результате снижения концентрации раствора гипохлорита натрия до 2% и увеличение времени экспозиции до 20 минут с последующим перемещением эксплантов в 1% раствор сулемы на 1 минуту и 96% спирт на 0,5 минуты получен здоровый жизнеспособный материал (рис 2).



Рисунок 2. Здоровый эксплант *C. Russanowii* Cin.

Стерилизацию перспективных для выращивания на Европейском Севере таксонов рода *Crataegus* L. из коллекции дендрологического сада имени И.М. Стратоновича проводили по последней схеме опыта. В результате получены жизнеспособные асептические материалы 6 таксонов: *C. Schroederi* Regel, *C. Russanowii* Cin, *C. chlorosarca* Maxim., *C. chlorosarca* var. *atrocarpa* E. Wolf, *C. dahurica* Koehne ex Schneid, *C. douglasii* Lindl. Дальнейшее культивирование эксплантов производили в световой комнате на фитостеллажах с оптимальным светодиодным освещением с досветкой красного спектра при 16-часовом фотопериоде, с поддержанием температуры воздуха +18...+22 С.

Заключение.

По результатам проведенных исследований по введению видов рода *Crataegus* L. в культуру *in vitro* выявлено, что наиболее оптимальным является применение 2%-ного раствора гипохлорита натрия при экспозиции 20 минут с помещением эксплантов на 1 минуту в 1 %-ный раствор сулемы и на 0,5 минуты в 96 %-ный спирт. Жизнеспособность эксплантов составила около 10%.

Опыт стерилизации эксплантов *Crataegus* L. показал, что на этапе стерилизации для получения жизнеспособного асептического материала необходимо подбирать нетоксичные стерилизующие препараты, устанавливать степень их концентрации и экспозиции, при которых достигается высокий уровень стерильности культуры и низкий уровень угнетения эксплантов.

Благодарности. Исследование выполнено за счет средств Программы развития САФУ на 2021-2035 гг., договор Д-384.2024

Библиографический список

1. Андропова, М. М. Ступенчатая интродукция древесных растений на севере Русской равнины / М. М. Андропова, Н. А. Бабич, Р. С. Хамитов. – Архангельск: Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова, 2021. – 412 с.
2. Жарасов Д.Н. Особенности введения в культуру *in vitro* барбариса илийского (*Berberis iliensis* M. Pop.) / Д.Н. Жарасов, Н.А. Толеп // Вестник Карагандинского университета. Серия биология. медицина. география. – 2022. – Vol.16. – № 4(108). – С. 29-33.
3. Карбасникова, Е. Б. Натурализация видов дендрофлоры в условиях интродукционного стресса: специальность 06.03.01 "Лесные культуры, селекция, семеноводство": автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук / Карбасникова Елена Борисовна. – Архангельск, 2022. – 40 с. – EDN CLAEJF.
4. Конвенция о биологическом разнообразии, Рио-де-Жанейро / Гарант. Информационно-правовое обеспечение. – 1992. - [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://base.garant.ru/2107744/>
5. Маркова М.Г., Сомова Е.Н. Оптимизация приемов введения садовых растений в стерильную культуру *in vitro*. Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2022;(4):71-81. <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2022-4-71-81>
6. Маркова М. Г., Сомова Е. Н. Регенерационная способность *Cerasus fruticosa* и *Prunus domestica* в культуре *in vitro* // Аграрный вестник Урала. 2021. № 06 (209). С. 43–52.

УДК 663.18

БИОВАЛОРИЗАЦИЯ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ В КСАНТАНОВУЮ КАМЕДЬ*Д.А. Баратова, А.К. Юргенсон, Т.В. Глухарева**Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина,
г. Екатеринбург, Россия*

Аннотация: Ксантановая камедь – биополимер, получивший широкое применение во многих отраслях пищевой, фармацевтической, нефтяной и косметологической промышленности благодаря уникальным реологическим свойствам. Целью настоящей работы являлось определение способности *Xanthomonas campestris B-6719* к биосинтезу ксантановой камеди с использованием молочной сыворотки в качестве компонента питательной среды с целью частичной замены дорогостоящего сырья – глюкозы. В ходе работы был установлен элементный состав молочной сыворотки, на основании результатов которого были рассчитаны оптимальные количества вносимых компонентов питательной среды. Добавление молочной сыворотки позволило сократить содержание глюкозы в ферментационной питательной среде более чем в 20 раз. На предложенной питательной среде получен продукт с выходом 3,7 г/л.

Ключевые слова: ксантановая камедь, молочная сыворотка, биовалоризация, переработка, вторичный ресурс, биосинтез.

BIOVALORIZATION OF WHEY INTO XANTHAN GUM*D.A. Baratova, A.K. Jurgenson, T.V. Glukhareva**Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin,
Yekaterinburg, Russia*

Abstract: Xanthan gum is a biopolymer that has been widely used in many sectors of the food, pharmaceutical, petroleum and cosmetology industries due to its unique rheological properties. The purpose of this work was to determine the ability of *Xanthomonas campestris B-6719* to biosynthesize xanthan gum using whey as a nutrient medium component in order to partially replace expensive raw materials – glucose. In the course of the work, the elemental composition of whey was established, based on the results of which the optimal amounts of the introduced components of the nutrient medium were calculated. The addition of whey made it possible to reduce the glucose content in the fermentation nutrient medium by more than 20 times. A product with a yield of 3.7 g/l was obtained on the proposed nutrient medium.

Keywords: xanthan gum, whey, biovalorization, processing, secondary resource, biosynthesis.

Подход комплексного рационального использования сырья, заключающийся в наиболее полном, экономически оправданном использовании всех полезных компонентов, содержащихся в сырье, а также в отходах производства, является приоритетным направлением развития промышленности. Почти все виды отходов промышленных предприятий содержат ряд ценных органических и минеральных компонентов, которые потенциально могут быть использованы в цикле получения других продуктов.

Сыворотка – основной побочный продукт молочной промышленности – образуется в результате свертывания молока при приготовлении сыра после отделения казеина и жира. Благодаря высокому содержанию в ней питательных органических веществ, молочная сыворотка представляет серьезную угрозу для окружающей среды и считается основной

проблемой в молочной промышленности. Ежегодно молочная промышленность производит около 145 миллионов тонн молочной сыворотки [2 с. 453]. В молоке сыворотка составляет от 80 до 90 % от общего объема, поступающего в промышленный процесс, и содержит от 6,0 до 6,4 % сухих компонентов. Приблизительно 55 % питательных веществ исходного молока остаются в сыворотке, в том числе ценные растворимые белки, лактоза, витамины и минеральные соли [1, с. 1938]. Богатый состав молочной сыворотки позволяет считать ее привлекательным и экономически эффективным для ферментационных процессов вторичным сырьевым ресурсом. Так, разработаны технологии [2, с. 454; 3 с. 2], позволяющие путем биоконверсии получать этанол, метан, дрожжевой белок, лактат, пропионат, ацетат и др.

Биовалоризация молочной сыворотки в ксантановую камедь – еще одно перспективное направление биотехнологии. Ксантановая камедь – это водорастворимый гетерополисахарид с уникальными реологическими свойствами, которые способствуют его широкому применению во многих отраслях промышленности [1, с. 1937], включая производство пищевых продуктов, фармацевтических препаратов, керамической глазури, бумаги, сельскохозяйственных химикатов. В промышленности при производстве ксантановой камеди используют дорогие субстраты, что значительно увеличивает стоимость производства, и, как следствие, конечную стоимость продукта. Использование менее дорогих и более распространенных субстратов может повысить экономическую эффективность ферментативного процесса производства ксантана. Согласно литературным данным, некоторые штаммы продуцентов ксантановой камеди способны к росту, развитию и синтезу ксантана на питательных средах, содержащих молочную сыворотку в качестве источника углерода.

Цель исследования заключается в изучении способности продуцента ксантана *Xanthomonas campestris* B-6719 к биосинтезу ксантановой камеди на питательной среде на основе молочной сыворотки.

В качестве продуцента ксантана был выбран производственный штамм ВКПМ *Xanthomonas campestris* B-6719. Предварительно для адаптации культуру пересеивали и выращивали в пробирках на скошенном агаре, содержащим в качестве источника углерода лактозу. Количество вносимого компонента рассчитывали исходя из оптимального содержания углерода в питательной среде (по паспорту штамма B-6719 оптимальная концентрация углерода – 18,9 г/л).

Для получения инокулята двухсуточную культуру с агаризованной среды засеивали в колбы с 50 мл питательной среды, содержащей 18,9 г/л лактозы, 10,0 г/л дрожжевого экстракта, 10,0 г/л пептона. Культивацию проводили в шейкере-инкубаторе при 28 °С, 250 об/мин, 24 ч. Для биосинтеза ксантана использовали среду с сухой деминерализованной молочной сывороткой. На основании результатов элементного анализа выбранного сырья установили, что фактором, ограничивающим применение молочной сыворотки, является высокое содержание азота (1,77 %) (табл. 1).

Таблица 1

Элементный состав молочной сыворотки*

Элемент	Содержание, %
C	39,75±3,95
H	6,90±2,79
N	1,77±0,63

*Число параллельных опытов n = 3, доверительная вероятность p = 95%

Исходя из данных элементного анализа сырья рассчитали количество компонентов питательной среды (табл. 2) с целью сохранения оптимального соотношения C:N в среде. В качестве контроля использовалась стандартная среда (табл. 2), указанная в паспорте штамма, с концентрацией глюкозы 20 г/л. Посевной материал – двухсуточный инокулят продуцента – вносили в количестве 5 %. Биосинтез ксантана осуществляли в шейкере-инкубаторе в

аналогичных условиях в течение 72 ч в колбах со 100 мл питательной среды. Ксантан осаждали из нативного раствора ацетоном (осч). Очистку проводили трехкратным переосаждением ацетоном из воды. Выход продукта на экспериментальной среде составил 3,70 г/л, что ниже контрольного опыта на 18,1 % (4,52 г/л).

Таблица 2

Компонент	Содержание г/л	
	Экспериментальная среда	Контрольная среда
Сухая молочная сыворотка	18,8	–
Глюкоза	4,5	20,0
Дрожжевой экстракт	–	3,0
KH_2PO_4	2,0	2,0
K_2HPO_4	2,0	2,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,1

Идентификацию продукта проводили методом ИК-спектроскопии. В качестве эталона использовали коммерческую ксантановую камедь (ИП Нимченко, Москва). Как видно из ИК спектров, все образцы имеют идентичные полосы поглощения при одинаковых волновых числах (рис. 1).

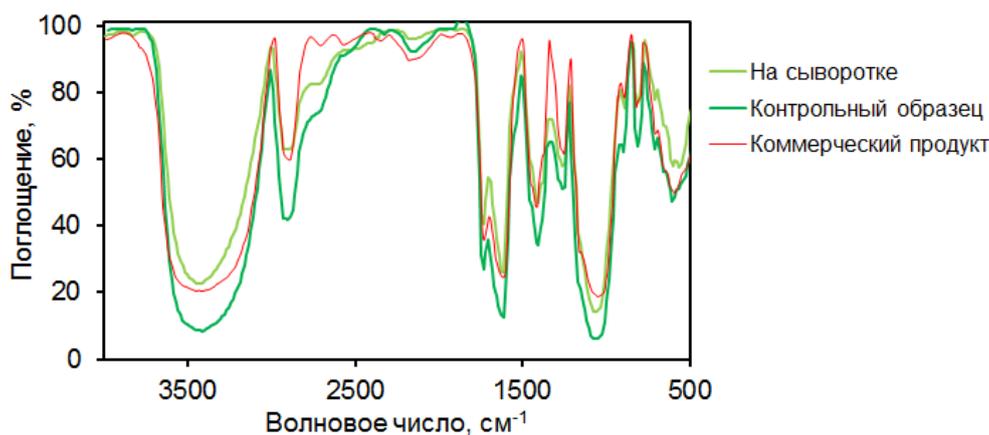


Рисунок 1. ИК-спектры образцов ксантана

На основе полученного результата сделали вывод, что выделенный полисахарид имеет те же спектральные характеристики, что и используемый стандарт.

Таким образом, было установлено, что применение молочной сыворотки в биосинтезе ксантана с использованием выбранного нами штамма *X. campestris* В-6719 является возможным и перспективным. Дальнейшие исследования по предварительной подготовке сырья, направленной на снижение количества N в сыворотке до оптимальной концентрации, например, с отделением белков методом микрофльтрации, а также эксперименты по оптимизации питательной среды с целью увеличения выхода продукта позволят сократить расход дорого компонента (глюкозы), снизить себестоимость ксантановой камеди, а также целесообразно утилизировать крупномасштабный пищевой отход.

Благодарности. Исследования выполнены за счет совместного гранта Российского научного фонда и Правительства Свердловской области № 24-16-20054, <https://rscf.ru/project/24-16-20054/>.

Библиографический список

1. Nery T., Brandão L., Esperidião M., Druzian J. Biosíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade. *Quimica Nova*, 2008. Vol. 31. №8. P. 1937-1941.
2. Niknezhad S., Asadollahi M. A., Zamani A., Biria D., Doostmohamadi M. Optimization of Xanthan Gum Production using Cheese Whey and Response Surface Methodology. *Food science and biotechnology*, 2015. Vol. 24. №2. P. 453-460.
3. Savvides A., Katsifas E., Hatzinikolaou D., Karagouni A.D. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* using whey permeate medium. *World journal of microbiology & biotechnology*, 2012. Vol. 28. P. 2759-2764.

УДК 581.142

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕЗИНФЕКЦИИ ЭКСПЛАНТОВ, КАК ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ЭТАПА МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ФИАЛКИ ОБЫКНОВЕННОЙ

Н.И. Бондарева, Д.Г. Маглакелидзе

Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Россия

В данной работе представлено исследование по влиянию типа дезинфицирующего раствора (ДР) на возможность каллусообразования фиалки обыкновенной. Так, для введения в культуру, использовали модифицированную индолилуксусной кислотой среду Мурасиге-Скуга. В качестве исследуемых ДР использовали перекись водорода и гипохлорит натрия. В результате анализа полученных данных установлено, что доступным и эффективным дезинфицирующим веществом, который препятствует контаминации образцов во время микроклонального размножения и не сопровождается гибелью клеток исследуемой культуры является 3% раствор гипохлорита натрия.

Ключевые слова: микроклональное размножение, введение в культуру, дезинфицирующие вещества, explants растений, фиалка обыкновенная.

DEVELOPMENT OF A METHODOLOGY FOR DISINFECTION OF EXPLANTS AS A TECHNOLOGICAL STAGE OF MICROCLONAL PROPAGATION OF COMMON VIOLET

N.I. Bondareva, D.G. Maglakelidze

Stavropol State Medical University, Stavropol, Russia

This paper presents a study on the influence of the type of disinfectant solution (DS) on the possibility of callus formation of common violet. Thus, for induction into culture, Murashige-Skoog medium modified with indolylacetic acid was used. Hydrogen peroxide and sodium hypochlorite were used as investigated DSs. As a result of analysis of the obtained data it was found that 3% sodium hypochlorite solution is an available and effective disinfectant, which prevents contamination of samples during microclonal propagation and is not accompanied by cell death of the culture under study.

Keywords: microclonal propagation, introduction into culture, disinfectants, plant explants, common violet.

Микроклональное размножение растений является одной из наиболее значимых и широко используемых технологий в современной биотехнологии и сельском хозяйстве. Этот метод позволяет получать большое количество генетически идентичных растений в короткие сроки, что имеет критическое значение для сохранения редких и исчезающих видов, улучшения сортовых характеристик, а также для массового производства растений, востребованных в коммерческих целях [1]. Ключевым аспектом этого процесса является подготовка исходного растительного материала — explantов. Эффективная дезинфекция explantов играет решающую роль в успешности микроклонального размножения, так как предотвращает развитие патогенных микроорганизмов, которые могут вызвать загрязнение культур и снизить выход здоровых растений.

Процесс дезинфекции explantов представляет собой комплекс процедур, направленных на уничтожение патогенов и сохранение стерильности растительных тканей. Важно отметить, что недостаточная дезинфекция может привести к росту бактерий и грибов, что в конечном итоге

приведет к гибели культур [2]. С другой стороны, чрезмерная обработка может повредить клетки эксплантов, снизив их жизнеспособность и регенеративные способности. Следовательно, выбор оптимальных условий дезинфекции, таких как концентрация и время воздействия антисептических средств, является критическим этапом в разработке методики микроклонального размножения. Так, в последние годы наблюдается значительный рост интереса к микроклональному размножению различных видов растений, включая декоративные, сельскохозяйственные и лекарственные культуры. Данный метод позволяет не только эффективно воспроизводить растения с желаемыми характеристиками, но и ускорять процесс селекции, улучшая адаптационные свойства и устойчивость к неблагоприятным условиям окружающей среды [3]. В контексте глобальных изменений климата и увеличения потребности в устойчивых сельскохозяйственных системах, микроклональное размножение становится все более актуальным и востребованным.

Таким образом, для успешного введения в культуру и каллусообразования исследуемого растительного объекта, необходимы совершенные методы пробоподготовки эксплантов, включающие в себя обработку дезинфицирующими растворами (ДР). В связи с этим, целью работы стала разработка оптимальной методики дезинфекции эксплантов, как технологического этапа микроклонального размножения на примере фиалки обыкновенной.

Так, для изучения влияния типа дезинфицирующего вещества использовали наиболее распространенные: 3% раствор гипохлорит натрия (Омега-Дент, Россия) и 3% раствор перекиси водорода (Росбио, Россия). В качестве культуры для микроклонального размножения использовали фиалку обыкновенную (*Viola riviniana*)

На первом этапе микроклонального размножения растений приготовили агаризованную питательную среду Мурасиге-Скуга (БиолоТ, Россия), содержащую эссенциальные макро- и микроэлементы, витамины, сахарозу и хелат железа. Также, питательную среду модифицировали фитогормоном – индолилуксусной кислотой (ИУК) (Green Agrolab, Россия), концентрация которого составила 3 мг/л. Полученную среду разливали в обработанные чаши Петри по 20-30 мл. Для минимизации рисков контаминации чаш и образцов, эксперимент проводили под действием УФ-лампы и над пламенем спиртовой горелки. Для лабораторного исследования формировали по 3 стебельных экспланта фиалки с параметрами: длина 3-5 мм, диаметр 0,5-2 мм. Далее, проводили подготовку образцов с использованием ДР следующим образом: подготовленные экспланты помещали на 55 секунд в ДР, затем образцы перемещали на 85 секунд в дистиллированную воду, после чего их вводили в подготовленную среду. Так, экспланты фиалки культивировали при 27°C в термостате ТС-1/80 СПУ (Смоленское СКТБ, Россия). Результаты фиксировали спустя 5,10,15,20,25 и 30 суток экспозиции (таблица 1).

Таблица 1

Результаты изучения влияния типа дезинфицирующего раствора на возможность каллусообразования фиалки обыкновенной

Наименование серии	Дез. раствор	Время экспозиции					
		5	10	15	20	25	30
А	Гипохлорит натрия	0*	0	+	+	+	+
Б	Перекись водорода	0	0	-	-	-	-

*примечание: «+» – каллусообразование, «0» – отсутствие каллуса, «-» – гибель культуры

Анализ полученных результатов показал, что спустя 10 суток экспозиции, во всех образцах отсутствовали видимые изменения в росте и развитии культур. Данный период сопровождается начальным этапом роста и адаптацией к условиям питательной среды. На 15 сутки, в серии с перекисью наблюдались деградация и гибель клеток растения, обусловленные появлением темно-коричневых пятен на экспланте. В свою очередь, в образцах серии А началось

формирования полупрозрачных клеточных тканей, имеющих аморфную структуру. Так, в каждой временной точке фиксации результатов серии А объем каллусной ткани увеличивался, что говорит о возможности применения гипохлорита натрия в качестве дезинфицирующего раствора на этапах пробоподготовки эксплантов для введения в культуру.

Установлено, что перекись водорода проявляет агрессивный дезинфицирующий эффект по отношению к тканям фиалки. Объясняется это тем, что биохимические компоненты, входящие в состав клеточной структуры тканей культуры, подвергаются значительному окислению, высвобождающегося кислорода и пероксидных групп ДР, поэтому данный процесс приводит к гибели клеток растения.

Таким образом можно заключить, что доступным и эффективным дезинфицирующим веществом, который препятствует контаминации образцов во время микроклонального размножения – является 3% раствор гипохлорита натрия. В дальнейшем, планируется изучение влияния внешних условий (температура, влажность) и типа фитогормона на возможность каллусообразования различных культур.

Библиографический список

1. Демидчик В. В. и др. Микроклональное размножение растений //Наука и инновации. 2019. №. 6 (196). С. 4-11.
2. Султонова К. Р., Кушиев Х. Х. Микроклональное размножение *Lagochilus inebrians bunge* в условиях *in vitro* //Бюллетень науки и практики. 2022 Т. 8. №. 9. С. 79-85.
3. Мизанбекова А. и др. Микроклональное размножение растений //Экономика и социум. 2022. №. 2-2 (93). С. 1142-1148.

УДК 630*232

ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ СТИМУЛЯТОРОВ НА УКОРЕНЕНИЕ ЧЕРЕНКОВ ТОПОЛЯ «ПИРАМИДАЛЬНО- ОСОКОРЕВЫЙ КАМЫШИНСКИЙ»

Л.В. Брындина, Л.А. Репникова, А.Ю. Корчагина, Д.И. Живитченко

Воронежский государственный лесотехнический университет им Г.Ф. Морозова

Проведена сравнительная оценка влияния аминокислот, белковых гидролизатов и рыночных стимуляторов на укоренение черенков тополя «Пирамидально- осокоревый Камышинский». Установлена высокая эффективность обработки черенков препаратом Алга Супер и гидролизатом коллагена. Формирование зеленой массы черенков лучше всего протекала после воздействия коллагена.

Ключевые слова: гидролизат коллагена, биостимулятор растений, укоренение черенков, аминокислотный стимулятор.

THE EFFECT OF AMINO ACID STIMULANTS ON THE ROOTING OF POPLAR CUTTINGS «PYRAMIDAL-SEDGE KAMYSHINSKY»

L.V. Bryndina, L.A. Repnikova, A.Y. Korchagina, D.I. Zhivitchenko

Voronezh State University of Forestry and Technologies named after G.F. Morozov

A comparative assessment of the effect of amino acids, protein hydrolysates and market stimulants on the rooting of poplar cuttings «Pyramidal-sedge Kamyshinsky» was carried out. High efficiency of treatment of cuttings with Alga Super preparation and collagen hydrolysate has been established. The formation of the green mass of cuttings proceeded best after exposure to collagen.

Keywords: collagen hydrolysate, plant biostimulator, rooting of cuttings, amino acid stimulator.

Создание зеленых зон городов является одной из важнейших мер борьбы с антропогенным загрязнением. Формирование устойчивых к негативным факторам окружающей среды растений диктует детальный подбор их сортов. Одним из растений, наиболее выносливых к загрязнениям, считается тополь. У него колоссальная поглощающая способность. За вегетационный сезон дерево поглощает 180 кг углекислого газа и выделяет 30 кг кислорода. Взрослый тополь (25-30 лет) в разы эффективнее взрослой ели, липы, клена, дуба, березы, рябины [1].

Среди видового многообразия тополей широко используются в озеленении черные пирамидальные. Но из-за их южного происхождения, черные пирамидальные тополя отличаются низкой зимостойкостью и плохой приживаемостью. Для повышения этих характеристик пирамидальных тополей наиболее перспективным способом является черенкование. На эффективность укоренения влияет множество факторов (температура, влажность, возраст материнского дерева, возраст и размер черенков). Качество посадочного материала улучшается после обработки черенков биологически активными веществами [2-7]. Среди известных укоренителей растений – индолил-3-масляная кислота ИМК), ризопол, корневин, Алга Супер, аминозол. Большинство из них в качестве действующего вещества содержат ИМК и добавки в виде аминокислот. Установлено, что аминокислоты легко поглощаются и могут напрямую использоваться растениями [8]. В связи с этим целью исследования было выяснить влияние на корнеобразование черенков тополя «Пирамидально- осокоревый Камышинский» аминокислотных стимуляторов и отдельных аминокислот.

Черенки тополя отбирали с маточного растения в период глубокого физиологического покоя (в феврале 2022г), замачивали в течение суток в биостимуляторе (3% раствор). Контролем выступали черенки, замоченные в воде. После подготовки черенки пересаживали в контейнеры и помещали в теплице питомнического комплекса Воронежской области. Эксперимент проводили при температуре от +20°C до +25°C, влажности воздуха 70 %. В качестве почвы применяли торфообогатенный субстрат. Через 30 суток определяли линейные размеры и фитомассу черенков.

Экспериментальные данные, представленные в таблице, показали, что отдельные аминокислоты проявляли неоднозначный стимулирующий эффект. Положительное влияние на корнеобразование оказывали триптофан и аспарагиновая кислота. Это можно объяснить давно доказанным действием этих аминокислот на образование ростовых веществ.

Таблица 1

Образование корней у черенков тополя «Пирамидально- осокоревый Камышинский» через 30 дней

Биостимулятор	Масса корня, г	Число образованных корней, через 30 суток
Контроль	0,0166	5 развиты хорошо
Аланин	0,0029	1 маленький, развит слабо
Триптофан	0,0590	12 развиты хорошо
Глутаминовая кислота	0,0205	4 развиты хорошо
Аспарагиновая кислота	0,0220	3 развиты хорошо
Лизин	0,0116	1 маленький, развит слабо
Лейцин	0,0115	3 маленькие, развиты слабо
Аргинин	0,0006	1 маленький, развит слабо
Гистидин	0,0053	2 маленькие, развиты слабо
Глицин	0,0024	3 маленькие, развиты слабо
Валин	0,0131	1 маленький, развит слабо
Кератин	0,0191	6 развиты хорошо
Коллаген	0,1055	10 развиты хорошо
Эластин	0,0790	7 развиты хорошо
Пептон	0,0506	6 развиты хорошо
Аминозол	0,0574	5 развиты хорошо
Алга Супер	0,1278	12 развиты хорошо
Корневин	0,0519	3 развиты хорошо
Ризопон	0,0042	1 маленький, развит слабо
Индол-3-масляная кислота	0,0042	2 маленькие, развиты слабо

Триптофан способствует активному формированию корневой системы благодаря синтезу гетероауксина. Аспарагиновая кислота, являясь строительным материалом для других аминокислот, стимулирует образование β -аланина [9].

По данным, представленным в таблице, следует отметить, что при разном количестве образованных корневых отростков после обработки аминокислотом, корневин, пепсином и триптофаном общая масса сформированной корневой системы была практически одинаковой.

Алга Супер проявлял самую высокую способность в стимуляции корнеобразования у черенков. Превышение относительно контроля составило почти в 8 раз. При этом накопление зеленой массы было низким.

Высокую эффективность показала выдержка черенков в растворе коллагена. Корнеобразование лишь на 17,5 % было ниже, чем после обработки Алга Супер. А наращивание листовой массы, напротив, на 62,9% было слабее при обработке черенков Алга Супер.

Хуже всего образование зеленой массы растений происходило после обработки аргинином, гистидином и глицином, так как эти аминокислоты в большей степени стимулируют формирование плодов у растений (рисунок).

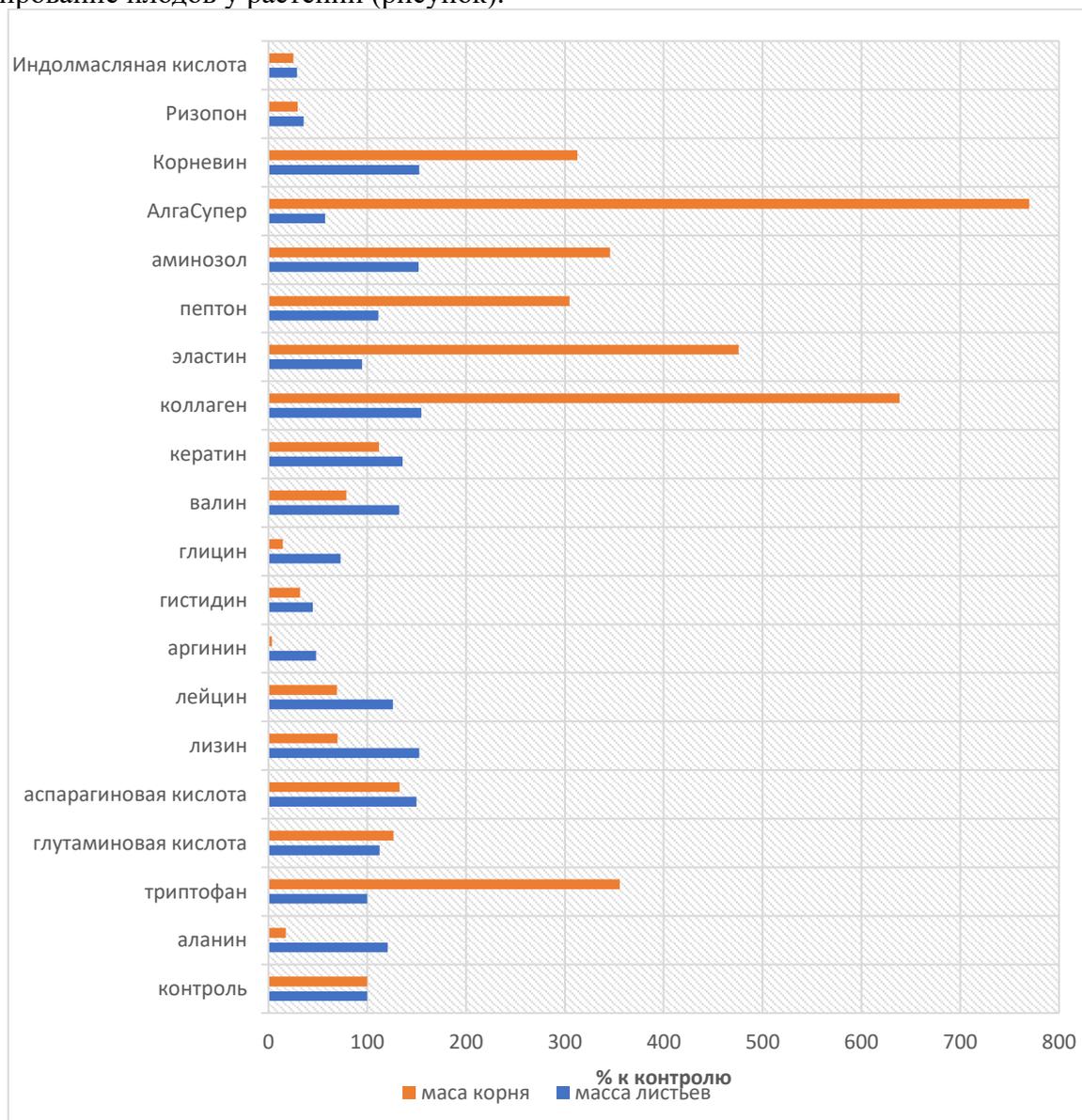


Рисунок 1. Морфогенез корневой и зеленой массы черенков тополя «Пирамидально-осокоревый Камышинский»

В проведенных экспериментах не удалось также получить хорошие результаты после обработки ИМК. Хотя она играет ключевую роль в стимуляции роста и развития растений, считается наиболее эффективным стимулятором корнеобразования. Воздействие кератина на формирование корешков растения было несколько выше контрольного, но значительно уступало другим белковым гидролизатам. Кератин в большей степени влиял на формирование зеленой массы и способствовал ее увеличению. Несмотря на высокое содержание отдельных аминокислот в рассматриваемых гидролизатах, нам не удалось установить связь между влиянием этих аминокислот на укоренение черенков. Так все гидролизаты содержат высокие доли глутаминовой кислоты, но обработка чистым препаратом этой кислоты не приводила к высоким эффектам, которые давали гидролизаты. Экспериментально доказано, что именно комбинированное действие аминокислот усиливало общий эффект укоренения.

Таким образом, проведенные исследования показали, положительное влияние на укоренение черенков тополя «Пирамидально- осокоревый Камышинский» Алга Супер и коллагена. Корневая масса черенков при обработке этими препаратами в 7,7 и 6,4 раза соответственно превышала контроль.

Библиографический список

1. Абрамов А. Тополя проклинают, а зря: Деревьям просят дать второй шанс в городах/Комсомольская правда. 30 июня 2022. - URL:<https://www.kp.ru/daily/27412/4611038/> .
2. Скамарохова А.С., Кравченко Р.В., Петенко А.И., Гнеуш А.Н. Влияние нового органоминерального биоудобрения на проращивание семян различных сортов озимой вики. Материалы Юбилейной научно-практической конференции, посвященной 100-летию Кубанского ГАУ. Итоги научно-исследовательской работы за 2021 год. Краснодар, 2022, С. 47-49.
3. Петенко А.И., Жолобова И.С., Анискина М.В. и др. Влияние биорастворов на рост и прорастание семян сельскохозяйственных культур, а также на изменение их биохимических показателей. Аграрная Россия, 2020, № 9, С. 26-29.
4. Хорькова А.В., Анискина М.В. Биопрепараты для повышения урожая и защиты растений: опыт, результаты применения, перспективы. Материалы Национальной научно-практической конференции молодых ученых. Интеграционные взаимодействия молодых ученых в развитии аграрной науки. Краснодар, 2020, С. 204-206.
5. Петенко А.И., Жолобова И.С., Анискина М.В. и др. Влияние биорастворов на рост и прорастание семян сельскохозяйственных культур, а также на изменение их биохимических показателей. Аграрная Россия, 2020, № 9, С. 26-29.
6. Брындина Л.В., Евлаков П.М., Репникова Л.А., Корчагина А.Ю. Сточные воды как биостимулятор роста растений. VIII Международная научно-техническая конференция. Инновационные технологии в пищевой промышленности: наука, образование и производство. Воронеж, 2023, С. 274-278.
7. Брындина Л.В., Корчагина А.Ю., Репникова Л.А. Использование органических стимуляторов роста (на примере *betula pendula*). Материалы Национальной научно-практической конференции. Инновационное предпринимательство: проблемы и пути их решения. Воронеж, 2022, С. 128-131.
8. Аминокислоты в борьбе со стрессом у растений: сайт ООО «Научно-аналитический центр питания растений». - URL: <http://agro-analiz.com/index.php/publikatsii/stati/244-aminokisloty-v-borbe-so-stressom-u-rastenij?ysclid=lp085wbxyc246122834> .
9. Аминокислоты в составе удобрений и их роль в развитии растений: сайт Югполиив. – URL:<https://yug-poliv.ru/article/aminokisloty-v-sostave-udobreniy-i-ikh-rol-v-razvitiirasteniy/?ysclid=lp08q7sihh366218042> .

УДК 543.061

**БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ МХА *POLYTRICHUM COMMUNE*:
ЭКСТРАКЦИОННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА**

Н.А. Будаев, А.В. Фалёва, Н.В. Ульяновский, Д.И. Фалёв, А.А. Онучина, Д.С. Косяков
Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова
г. Архангельск, Россия

В данной работе проведена оптимизация экстрактивного выделения биологически активных компонентов мха *Polytrichum commune* методом жидкостной экстракции под давлением методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием ультрафиолетового-спектрофотометрического детектора.

Ключевые слова: бриофиты, полифенолы, масс-спектрометрия, антиоксидантная активность.

**BIOLOGICALLY ACTIVE COMPONENTS OF MOSS *POLYTRICHUM COMMUNE*:
EXTRACTION AND PROPERTIES**

N.A. Budaev, A.V. Faleva, N.V. Ulyanovskii, D.I. Falev, A.A. Onuchina, D.S. Kosyakov.
Northern (Arctic) Federal University, Arkhangelsk, Russia

In this study, we optimized the extractive isolation of biologically active compounds from the moss *Polytrichum commune* through pressurized liquid extraction, and we analyzed the polyphenol content using high-performance liquid chromatography with UV spectrophotometric detection.

Keywords: bryophytes, polyphenols, mass-spectrometry, antioxidant activity.

Введение. Моховидные — это разнообразная группа растений, включающая около 14 000 видов *Bryophyta*, 6000 видов *Marchantiophyta* и 300 видов *Anthocerotophyta*. Они обитают практически во всех экосистемах и выполняют важные экологические функции [1]. Несмотря на отсутствие развитых физических защитных структур, моховидные редко потребляются животными и атакуются патогенами. Они выработали способность синтезировать широкий спектр вторичных метаболитов с различными функциями, включая фитотоксичность, антибактериальную и противогрибковую активность, а также защиту от насекомых. Эти метаболиты также помогают моховидным справляться с такими видами стресса как ультрафиолетовое излучение, засуха и заморозки. Сегодня продолжают исследования описанного класса соединений и открываются новые соединения в моховидных, которые могут иметь практическое применение, особенно в условиях растущей устойчивости болезней к лекарственным средствам [2, 3].

Одним из самых распространенных мхов в умеренных и бореальных широтах Северного полушария является вид *Polytrichum commune*, принадлежащий к семейству *Polytrichaceae* и известный как Кукушкин лен. Это растение на протяжении долгого времени применялось в традиционной медицине в качестве противовоспалительного средства, а также для лечения пневмонии и туберкулеза легких [4].

Целью работы являлось эффективное выделение биологически активных компонентов мха *Polytrichum commune* методом жидкостной экстракции под давлением.

Материал и методика исследований. Растительное сырье было собрано в пределах Архангельской области, высушено при комнатной температуре и измельчено в ультрацентрифужной мельнице до размера частиц 1 мм.

Жидкостная экстракция под давлением для извлечения полифенольных соединений была выбрана вследствие возможности работы в широком диапазоне температур и использования любых комбинаций растворителей.

Большую важность имеет оптимизация метода, то есть, нахождения таких условий процесса, которые бы приводили к наиболее высокому содержанию ценных компонентов. Оптимизация жидкостной экстракции под давлением состояла из серии экспериментов длительностью 45 мин, при следующих температурах – 75, 100, 125 и 150°C –, а также с использованием 3 типов экстрагентов – неполярный растворитель гексан, апротонный растворитель ацетон и метанол, как растворитель, способный извлекать широкий круг соединений.

Анализ полученных экстрактов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии был проведен на ВЭЖХ системе, состоящей из хроматографа LC-30 Nexera (Shimadzu, Япония) с насосом LC-30AD и системой градиента низкого давления, вакуумного дегазатора DGU-20A5R, автосамплера SIL-30AC, колоночного термостата CTO-20A и диодно-матричного детектора SPD-M20A.

Хроматографическое разделение было проведено на колонке ZORBAX Eclipse Plus C18 (Agilent, США), 3.0 × 150 мм с силикатным сорбентом размер частиц которого составляет 3.5 мкм. Подвижная фаза состояла из двух растворителей – вода (А) и ацетонитрил (Б), содержащий 0.1% муравьиной кислоты. Скорость потока – 0.5 мл/мин. Программа градиента: 0-2 мин 70% А, 2-30 мин 30% А, 30-31 мин 100% Б, 32-33 мин 30% Б, 33-37 мин 100% А. Температура колонки составляла 40°C, объем ввода – 2 мкл. Спектрофотометрическое детектирование было проведено в диапазоне длин волн от 220 до 660 нм.

Полученные результаты и их обсуждение.

По итогу работы можно сделать следующие выводы – выходы экстрактов в оптимальных условиях, отображенные в табл. 1, разнятся незначительно, но отличаются по компонентному составу – гексан выделяет липофильные соединения и, таким образом показал худшие результаты, ацетон и метанол извлекают преимущественно полифенольные соединения, но метанол оказался наиболее эффективным растворителем при температуре 100 °С.

Таблица 1.

Выходы экстрактов в оптимальных условиях

<i>Растворитель</i>	<i>Выход, % от массы сухого мха</i>
Гексан	1.34
Ацетон	1.97
Метанол	2.11

На рис. 1 изображена хроматограмма экстракта мха *Polytrichum commune* в оптимальных условиях. На хроматограмме указаны времена удерживания ранее идентифицированных биологически активных соединений, указанных в табл. 2 [5, 6, 7].

Таблица 2.

Основные соединения и их времена удерживания

<i>Название соединения</i>	<i>Время удерживания, мин</i>	<i>Формула соединения</i>
Polycommunin A	7.65	$C_{46}H_{34}O_{16}$
3-hydroxyphloretin dimer	9.1	$C_{30}H_{26}O_{12}$

3-hydroxyphloretin trimer	9.91	$C_{45}H_{38}O_{18}$
3-hydroxyphloretin tetramer	11.5	$C_{60}H_{50}O_{24}$
3-hydroxyphloretin pentamer	12.5	$C_{75}H_{50}O_{30}$
Communin A	25.01	$C_{23}H_{18}O_3$

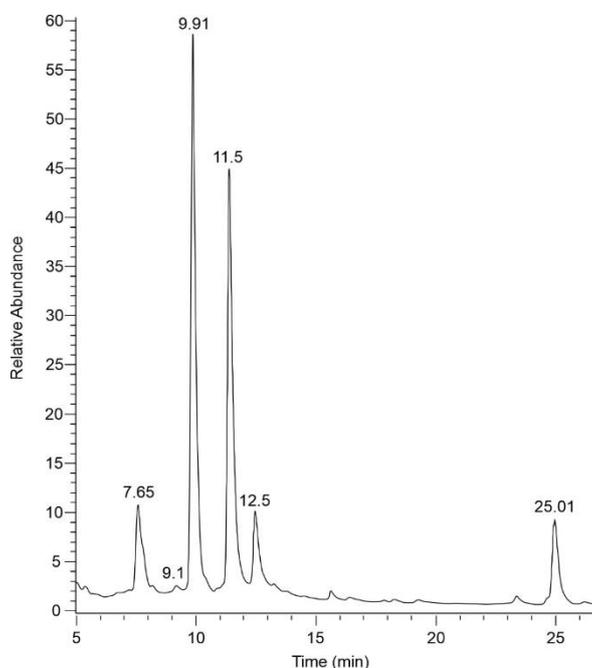


Рис. 1. Хроматограмма метанольного экстракта в оптимальных условиях экстракции (идентификация пиков по временам удерживания дана согласно табл. 2).

По полученным графикам зависимости выхода соединений от температуры можно отметить, что 100°C является оптимальной температурой экстракции, при которой наблюдаются максимумы выходов ценных химических компонентов.

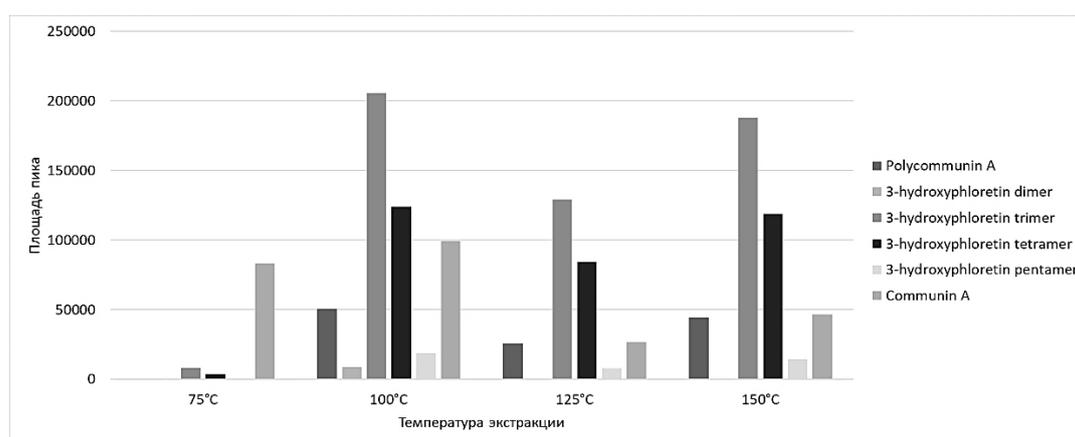


Рис. 2. Экстракция ацетоном – график зависимости площади пиков от температуры

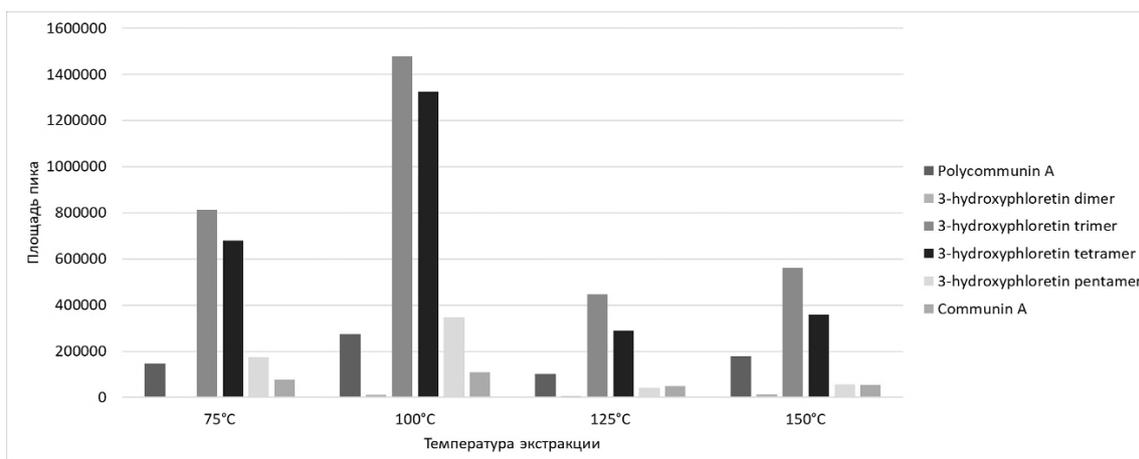


Рис. 3. Экстракция метанолом – график зависимости площади пиков от температуры

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства экономического развития, промышленности и науки Архангельской области, соглашение №6 от 23.04.2024 г.

Библиографический список

1. Asakawa, Y.; Ludwiczuk, A.; Nagashima, F. Chemical Constituents of Bryophyta. In Progress in the Chemistry of Organic Natural Products; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2012; pp. 563–605.
2. Chandra, S.; Chandra, D.; Barh, A.; Pankaj Pandey, R.K.; Sharma, I.P. Bryophytes: Hoard of remedies, an ethno-medicinal review. *J. Tradit. Complement. Med.* 2017, 7, 94–98.
3. Tuba Z, Slack NG, Stark LR, eds. *Bryophyte Ecology and Climate Change*. Cambridge University Press; 2011.
4. Guo, Z.-F.; Bi, G.-M.; Zhang, Y.-H.; Li, J.-H.; Meng, D.-L. Rare benzonaphthoxanthenones from Chinese folk herbal medicine *Polytrichum commune* and their anti-neuroinflammatory activities in vitro. *Bioorganic Chem.* 2020, 102, 104087.
5. Fu, P.; Lin, S.; Shan, L.; Lu, M.; Shen, Y.-H.; Tang, J.; Liu, R.-H.; Zhang, X.; Zhu, R.-L.; Zhang, W.-D. Constituents of the moss *Polytrichum commune*. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 1335–1337.
6. Faleva, A.V.; Ul'yanovskii, N.V.; Falev, D.I.; Onuchina, A.A.; Budaev, N.A.; Kosyakov, D.S. New Oligomeric Dihydrochalcones in the Moss *Polytrichum commune*: Identification, Isolation, and Antioxidant Activity. *Metabolites* 2022, 12, 974.
7. Faleva, A. V., Ulyanovskii, N. V., Budaev, N. A., Falev, D. I., Onuchina, A. A., Belesov, A. V., & Kosyakov, D. S. (2024). Polycommunin A, a dihydrocinnamoyl bibenzyl isolated from the moss *Polytrichum commune*, and its antioxidant activity. *Natural Product Research*, 1–7.

УДК 633.81:58.085

СТРУКТУРНАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ, КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ ЭФИРНОГО МАСЛА ФОРМ *HYSSOPUS OFFICINALIS* *IN VITRO* И *EX SITU*

**И.В. Булавин, Н.Н. Мирошниченко, Н.М. Саплев, С.А. Феськов, Д.К. Солдатов,
В.Д. Конобеев, Д.И. Калмыкова, Н.Н. Иванова**

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, Ялта, Россия

В работе представлены результаты структурных исследований, анализа уровня ploidy, генетического сходства *Hyssopus officinalis in vitro* в сравнении с растениями *ex situ*, а также данные о компонентном составе эфирного масла регенерантов *ex vitro*. Установлены вариации количества поверхностных структур листовых пластинок, качественные и количественные анатомические изменения органов, а также структурные перестройки при повышенных концентрациях 6-бензиламинопурина. Показано отсутствие геномных и генетических изменений, вариаций в компонентном составе эфирного масла.

Ключевые слова: иссоп лекарственный, культура *in vitro*, анатомия, ploidy, ПЦР-анализ, газовая хроматография.

STRUCTURAL AND GENETIC STABILITY, ESSENTIAL OIL COMPONENT COMPOSITION OF THE *HYSSOPUS OFFICINALIS* FORMS *IN VITRO* AND *EX SITU*

**I.V. Bulavin, N.N. Miroshnichenko, N.M. Saplev, S.A. Feskov, D.K. Soldatov, V.D. Konobeev,
D.I. Kalmykova, N.N. Ivanova**

Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of the RAS, Yalta, Russia

The paper presents the results of the structural investigation, ploidy level, and genetic similarity analysis of *Hyssopus officinalis in vitro* compared with *ex situ* plants, as well as data on the component composition of the essential oil of regenerants *ex vitro*. Variations in the number of leaf surface structures, qualitative and quantitative anatomical changes in organs, and structural changes at 6-benzylaminopurine elevated concentrations were established. The absence of genomic and genetic changes and variations in the component composition of the essential oil was shown.

Keywords: common hyssop, *in vitro* culture, anatomy, ploidy level, PCR-analysis, gas chromatography.

Иссоп лекарственный (*Hyssopus officinalis* L.) является перспективным эфиромасличным, пряно-ароматическим, лекарственным растением-интродуцентом, родина которого – Средиземноморье. В культуре и природе растение встречается в Западной Европе, Северной Америке, Европейской части России, предгорье Алтая. Растительное сырье и эфирное масло иссопа используют в фармации, парфюмерии и пищевой отрасли [10]. *H. officinalis* обладает превосходными фитонцидными свойствами, является ценным медоносом. Это растение используется в народной медицине для лечения различных заболеваний, таких как бактериальные и грибковые инфекции, астма, а также кашле, потере аппетита, спазмах и поранениях. Во Франции, Португалии, Румынии, Швеции и Германии *H. officinalis* включен в официальные фармакопеи и также активно используется в пищевой промышленности [8].

Производство лекарственных растений с использованием технологии *in vitro* стало популярным из-за их востребованности, возможности обеспечить необходимый выход материала за короткий период времени, стабильности получения здоровых элитных генотипов,

а также сохранению растений [12]. Тем не менее, при размножении растений в культуре *in vitro* могут наблюдаться структурные [11-13], геномные и генетические изменения [2, 14, 16]. Более того, отмечается важность неизменного состава вторичных метаболитов после клонального микроразмножения для лекарственных растений как источника биологически активных веществ [16]. Поэтому целью работы было исследование анатомического строения *H. officinalis in vitro*, уровня плоидности, генетического сходства с материнскими растениями и компонентного состава эфирного масла регенерантов *ex vitro*.

Культивирование микропобегов *H. officinalis* ‘Никитский Белый’ (f. *albus*), f. *ruber* и f. *cyaneus*, индукцию ризогенеза и адаптацию регенерантов *ex vitro* проводили согласно опубликованным методам [6, 7]. Подготовку растительного материала к анатомическим исследованиям выполняли общепринятым способом [3], а также согласно методике, разработанной ранее [7]. Анализ уровня плоидности проводили на свежем материале [15]. Тотальную ДНК выделяли из молодых неповрежденных листьев растений *ex situ* и микропобегов *in vitro* классическим способом [4]. ПЦР выполняли с применением набора БиоМастер HS-Таг ПЦР (2×) (Биолабмикс, РФ), RAPD,- ISSR-, SRAP-праймерами [6, 17] и ДНК в концентрации 20 нг. Амплификацию проводили в термоциклере C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Сингапур). Условия для RAPD,- ISSR-, SRAP-ПЦР были аналогичны опубликованным ранее [6, 17]. Массовую долю эфирного масла определяли методом гидродистилляции на аппаратах Гинзберга [1] в свежесобранном сырье материнских растений *ex situ* и регенерантов *ex vitro* после 6 месяцев культивирования *in vitro*, адаптации и трех лет культивирования в условиях открытого грунта. Компонентный состав эфирных масел устанавливали с помощью аппаратно-программного комплекса на базе хроматографа «Хроматэк-Кристалл 5000.2», оснащенного масс-спектрометрическим детектором [15].

Лист является основным вегетативным органом растения, обеспечивающим образование ассимилятов, способствующих дальнейшему росту и развитию организма. Поскольку давно известна связь структуры органа с выполняемыми им функциями, можно предположить, что изменения анатомии листовой пластинки могут влиять и на ее функциональность.

Исследования поверхности листовых пластинок *H. officinalis* f. *albus*, f. *ruber* и f. *cyaneus ex situ* показали, что листья амфистоматические, при этом на абаксиальной поверхности количество устьиц больше. Кроющие, железистые трихомы и пельтатные железки обнаруживали как на адаксиальной, так и на абаксиальной сторонах.

При культивировании микропобегов *H. officinalis* ‘Никитский Белый’ и двух форм *in vitro* листья остаются амфистоматическими, на абаксиальной поверхности сохраняется преобладающее количество устьиц, большая часть которых открыты. Следует отметить тенденцию к снижению их количества, в сравнении с таковым на поверхности листовых пластинок микропобегов *ex situ*. Количество кроющих трихом увеличивается, в то время как число пельтатных железок уменьшается.

При адаптации амфистоматичность, соотношение устьиц, а также формирование разного типа кроющих и железистых структур на поверхности листовых пластинок также сохраняется. Количественный анализ (данные не представлены) выявил снижение числа устьиц, в сравнении с таковым листовых пластинок побегов и микропобегов *ex situ* и *in vitro*, соответственно. На данном этапе клонального микроразмножения отмечается большая закрытость устьичного аппарата. Количество кроющих трихом меньше, чем на поверхности листовых пластинок микропобегов *in vitro*, однако сравнительно больше, чем на поверхности листьев побегов *ex situ*. Число пельтатных железок увеличивается, сравнительно с материалом *in vitro*, однако ниже, чем у листьев *ex situ*.

При анализе структуры листовых пластинок *H. officinalis* ‘Никитский Белый’ и f. *cyaneus ex situ* на поперечных срезах в области центральной жилки (рис. 1, А) выделяли эпидерму, клетки которой на внешней тангентальной стороне были покрыты кутикулой, несколько субэпидермальных слоев колленхимы в верхней и нижней частях, овальный проводящий пучок,

состоящий из ксилемы и флоэмы, клетки паренхимы. В боковой части листа (рис. 1, Б) различали эпидерму, также покрытую кутикулой, столбчатый и губчатый мезофилл. Листья микропобегов *in vitro* при введении оптимальных концентраций регулятора роста (0,3-0,5 мг/л 6-БАП) имели сходное строение (рис. 1, В, Г). При этом отмечены некоторые качественные изменения: меньшее развитие кутикулярного слоя, колленхимы, проводящего пучка, в частности количества элементов ксилемы и флоэмы. Исследования количественных показателей *H. officinalis* f. *cyaneus ex situ* и *in vitro* (данные не представлены) показали статистически достоверное уменьшение высоты среза листа в области центральной жилки и боковой части, высоты и ширины клеток верхней эпидермы, столбчатого и губчатого мезофилла.

При культивировании *H. officinalis* f. *cyaneus* на питательной среде с 0,8 мг/л 6-БАП (рис. 1, Д, Е) отмечали слабое развитие колленхимы, варианты с тангентально вытянутой центральной жилкой, увеличение количества слоев губчатого мезофилла. Исследования количественных анатомических показателей на поперечных срезах листовых пластинок (данные не представлены) выявили статистически достоверное увеличение линейных значений исследованных показателей на среде, содержащей 0,8 мг/л 6-БАП, сравнительно с таковой, дополненной 0,4 мг/л 6-БАП, а также листьев побегов *ex situ*.

Строение листьев регенерантов *ex vitro* рассмотрено нами на примере *H. officinalis* f. *ruber*. Показано, что общий план строения листовых пластинок *ex vitro* был подобен таковому *ex situ* (рис. 1, Ж, З). При этом отмечали снижение степени развития кутикулярного слоя и клеток колленхимы. Исследования количественных анатомических показателей на поперечных срезах листовых пластинок (данные не представлены) выявили статистически достоверное уменьшение высоты листа в области центральной жилки и его боковой части, размеров клеток верхней и нижней эпидермы, проводящего пучка, высоты губчатого и столбчатого мезофилла.

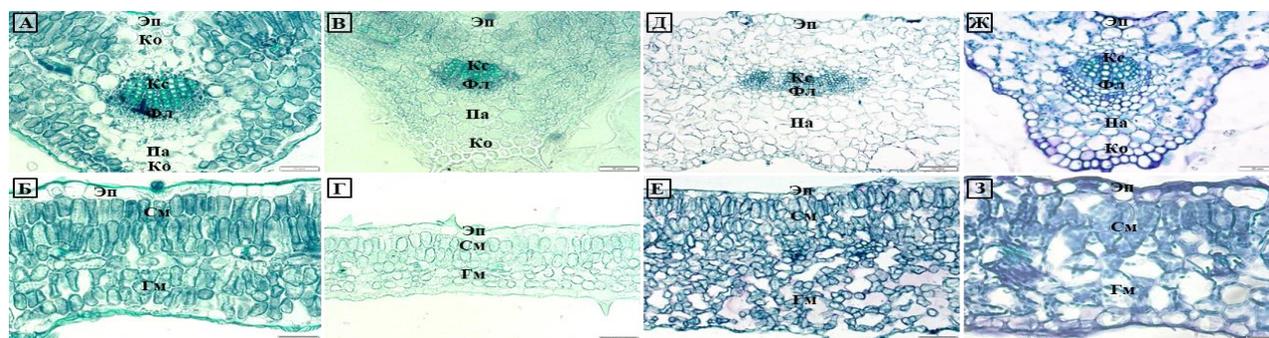


Рис. 1. Поперечные срезы листовых пластинок *Hyssopus officinalis ex situ* (А, Б) *in vitro* (В-Е) и *ex vitro* (Ж, З). Гм – губчатый мезофилл, Ко – колленхима, Кс – ксилема, Па – паренхима, См – столбчатый мезофилл, Фл – флоэма, Эп – эпидерма.

В культуре *in vitro* влиянию может подвергаться геном растительного материала, т.е. происходит соматическая изменчивость – спонтанный мутагенез [14]. На уровень плоидности материала, в определенной степени влияют различные факторы: способ индукции морфогенеза (прямой/непрямой), тип экспланта (семядоли, гипокотили, настоящие листья, корни) [9], тип/ы регулятора/ов роста, его/их концентрация и соотношения [5], а также срок культивирования [15].

Нами показано, что при непродолжительном культивировании микропобегов *H. officinalis* ‘Никитский Белый’ на модифицированной питательной среде МС с оптимальной концентрацией 6-БАП изменения уровня плоидности выявлены не были. Подобные результаты также получены для микропобегов *H. officinalis* f. *cyaneus*, субкультивируемых *in vitro* в течение пяти месяцев на среде того же состава, дополненной 6-БАП в концентрации 0,3 мг/л. При анализе ядер из образцов листьев витрифицированного материала *H. officinalis* f. *cyaneus in vitro* на питательной среде МС с повышенной концентрацией 6-БАП (0,8 мг/л), изменения искомого параметра в

сравнении с образцами, полученными от растений *ex situ*, не выявлены. У *H. officinalis* f. *ruber ex vitro* и внешнего контроля *Ficus benjamina* на гистограммах, при исследовании образцов ядер выделяли основной пик флюоресценции, соответствующий фазам G0/G1 (2C), и следующий за ним малый – G2 (4C). Материал оставался диплоидным. Анализ плоидности ядер тканей листовых пластинок микропобегов *H. officinalis* ‘Никитский Белый’ после 12 месяцев культивирования *in vitro* также не выявил изменений. Пики на гистограммах, сформированные на основе интенсивности флюоресценции, соответствовали диплоидному материалу.

При амплификации участков ДНК, выделенной из листьев микропобегов *H. officinalis* ‘Никитский Белый’ после одного года культивирования *in vitro* с применением RAPD-, ISSR- и SRAP-праймеров показана мономорфность полос, генетические несоответствия выявлены не были, в сравнении с образцами ДНК, полученными от растений *ex situ* (рис. 2).

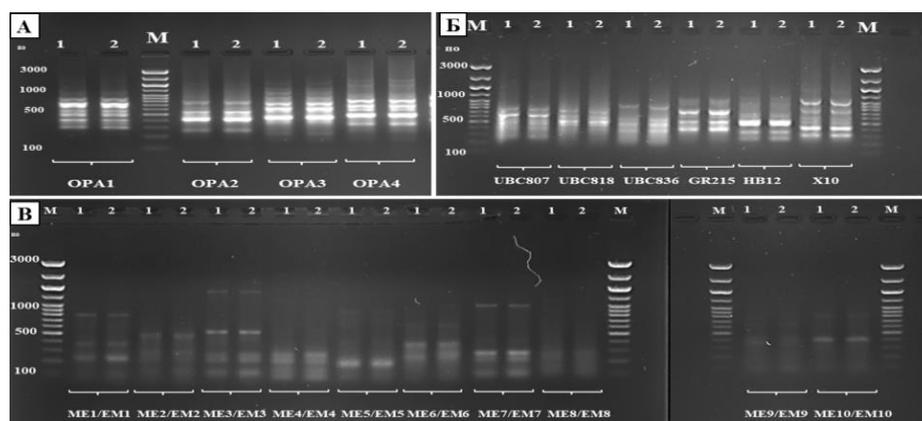


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов амплификации с праймерами RAPD (А), ISSR (Б), SRAP (В) и ДНК, выделенной из листьев растений *Hyssopus officinalis* ‘Никитский Белый’ *ex situ* (1) и микропобегов *in vitro*, после 12 месяцев культивирования (2). М – маркер, по – пары оснований.

Проведен анализ эфирного масла растений *ex situ* и регенерантов *ex vitro*. Согласно полученным данным, массовая доля эфирного масла в материнских растениях и регенерантах *ex vitro* составила 0,33% и 0,30% соответственно от сырой массы.

Доминирующими компонентами в образцах были бициклические монотерпеновые кетоны, такие как пинокамфон (43,72 и 43,30%) и изопинокамфон (24,97 и 25,88%). Минорные компоненты, включая миртенол (5,24 и 5,09%), β-пинен (4,20 и 4,70%), элемол (4,57 и 4,40%), бициклогермакрен (4,60 и 3,66%), варьировали незначительно.

Результаты исследований показали, что при культивировании микропобегов *H. officinalis* на питательных средах МС с оптимальным содержанием 6-БАП на листовых пластинках происходит формирование всех поверхностных структур, при этом их количество может меняться в зависимости от этапа клонального микроразмножения. Структура листовой пластинки *in vitro* и *ex vitro* имеет общность строения, сравнительно с таковой *ex situ*, однако у первых двух обнаруживаются качественные и количественные вариации линейных показателей. Увеличенные концентрации 6-БАП способствуют развитию витрификации и структурных перестроек листового аппарата. Вне зависимости от концентрации регулятора роста материал *in vitro* остается диплоидным. При оптимальных значениях 6-БАП генетические изменения с использованием RAPD-, ISSR-, и SRAP-ПЦР не выявлены. Выход и компонентный состав эфирного масла регенерантов *ex vitro* остается подобным материнским организмам. Полученные результаты демонстрируют эффективность разработанного протокола для клонального микроразмножения *H. officinalis*.

Благодарности. Исследование выполнено в рамках Государственного задания НБС-ННЦ №1023041300067-1-4.1.1 (FNNS 2024-0004).

Библиографический список

1. Интродукция и селекция ароматических и лекарственных растений (Методологические и методические аспекты) / В.П. Исиков, В.Д. Работягов, Л.А. Хлыпенко, И.Е. Логвиненко, Л.А. Логвиненко, С.П. Кутько, Н.Н. Бакова, Н.В. Марко. Ялта: НБС–ННЦ, 2009. 110 с.
2. Крицкая Т.А., Кашин А.С., Касаткин М.Ю. Микроразмножение и соматклональная изменчивость *Tulipa suaveolens* (Liliaceae) *in vitro* // Онтогенез. 2019. Т. 50. № 4. С. 270–277.
3. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы / Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. М.: Изд-во МГУ, 2004. 312 с.
4. Супрун И.И., Маляровская В.И., Степанов И.В., Самарина Л.С. IRAP-анализ для оценки генетической стабильности эндемичных и исчезающих видов флоры Западного Кавказа в коллекции *in vitro* // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. Т. 23. № 1. С. 8–14.
5. Bairu M.W., Aremu A.O., Van Staden J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods // Plant Growth Regulation. 2011. V. 63. P. 147–173.
6. Bulavin I.V., Ivanova N.N., Mitrofanova I.V. *In vitro* regeneration of *Hyssopus officinalis* L. and plant genetic similarity // Doklady Biological Sciences. 2021. V. 499. № 1. P. 109–112.
7. Bulavin I.V., Ivanova N.N., Miroshnichenko N.N., Saplev N.M., Feskov S.A. Anatomy, ploidy level, and essential oil composition of *Hyssopus officinalis* ‘Nikitskiy Belyi’ *in vitro* and *ex situ* // Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2023. V. 184. № 4. P. 21–30.
8. Eshboev F., Karakozova M., Abdurakhmanov J., Bobakulov K., Dolimov K., Abdurashidov A., Baymirzaev A., Makhnyov A., Terenteva E., Sasmakov S., Piyakina G., Egamberdieva D., Nazarov P.A., Azimova S. Antimicrobial and cytotoxic activities of the secondary metabolites of endophytic fungi isolated from the medicinal plant *Hyssopus officinalis* // Antibiotics. 2023. V. 12. № 7. 1201.
9. Galán-Ávila A., García-Forteza E., Prohens J., Herraiz F.J. Development of a direct *in vitro* plant regeneration protocol from *Cannabis sativa* L. seedling explants: developmental morphology of shoot regeneration and ploidy level of regenerated plants // Frontiers in Plant Science. 2020. V. 11. Art. 645.
10. Kotyuk L.A. Features of micromorphological structure of medicinal hyssop // Modern Phytomorphology. 2016. V. 10. P. 59–67.
11. Manokari M., Priyadharshini S., Shekhawat M.S. Micro-structural stability of micropropagated plants of *Vitex negundo* L. // Microscopy and Microanalysis. 2021. V. 27. № 3. P. 626–634.
12. Martins J.P.R., Rodrigues L.C.D.A., Conde L.T., Gontijo A.B.P.L., Falqueto A.R. Anatomical and physiological changes of *in vitro*-propagated *Vriesea imperialis* (Bromeliaceae) in the function of sucrose and ventilated containers // Plant Biosystems. 2020. V. 154. № 1. P. 87–99.
13. Mitrofanova I., Tsyupka V., Jain S.M. Morpho-anatomical characterization of *in vitro* regenerated plants // Advances in Plant Tissue Culture. Current Developments and Future Trends / Eds. A.C. Rai, A. Kumar, A. Modi, M. Singh. Cambridge, MA: Academic Press, 2022. P.175–204
14. Neelakandan A.K., Wang K. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications // Plant Cell Rep. 2012. V. 31. № 4. P. 597–620.
15. Plugatar Y.V., Bulavin I.V., Ivanova N.N., Miroshnichenko N.N., Saplev N.M., Shevchuk O.M., Feskov S.A., Naumenko T.S. Study of the component composition of essential oil, morphology, anatomy and ploidy level of *Hyssopus officinalis* f. *cyaneus* Alef. // Horticulturae. 2023. V. 9. № 4. 480.
16. Sliwinska E., Thiem B. Genome size stability in six medicinal plant species propagated *in vitro* // Biologia Plantarum. 2007. V. 51. № 3. P. 556–558.
17. Zagorcheva T., Rusanov K., Rusanova M., Aneva I., Stancheva I., Atanasov I. Genetic and flower volatile diversity in two natural populations of *Hyssopus officinalis* L. in Bulgaria // Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2020. V. 34. № 1. P. 1265–1272.

УДК 615.281.9

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МАТРИЦЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

А.Г. Волков

Серовская городская больница, г. Серов, Россия

Изучение биологических свойств природных пептидов из клеток донорской крови не теряет своей актуальности для биофармацевтической промышленности. Лейкоцитарные пептиды, полученные в результате воздействия ультразвука, подтверждают возможность их использования в качестве альтернативы антибиотикам. Показано противовоспалительное действие лейкоцитарных пептидов и наличием антиадгезивным потенциалом против изученных бактерий *Staphylococcus cohnii* ВКМ В-3165 и *Listeria welshimeri* Bel-19.

Ключевые слова: лейкоцитарные пептиды, биологические свойства, технология, биологические свойства

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF LEUKOCYTE PEPTIDES FOR CREATING F MATRIX OF DRUGS

A.G. Volkov

Serov Municipal Hospital, Serov, Russia

The study of the biological properties of natural peptides from donor blood cells does not lose its relevance for the biopharmaceutical industry. Leukocyte peptides obtained as a result of exposure to ultrasound confirm the possibility of their use as an alternative to antibiotics. The anti-inflammatory effect of leukocyte peptides and the presence of anti-adhesive potential against the studied bacteria *Staphylococcus cohnii* VKM B-3165 and *Listeria welshimeri* Bel-19 have been shown.

Keywords: leukocyte peptides, biological properties, technology, biological properties

Согласно Государственной программе «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» Российской Федерации на период до 2020 г. и «Фарма 2030» особое внимание уделяется развитию и внедрению производства инновационных лекарственных средств, в том числе пептидам, обладающим антимикробными свойствами. В последние годы существует большая потребность практического здравоохранения в природных антибактериальных полипептидах широкого спектра действия. Система глобального эпиднадзора за развитием устойчивости бактерий к противомикробным препаратам (GLASS) Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) выявила широкое распространение антибиотикорезистентности среди населения 22 стран мира.

В настоящее время доказано, что природные антимикробные пептиды (АМП) обладают относительно низкой токсичностью по отношению к клеткам собственного организма, а развитие резистентности к ним бактерий вырабатывается медленнее, чем к традиционным антибиотическим агентам [5]. Помимо непосредственного антибактериального действия, АМП нередко проявляют целый ряд иммуномодулирующих эффектов [7]. В связи с этим разработка технологии и структурно-функциональное изучение АМП животных и человека создают предпосылки для создания производства гомологов подобных соединений и их внедрения в медицину в качестве альтернативы современным антибиотикам.

Существующие методы выделения лейкоцитарных пептидов из клеток млекопитающих, включающие этапы экстрагирования пептидов из лейкоцитарных клеток при низких значениях

pH с последующей экспозицией при пониженных температурах. Полученный экстрагированием материал подвергают ультрафильтрации для выделения низкомолекулярной белковой фракции, с последующей концентрацией и обессоливанием. Получение высокоочищенных фракций, проявляющих антимикробный эффект, осуществляют методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Таким образом, на сегодняшний день получены и частично исследованы низкомолекулярные пептиды из лейкоцитов собак, коз, обезьян, лосей, обладающие противомикробным действием [6, 8, 9]. Анализ литературы свидетельствует об использовании лейкоцитов млекопитающих в качестве сырьевого источника получения полипептидов. Получаемые субстанции обладают антибактериальным и иммуномодулирующим эффектами, что является несомненным преимуществом при разработке терапевтических препаратов.

Использование ультразвука в качестве деструктора лейкоцитов актуально. Разработана методика ультразвукового воздействия на лейкоцитарные клетки, позволяющая получить белково-пептидный комплекс. Для максимального выделения биологической активности из лейкоцитов наиболее эффективна их ультразвуковая обработка при амплитуде 80-100 % вне зависимости от времени обработки. Оптимальная концентрация лейкоцитов в клеточной суспензии для проведения клеточной деструкции путем УЗ-обработки составляет 6,7 млн/мл.

Нами ранее разработана технология получения лейкоцитарных пептидов, с применением ультразвукового лизиса клеток и очистки с помощью ультрафильтрационных пластин с порогом отсека 15кДа. Определены оптимальные условия проведения ультразвуковой обработки лейкоцитов: концентрация лейкоцитов в клеточной суспензии – 6,7 млн/мл; температура – от +4 до +8 °С; время воздействия ультразвука – от 80 до 100 сек.; частота ультразвуковых волн – 30 кГц; амплитуда УЗ-излучения – 60%. Проведенный анализ ВЭЖХ подтвердил наличие в ЛБПК низкомолекулярных пептидов, с количественным содержанием до 90 % [2,3]. Установлено, что ЛБПК обладает высокой антибактериальной активностью в отношении штаммов *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *P. vulgaris* средне выраженной активностью в отношении изученных штаммов *E. faecalis*, *P. aeruginosa*. Так же показано, что лейкоцитарный белково-пептидный комплекс обладает умеренной противовирусной активностью и относится к 4 классу токсичности по ГОСТ 12.1.007-76 (является малотоксичным) [4].

В настоящее время проводится дальнейшее изучение биологических свойств полученного лейкоцитарного пептида из крови доноров. Показано, что лейкоцитарный пептидный комплекс наряду с антимикробной активностью обладает противовоспалительным действием. Данный препарат проявляет выраженную противовоспалительную активность, которая в 2,7 раза меньше, чем в контрольной группе. Противовоспалительная активность исследуемого пептидного комплекса не уступала препарату сравнения нимесулиду и превышала его действие на 13%. Учеными продолжают исследования по поиску эффективных лекарственных субстанций, которые обладали снижением агрессивного потенциала биопленок и как следствие снижение риска инфекционных заболеваний. Ранее нами был получен положительный результат эффективности ЛПК на адгезию бактерий к полистеролу [1]. Полученные результаты показали, что предобработка полистерола ЛПК в концентрации 20 мг/мл снижала сорбцию *Staphylococcus cohnii* ВКМ В-3165 и *Listeria welshimeri* Bel-19 в одинаковой степени более чем на 70% от контролей. Таким образом, лейкоцитарный пептидный комплекс обладал выраженным антиадгезивным потенциалом против изученных видов бактерий.

Изучение структурно-функциональных свойств полученного лейкоцитарного полипептидного комплекса и дальнейшее получение отдельных пептидов, отвечающих за биологические свойства, вносят не только вклад в фундаментальные исследования, но и создают подходы в создании препаратов нового поколения для медицины.

Благодарности.

Автор выражает глубокую благодарность профессору ПНИПУ Волковой Л.В., сотрудникам лаборатории биохимии развития микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН: и.о. зав. лабораторией к.б.н. Полюдовой Т.В., научному консультанту к.м.н. Коробову В.П. и ведущему инженеру Кононовой Л.И. за участие в проведении совместных научных исследований.

Библиографический список

1. Безматерных И.С. Влияние лейкоцитарного белково-пептидного комплекса на адгезию бактерий к полистеролу/ И.С. Безматерных, Л.И. Кононова, В.П. Коробов, Л.В. Волкова //Химия. Экология. Урбанистика: матер. всерос. науч.-практ. конф. (с междунар. участием). - 2022, т. 4; Т. 2. - С. 27-31.
2. Волкова Л.В. Фракционный состав лейкоцитарного лизата и его биологические свойства / Л.В. Волкова, Т.А. Гришина, А.Г. Волков // Современные проблемы науки и образования. – 2019. - № 1. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=28527>.
3. Гришина Т.А., Волкова Л.В., Волков А.Г. Способ фракционирования лейкоцитарных белков (патент РФ на изобретение №2737730).
4. Гришина Т.А. Цитотоксичность и токсикологическая характеристика нового лейкоцитарного полипептида/ Т.А. Гришина, А.Г. Волков, Л.В. Волкова// Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2020. – Т. 23, № 5. – С. 3–8.
5. Жаркова М.С. Антимикробные пептиды млекопитающих: классификация, биологическая роль, перспективы практического применения (обзорная статья)/М.С. Жаркова, Д.С. Орлов, В.Н. Кокряков и др. // Biological Communication. - 2014.- вып. 1.- С. 98-114.
6. Кораблева Е.С. Антимикробный пептид из лейкоцитов собаки: структурно-функциональные свойства/ Е.С. Кораблева, У. Белов, Ю.В. Андреева и др.// Biological Communications. - 2007.- в. 3- С. 80- 84.
7. Мусин Х.Г. Антимикробные пептиды – потенциальная замена традиционным антибиотикам/ Х.Г. Мусин//Russian Journal of Infection and Immunity/ - 2018.-no.3, pp. 295-308.
8. Шамова О.В. Мини-бактенецины ChVac7.5N α и ChVac7.5N β - антимикробные пептиды из лейкоцитов козы *Capra hircus*/ О. В. Шамова, Д. С. Орлов, М. С. Жаркова и др.// Acta Naturae (русскаяязычная версия).- 2016. - Т.8, № 3. - С. 1-11.
9. Юхнев В.А. Поиск новых антимикробных пептидов из семейства кателицидинов и дефенсинов в лейкоцитах лося (*alces alces*) /В.А. Юхнев, М.А. Шартукова, Н.В. Луговкина и др. // Biological Communications. - 2014.- в. 1- С. 115-132.

УДК 66.015.23

НОВЫЙ СПОСОБ АЭРАЦИИ В ГАЗОЖИДКОСТНОМ БИОРЕАКТОРЕ*Н.А. Войнов, Д.А. Земцов, Н.Ю. Кожухова**Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика**М. Ф. Решетнева**Российская Федерация, 660037, г. Красноярск, просп. им. газеты «Красноярский рабочий», 31*

Разработан новый способ диспергирования газа в жидкость, позволяющий совершенствовать известные конструкции газо-жидкостных биореакторов, так и конструировать новые. Представлены экспериментальные данные по газосодержанию, межфазной поверхности, величине коэффициента массоотдачи полученные в аппарате диаметром 0,28 м и 0,54 м. Исследования проводились на системе воздух-вода, водных растворов сахарозы, глицерина при разной их концентрации и поверхностно активных веществ. Установлены зависимости критерия мощности мешалки от газосодержания и числа Рейнольдса, а также коэффициента массоотдачи от межфазной поверхности и диссипации энергии. Установлено, что при расчете диссипации энергии затраченной на создание межфазной поверхности необходимо учитывать влияние сил вязкого трения в жидкости.

Ключевые слова: биореактор, лопастная мешалка, мощность, газосодержание, межфазная поверхность, коэффициент массоотдачи, способ диспергирования

Для насыщения культуральной жидкости газовым субстратом большее применение нашли аппараты с мешалками, снабженные барботерами различного типа. Поиск путей снижения затрат на подвод газового субстрата в жидкость привел к разработке биореакторов с самовсасывающими мешалками [1-4]. Которые обеспечивают подвод газа через полый вал в область с пониженным давлением, образованную в рабочем объеме устройства. Аппараты с самовсасывающей мешалкой имеют не высокую производительность из-за обеспечения низкой межфазной поверхности, сложное конструктивное исполнение, большой диаметр мешалки, приводящий к повышению мощности на перемешивание.

Для устранения перечисленных недостатков был исследован и запатентован новый способ диспергирования газа в жидкость [5] заключающийся в обеспечении зон с пониженным давлением за вращающимися лопатками мешалки. Создании, условий для подвода газа в жидкость из полости газового вихря, образованного вращением жидкости в рабочем объеме аппарата. В этом случае мешалка выполняется из одной или более прямоугольных пластин, закрепленных на валу, что упрощает ее конструктивное исполнение. А установка подвижных перегородок на стенке аппарата позволяет удерживать вращающуюся жидкость на поверхности лопаток мешалки и обеспечить развитую межфазную поверхность.

Схема диспергирования газа разработанным способом представлена на рис. 1а. Согласно которой газ из полости вихря 4 диспергирует в жидкость в зоны с пониженным давлением, равным 100-2000 Па, образованными за вращающимися лопатками [6]. Общий вид экспериментального образца биореактора представлен на рис. 1б, а размещение мешалок на валу, показаны на рис. 1с-е.

Корпус устройства выполнялся из прозрачного материала с внутренним диаметром 0,28 м и 0,54 м. Высота аппарата составила 0,3 м и 1,5 м. Исследования проводились на двухлопастной мешалке диаметром 0,06-0,115 м. Ширина перегородки, установленной на стенке царги составляла 0,025 м. При размещении на валу нескольких мешалок (рис. 1е), высота лопатки выполнялась равной $h = 0,05$ м.

Исследуемые модельные смеси представлены в табл. 1.

Диссипация энергии ε (Вт/кг), рассчитывалась по формуле:

$$E = N/m, \quad (1)$$

где N – мощность на перемешивание, Вт; m – масса жидкости в биореакторе, кг.

Критерий мощности на перемешивание определялся:

$$K_N = N/\rho_{см} \cdot n^3 \cdot d_M^5 \quad (2)$$

где K_N – критерий мощности; N – мощность на перемешивание, Вт; $\rho_{см}$ – плотность газо-жидкостной смеси, кг/м³; n – частота вращения, с⁻¹; d_M – диаметр мешалки, м.

Плотность газожидкостной смеси рассчитывалась:

$$\rho_{см} = \rho_{ж} \cdot (1 - \varphi) + \rho_{г} \cdot \varphi, \quad (3)$$

где $\rho_{ж}$ – плотность жидкости, кг/м³; $\rho_{г}$ – плотность воздуха, кг/м³.

Число Рейнольдса определялось

$$Re = (n \cdot d_M^2 \cdot \rho_{см}) / \mu, \quad (4)$$

где μ – коэффициент динамической вязкости среды, Па·с.

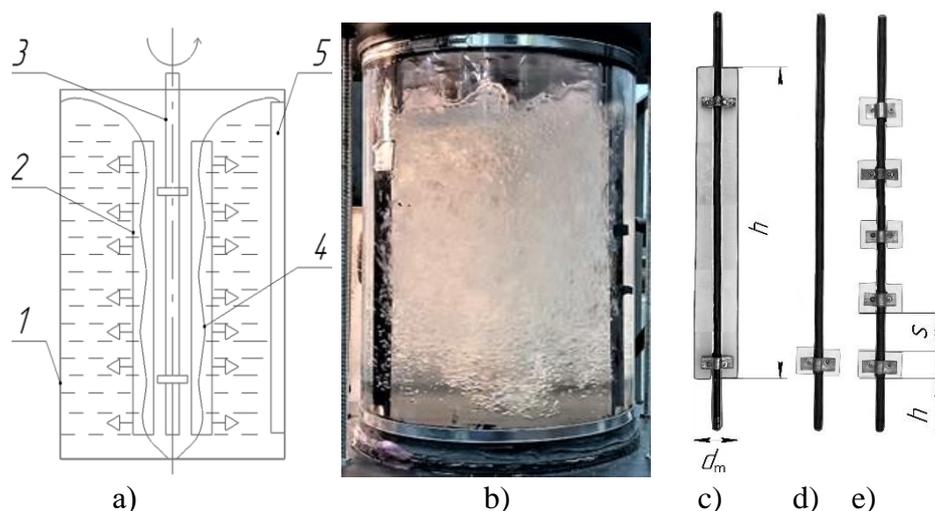


Рис. 1. Схема диспергирования газа в жидкость (а), общий вид экспериментального биореактора (б) и размещение лопаток на валу мешалки (с-е): (а) 1 – цапга биореактора; 2 – лопатки; 3 – вал мешалки; 4 – полость вихря; 5 – перегородка.

Таблица 1

Параметры исследуемых смесей

среда	t, °C	$\rho_{см}$, кг/м ³	$\mu \cdot 10^3$, Па·с	σ , кг/с ²
Вода	10-60	1000-983	1,31-0,47	0,076-0,066
Сахароза-вода (20%)	23	955,0	1,7	0,073
Сахароза-вода (25%)	23	977,5	2,0	0,071
Сахароза-вода (35%)	23	1039,5	3,1	0,070
Глицерин-вода (5%)	20	1140	1,0	0,074
Глицерин-вода (15%)	20	1034	1,52	0,073
Глицерин-вода (20 %)	20	1047	1,76	0,072
ПАВ* (0.1%)	24	997	0,9	0,069
ПАВ* (0.0025%)	24	998	0,9	0,058
ПАВ* (0.0005%)	24	999	0,9	0,047

*ПАВ - динатрий лаурол сульфосукцинат натрия

Величина газосодержания в жидкости определялась объемным методом.

Поверхностное натяжение жидкости определялась методом максимального давления пузырька.

Мощность на перемешивание определялась исходя из измеренных величин тока и напряжения, и мощности холостого хода.

Согласно проведенным исследованиям, величина газосодержания в биореакторе, рис. 2а составила 0,1-0,8, что является большой величиной в сравнении известными способами диспергирования [1-4]. С увеличением числа оборотов мешалки, вязкости жидкости и концентрации поверхностно активных веществ газосодержание возрастает. Также установлено, что величина критерия мощности, которая необходима для расчета мощности мешалки на перемешивание, зависит от как числа Рейнольдса газожидкостной смеси, так и от газосодержания (рис. 2б) и подчиняется зависимости:

$$K_N \approx Re^{-0.13} \cdot \varphi^{-0.9}.$$

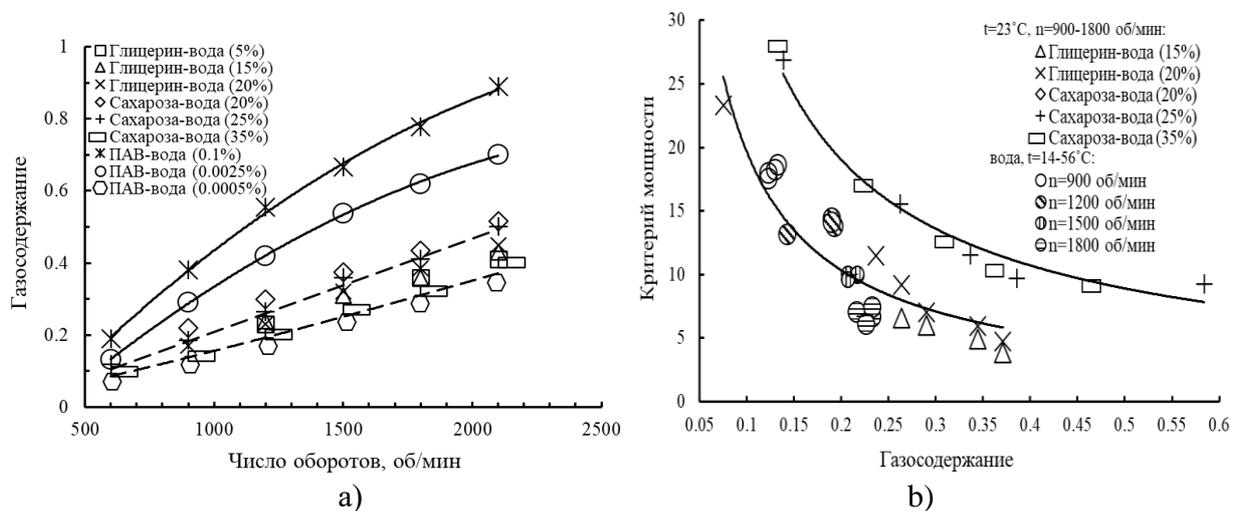


Рис. 2. Зависимость газосодержания от числа оборотов (а) и критерия мощности мешалки от газосодержания (б) при $D = 0,28$ м и $h = 0,3$ м

Фотофиксация газо-жидкостной среды и анализ размеров пузырьков газа позволили установить размер пузырьков, который составил от 0,05 мм до 2,5 мм. С увеличением коэффициента динамической вязкости жидкости диаметр пузырьков уменьшается. Например, для воды максимальное количество пузырьков имеет диаметр 2 мм, тогда как на водном растворе сахарозы диаметр пузырька существенно снизился и максимальное их количество наблюдается при диаметре 0,05 мм. Что позволило достигнуть величину межфазной поверхности более 1200 м^{-1} и диссипации энергии до 25 Вт/кг.

Результаты исследования интенсивности массоотдачи в экспериментальном аппарате представлены на рис.3

Обработка данных позволила обобщить их зависимостью [6]:

$$\beta = A \cdot [\varepsilon^{0.6} \cdot a^{0.8}]^{0.455}, \quad (5)$$

где коэффициент A входящий в уравнение (5) в интервале величины коэффициента динамической вязкости $(1,2-1,8) \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$, коэффициент следует принимать равным $A = 19$ (линия 2 на рис. 3). При $\mu = 1,9-3,1 \text{ Па} \cdot \text{с}$, $A = 16$ (линия 3, рис. 3).

Для снижения мощности на перемешивание проведены исследования в аппарате при размещении лопастей мешалки по высоте вала, по схеме, представленной на рис. 1е.

Величина коэффициента массоотдачи в жидкости в зависимости от диссипации энергии и расстояния между мешалками представлены на рис.4. Согласно полученным данным, при расстоянии между мешалками $s=100-125$ мм достигается наибольший коэффициент массоотдачи, как в аппарате диаметром 280 мм (рис. 4а, точки 1–3), так и в аппарате диаметром 540 мм (точки 4).

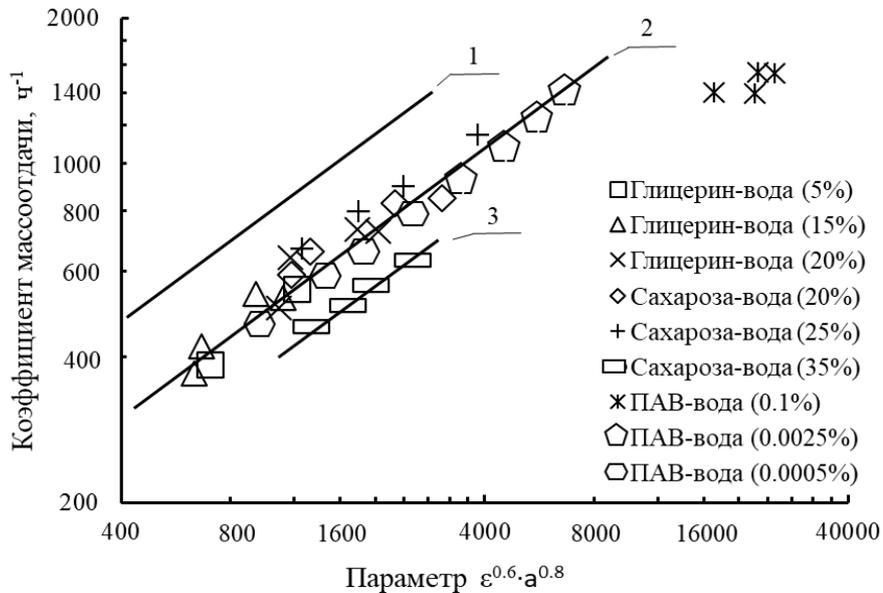


Рис. 3. Зависимость коэффициента массоотдачи от параметра $\epsilon^{0.6} \cdot a^{0.8}$.

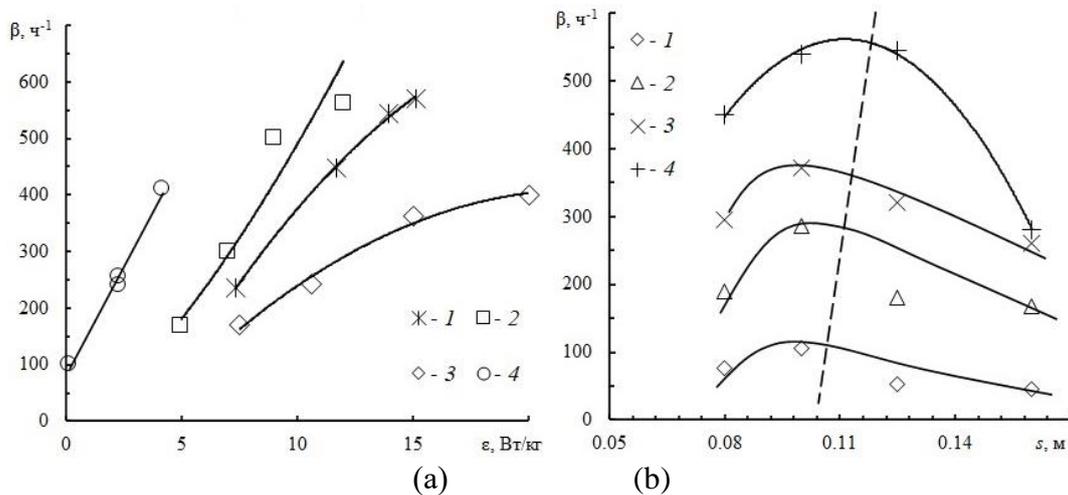


Рис. 4. Зависимость коэффициента массоотдачи от диссипации энергии (а) и от расстояния между мешалками (б): (а) экспериментальные точки (1–4): 1 – одна мешалка при $h=700$ мм; 2 – расстояние между мешалками $s = 125$ мм, количество мешалок 4 шт.; 3 – $s = 80$ мм, 5 шт.; 4 – $s = 120$ мм, 4 шт., $d_m = 84$ мм.; (б) экспериментальные точки (1–4): 1 – число оборотов 900 об/мин; 2 – 1200 об/мин; 3 – 1500 об/мин; 4 – 2100 об/мин

Размещение мешалок на валу с высотой лопатки 50 мм на расстоянии 100–125 мм друг от друга позволило при одинаковой диссипации энергии увеличить величину коэффициента массоотдачи в 1,25 раза вследствие накопления пузырьков в циркуляционных зонах аппарата. Увеличение диаметра аппарата в два раза не привело к снижению объемного коэффициента массоотдачи при таком конструктивном исполнении. Разработанный способ диспергирования

газа в жидкость позволил интенсифицировать процесс массоотдачи в аппарате с перемешивающимися устройствами. Рекомендуется к использованию как при конструировании биореакторов, так и при совершенствовании работающих биореакторов.

Библиографический список

1. Виестур У.Э., Кристапсонс М.Ж., Былинкина Е.С. Культивирование микроорганизмов. -М.: Пищевая Промышленность, 1980, 232.
Viestur U.E., Kristapsons M.Zh., Bylinkina E.S. Kul'tivirovanie mikroorganizshchmov. -M.: Pishchevaya Promyshlennost', 1980, 232.
2. Joshi J.B., Sharma M.M. Mass transfer and hydrodynamic characteristics of gas inducing type of agitated contactors. The Canadian Journal of Chemical Engineering. 1977, 55(6), 683–695. [doi 10.1002/cjce.5450550609](https://doi.org/10.1002/cjce.5450550609)
3. Forrester S.E., Rielly C.D. Modelling the increased gas capacity of self-inducing impellers. Chemical Engineering Science. 1994, 49(24), 5709–5718. [doi 10.1016/0009-2509\(94\)00322-X](https://doi.org/10.1016/0009-2509(94)00322-X)
4. Poncin S., Nguyen C., Midoux N., Breysse J. Hydrodynamics and volumetric gas-liquid mass transfer coefficient of a stirred vessel equipped with a gas-inducing impeller. Chemical Engineering Science. 2002, 57(16), 3299–3306. [doi 10.1016/S0009-2509\(02\)00200-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(02)00200-2)
5. Войнов Н.А., Земцов Д.А., Фролов А.С. Способ насыщения жидкости газом в аппарате с мешалкой. Патент RU 2 790 167 С1, бюллетень № 5, опубл. 14.02.2023.
6. Voinov N.A., Frolov A.S., Bogatkova A.V., Zemtsov D.A., Zhukova O.P. Method for Intensive Gas-Liquid Dispersion in a Stirred Tank. ChemEngineering 2023, 7(2), 30. [doi 10.3390/chemengineering7020030](https://doi.org/10.3390/chemengineering7020030)

УДК 613.292+ 615.322

ФЕРМЕНТИРОВАННАЯ ФИТОКОМПОЗИЦИЯ ИЗ БИОМАССЫ РАСТЕНИЙ ПЕРМСКОГО КРАЯ

Л.В. Волкова, В.П. Вигуляр, Р.Г. Волков

*ФГАОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», г.
Пермь, Россия*

В настоящее время под воздействием неблагоприятных факторов у жителей России возникает ряд метаболических нарушений, которые, как правило приводят к хроническим заболеваниям, в частности, к возникновению преддиабета и сахарного диабета 2-го типа. В качестве средств профилактики широко применяются препараты растительного происхождения за счет более мягкого воздействия на организм и низкой токсичности. Оптимизация условий заготовки растительного сырья и совершенствование метода ферментации не теряет актуальности в настоящее время.

Ключевые слова: фитокомпозиция, сахарный диабет, ферментация, заготовка, растительное сырье.

FERMENTED PHYTOCOMPOSITION FROM PLANT BIOMASS OF THE PERM REGION

L.V. Volkova, V.P. Vigulyar, R.G. Volkov

Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia

Currently, under the influence of unfavorable factors, residents of Russia experience a number of metabolic disorders, which usually lead to chronic diseases, in particular to the occurrence of prediabetes and type 2 diabetes mellitus. Herbal preparations are widely used as means of prevention due to their milder effect on the body and low toxicity. Optimizing the conditions for the procurement of plant raw materials and improving the fermentation method does not lose relevance at the present time.

Keywords: phytocomposition, diabetes mellitus, fermentation, preparation, plant raw materials.

Сахарный диабет одна из важнейших медико-социальных проблем здравоохранения практически всех стран мира и в промышленно-развитых странах распространенность данным заболеванием составляет 5-6% и имеет тенденцию к увеличению. Согласно исследованиям Международного института диабета к 2010 году число больных СД в мире достигнет 225 миллионов человек, а к 2025 году – 300 миллионов, причем у подавляющего большинства из них будет наблюдаться СД 2 типа. За последние годы многие люди пересмотрели свое отношение к здоровью и питанию в результате COVID-19. Все больше число потребителей начали связывать свой пищевой рацион со здоровьем. Спрос на функциональные продукты и нутрицевтики во время пандемии COVID-19 и сезонных заболеваний резко возрос [5]. Это показывает, что происходит смещение модели потребления пищи в сторону более здоровой продукции, а не только для утоления голода.

Таким образом, спрос на функциональные продукты – продукты с улучшенными питательными свойствами, которые приносят пользу для здоровья путем снижения утомляемости и повышения иммунитета, продолжает расти. В 2023 году группой исследователей в ПНИПУ разработана технология фармацевтической растительной субстанции методом микробной ферментации при помощи микроорганизмов *L. plantarum*. На основании

использования методов математического моделирования обоснованы и установлены оптимальные параметры проведения процесса [1].

Показано, что внедрение стадии УЗ обработки увеличивает процентное содержание биологически активных веществ в готовом продукте, а также позволяет проводить стерилизацию обрабатываемого сырья [6]. Доказано, что разработанная технология позволяет получать более ценный по составу продукт, чем при использовании традиционных методов. Определено, что микробно-ферментированная субстанция содержит в своём составе короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), синтезируемые *L. Plantarum* 8P-A3 [7].

Учитывая полученные результаты цель настоящего исследования совершенствование технологии получения ферментированной субстанции биомассы растений, обладающих гипогликемическим действием.

В настоящем исследовании в составе фитокомпозиции взяты растения, применяемые в лечении сахарного диабета, содержащие инсулиноподобные вещества: листья лопуха большого, одуванчика, пиона уклоняющегося [2]. Известно, что условия заготовки растительного сырья влияют не только на его качество, но и качество получаемой из него продукции, а также является первым этапом производства. Как известно у каждого растения существует свое время заготовки. Именно в эту пору оно максимально накапливает полезные вещества, которыми обусловлено его целебное действие. Существует календарь сбора лекарственных растений [3]

Главное в качестве получаемого растительного продукта не только правильно его заготовить, но и транспортировать и сохранить его полезные свойства до этапа получения из него необходимого продукта. Ферментацию растений проводят, как правило, сразу после его сбора.

Как известно, замораживание это способ консервации с использованием низких температур. Общепринятый температурный уровень, при котором проводят замораживание составляет не менее минус 18 °С. Проводимые научные исследования показывают целесообразность практического применения замораживания как способа консервации растительного сырья (на примере морфологической группы «плоды») [4]. Замораживание растительного сырья можно использовать как одну из стадий консервации. Длительное хранение исходного растительного сырья возможно при замораживании. Однако известно, что после замораживания в сырье может происходить уменьшение количества некоторых биологически активных веществ вследствие формирования кристаллов льда и изменения осмотических условий. Таким образом, установление оптимальных сроков заготовки листьев и оптимальных сроков их хранения в замороженном состоянии является актуальной задачей.

Листья исследуемой композиции замораживали в условиях бытового холодильника при температуре минус 18-20 °С в течение не менее 24 часов с последующим размораживанием в течение 1 часа при комнатной температуре. Образованный конденсат удаляли, а растительную массу подвергали деструкции при помощи шнекового измельчителя. Полученную массу помещали в стерильную емкость в объеме 100 г. Температуру и время ферментации варьировали в зависимости от условий эксперимента. Сушку осуществляли при температуре 35- 37 °С в течение 12 часов в условиях термостата.

Для анализа исходного сырья до ферментации взяты следующие параметры: дубильные вещества (полифенольные соединения), экстрактивные вещества (совокупность БАВ сырья, извлекаемых экстрагентом), полисахариды, зола общая (совокупность минеральных веществ и посторонних минеральных примесей), зола, нерастворимая в 10% р-ре HCl (характеризует загрязнённость сырья и состоит в основном из SiO₂). Полученные результаты показали, что сбор растений, используемых в дальнейшем для фитокомпозиции проводили в экологически благополучном районе Пермского края в период с июня по сентябрь 2023г. Количественный анализ выбранных параметров проводили согласно фармакопейным методикам. Результаты представлены на рис. 1.

Исходя из полученных данных нами определено оптимальное время сбора, при котором отмечается максимальное накопление биологически активных веществ (БАВ) в листьях – июль, середина месяца. Также установлено, что хранение листьев при температуре минус 18-20 °С сроком до 6 месяцев достоверно не приводит к ухудшению его свойств. Количественный анализ проводили согласно стандартным фармакопейным методикам. Результаты представлены на рис. 2.

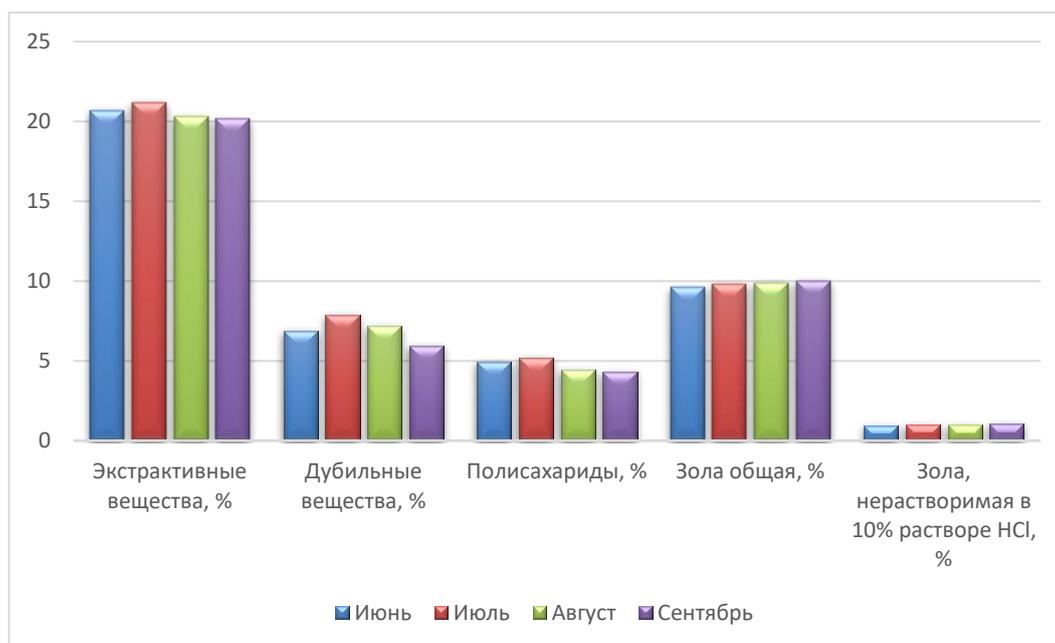


Рис. 1 Состав биомассы фитокомпозиции в зависимости от месяца сбора

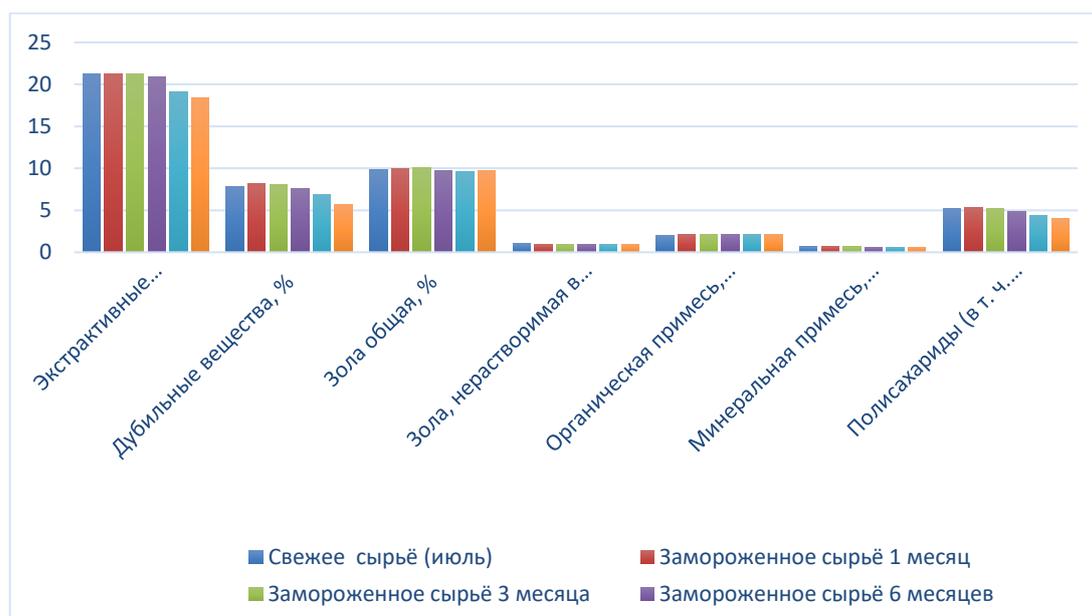


Рис. 2 Динамика изменения состава фитокомпозиции в процессе хранения при температуре минус 18-20 °С

Полученная разница в значениях контрольных параметров у образцов сырья, подвергавшихся замораживанию сроком до 6 месяцев при температуре минус 18-20 °С статистически не значима по показателям экстрактивных веществ, дубильных веществ и полисахаридов по сравнению со свежесобранными образцами. Небольшое увеличение количества некоторых соединений в процессе замораживания в период до 3х месяцев объясняется разрушением структуры клеток микрокристаллами льда, что способствует выходу БАВ во внешнюю среду, после чего процессы деструкции начинают преобладать, что сказывается на снижении качества сырья. Таким образом установлено, что хранение биомассы фитокомпозиции при температуре минус 18- 20 °С в течение 6 месяцев не приводит к статистически значимому ухудшению её качества.

Библиографический список

1. Волкова Л.В. Способ получения фитокомпозиции: пат. RU 2 733 141 С1
2. Рос. Федерация: МПК А23F 3/34 / Волкова Л. В., Хайбуллин Р. Г.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО ПНИПУ. – № 2019119049; заявл. 18.06.2019; опубл. 29.09.2020, Бюл. № 20.
3. Калмыков С. Характеристика лекарственных растений, применяемых в фитотерапии сахарного диабета 2-го типа/ С. Калмыков, Ю. Калмыкова // Слобожанський науково-спортивний вісник. – Харків: ХДАФК, 2016. – № 3(53). – С. 53–58. – doi:10.15391/ sns.v.2016-3.010.
4. Маханова Г.С. Рекомендации по рациональному использованию и сохранению растительных ресурсов/ Евразийский Союз Ученых (ЕСУ). - 2016.- № 4, Т.25.- С. 120.- 121.
5. Сергунова Е.В. и др. Перспективы использования замораживания для консервации лекарственного растительного сырья / Е.В. Сергунова, АА. Сорокина//Научно-практический журнал. - 2018.- № 3.- С. 8- 13.
6. Трухан Д.И. Нутрицевтики в профилактике, лечении и на этапе реабилитации после новой коронавирусной инфекции (COVID-19)/ Д.И. Трухан, Е.Л. Давыдов, Н.А. Чусова// Клинический разбор. - 2021.- № 7.- С. 21- 34.
7. Хайбуллин, Р. Г. Оценка влияния ультразвуковой обработки растительного сырья на количество экстрактивных веществ в ферментированной биомассе/ Р. Г. Хайбуллин, Л. В. Волкова // Симбиоз-Россия 2019: материалы XI Всерос. конгр. молодых ученых-биологов с междунар. участием (Пермь, 13-15 мая 2019 г.) – Пермь: ПГНИУ, 2019. – С. 81-83.
8. Хайбуллин Р. Г. Методики количественного определения короткоцепочечных жирных кислот в экстрактах биомассы листьев *Arctium lappa* L. [Текст] / Р. Г. Хайбуллин, Е. Ю. Тумилович, Л. В. Волкова, Т. Л. Малкова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2022. – Т. 25. – № 11. – С. 16-22. – DOI: 10.29296/25877313-2022-11-03.

УДК 665.5.06

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ОБРАБОТКИ НА ВЫХОД МАСЛА ЦИТРУСОВЫХ

Г.А. Гавриленко, Е.В. Курочкина, А.В. Протопопов

Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, г. Барнаул, Россия

В статье рассмотрены вопросы повышения выхода эфирных масел цитрусовых при пароводной перегонке. Изучено влияние предварительной ферментации на выход эфирного масла и рассмотрено влияние концентрации перекиси водорода на выход эфирных масел. Состав эфирных масел рассмотрен методом ИК-спектроскопии.

Ключевые слова: цитрусовые, эфирные масла, ферментация, пароводная перегонка

INFLUENCE OF ENZYMATIC TREATMENT CONDITIONS ON THE CITRUS OIL YIELD

G.A. Gavrilenko, E.V. Kurochkina, A.V. Protopopov

Polzunov Altai State Technical University, Barnaul, Russia

The article discusses the issues of increasing the yield of citrus essential oils during steam distillation. The effect of pre-fermentation on the yield of essential oils was studied and the effect of the concentration of hydrogen peroxide on the yield of essential oils was considered. The composition of essential oils was examined by IR spectroscopy.

Keywords: citrus fruits, essential oils, fermentation, steam distillation

Тот факт, что одна треть всех продуктов питания, производимых для потребления человеком, ежегодно выбрасывается, сделал пищевые отходы серьезной проблемой во всем мире. Заводы по производству цитрусовых соков производят остатки кожуры, которые могут составлять 50-60% от веса плода, что вносит значительный вклад в пищевые отходы [1 с.26]. Фортунелла, Эремоцитрус, Климендия, Понцирус, Микроцитрус и Цитрус — шесть родов цитрусовых, произрастающих в тропических и субтропических регионах Азии. С другой стороны, цитрусовые — это род, который содержит большинство коммерчески важных фруктов. Апельсины, мандарины, лаймы, лимоны и грейпфруты — лишь некоторые из важных фруктов рода цитрусовых [2 с.126, 3 с.48].

В кожуре цитрусовых содержится большое количество эфирного масла [4 с.53]. Эфирные масла (ЭМ) представляют собой сложные комбинации низкомолекулярных летучих соединений, экстрагированных из частей растений, таких как цветы, листья, семена, плоды и стебли ароматических растений [5 с.97]. Его получают из растительного материала, содержащегося в определенной области растения или в определенном компоненте растительных клеток. Большую часть летучих химических соединений, составляющих эфирное масло цитрусовых, составляют монотерпеновые углеводороды [6 с.67].

Большая часть эфирного масла цитрусовых содержится во флавадо части кожуры, меньшее количество содержится в листьях, цветах, плодах и семенах. Терпеновые углеводороды, кислородсодержащие соединения и нелетучие соединения — это три фракции, которые можно условно разделить на более чем сотню различных химических веществ, входящих в состав эфирных масел. Терпеновая фракция может составлять от 50 до 95% масла. Эфирное масло

обладает бактерицидными, антиоксидантными и антибактериальными свойствами, а также антиканцерогенной активностью [7 с.4].

Некоторые из процессов, используемых для получения эфирного масла, включают гидродистилляцию, экстракцию растворителем, сверхкритическую жидкостную экстракцию, холодное прессование и микроволновую экстракцию. Недавно исследователи предложили несколько передовых методов экстракции, включая ультразвуковую, микроволновую, ферментативную и сверхкритическую жидкостную экстракцию, для оценки относительно большого объема получаемых пилингов [8 с.926]. Некоторыми из преимуществ этих передовых методов по сравнению с традиционными методами были меньшая продолжительность, низкие затраты энергии, меньшие требования к растворителям и низкое выделение углекислого газа. Основным компонентом эфирного масла citrusовых является лимонен, высоколипофильный циклический монотерпен, на долю которого приходится 68-98% веса масла и до 4% веса отходов цитрусовой кожуры.

Лимонен является широко используемым консервантом для пищевых продуктов и обозначен в Своде федеральных правил как общепризнанная безопасная добавка («GRAS») благодаря своим антиоксидантным свойствам и аромату. На самом деле лимонен необходим для мировой индустрии вкусов и ароматизаторов. Многие отрасли проявили интерес к существованию лимонена, существенного компонента эфирных масел, присутствующих в кожуре апельсина, который обладает антибактериальным, антиоксидантным, биологическим и травяным ароматом. С 10 Н 16 — эмпирическая формула монотерпена лимонена. Это жидкость при комнатной температуре. Наряду с дипентеном рацемической смеси он существует также в виде оптических изомеров D- и L-лимонена.

Лимонен является предшественником карвона или а-терпинеола и служит важным промышленным химикатом [9 с.76]. Трудности с утилизацией мусора от производства соков и фруктов, таких как апельсиновые корки, как правило, приводили к загрязнению окружающей среды. Чтобы решить эту проблему, кожуру citrusовых можно использовать в качестве сырья для извлечения эфирных масел для ряда бытовых и промышленных применений. Поскольку апельсиновая кожура содержит биоматериалы, такие как эфирное масло, пектин и сахар, ее выбрасывание может вызвать проблемы для окружающей среды, в первую очередь загрязнение воды.

Если можно будет извлечь потенциально рыночные активные вещества, такие как эфирное масло, эта проблема может превратиться в торговый аргумент. После экстракции кожуру можно использовать в качестве сухого корма с высоким содержанием белка, что увеличит потенциальную прибыль индустрии апельсинового сока. Эфирные масла собирают из кожуры фруктов, цветов, листьев, стеблей, корней и семян. Это чрезвычайно концентрированные соединения. Эти масла часто используются в различных товарах, включая продукты питания, фармацевтические препараты, лекарства, парфюмерную промышленность и косметику, из-за их вкуса, а также их лечебных или пахучих эффектов.

Известно, что эфирные масла подвержены реакциям конверсии и разложения, поскольку они состоят из множества различных липофильных и легколетучих компонентов, принадлежащих к широкому спектру различных химических семейств. Обзор литературы по стабильности эфирных масел показал, что окислительные изменения и реакции деградации, которые могут привести к изменениям, имеющим отношение как к сенсорным, так и к фармакологическим свойствам, редко когда-либо были тщательно рассмотрены [10 с.112].

Нами исследованы условия предварительной ферментации отходов citrusовых, в частности были использованы кожура и гнилые плоды мандарин. Ферментацию проводили в водной среде с различным содержанием перекиси водорода. растительный материал предварительно измельчался до 1-5 мм и добавляли в водный раствор в объемном соотношении к раствору 1:1,5. После ферментативного разложения проводилась перегонка и разделение масла и фруктовой воды.

Выход масла в зависимости от условий ферментации приведен на рисунке 1. Из полученных данных можно сделать заключение о целесообразности применения 0,8 % раствора перекиси водорода для ферментизации в целях увеличения отдачи масла отходами цитрусовых при пароводной перегонке.

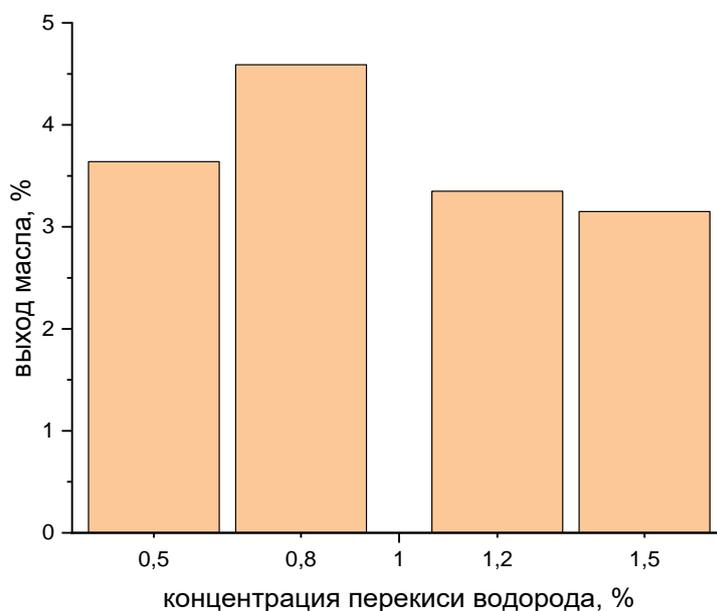


Рис. 1. Выход масла в зависимости от концентрации перекиси водорода

Полученные продукты исследовались методом ИК-спектроскопии (рис. 2).

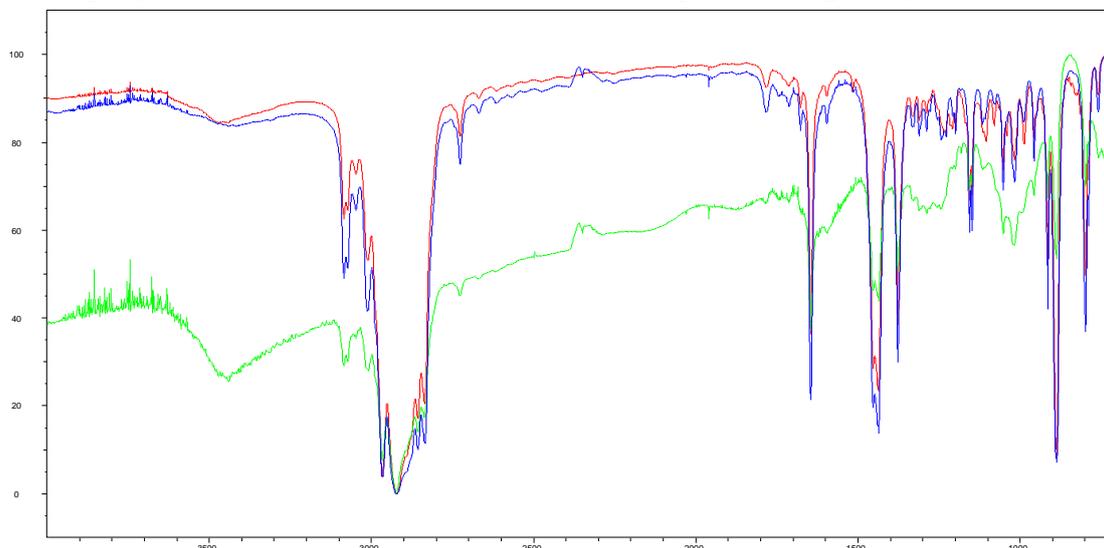


Рис. 2. ИК-спектр полученного масла

Анализ показал полное соответствие всех образцов масел. Таким образом можно сделать заключение, что при увеличении концентрации перекиси водорода происходит разложение не только клеточной структуры плодов цитрусовых, но и разложение масел и переход их в водорастворимую форму, за счет этого происходит снижение выхода готового масла при пароводной перегонке.

Библиографический список

1. Ozturk B. Green Processes for Deterpenation of Essential Oils and Extraction of Bioactive Compounds from Orange Peel Waste. The University of Manchester (United Kingdom), 2020.
2. Chanthaphon A., Chanthachum, S. and Hongpattarakere T. Antimicrobial Activities of Essential Oils and Crude Extracts from Tropical Citrus spp. Food-Related Microorganisms. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2008, 30(1): 125-131.
3. Nurul A.M. Study on Important Parameters Affecting the Hydro-Distillation for Ginger Oil Production. M. Eng. Thesis, UniversitiTeknologi, Malaysia, 2005.
4. Park S.M., Ko K.Y., Kim I.M. Optimization of d-limonene Extraction from Tangerine Peel in Various Solvents by Using Soxhlet Extractor. Korean Chemical Engineering Research, 2015, 53. 717-722. DOI: 10.9713/kcer.2015.53.6.717.
5. Fagbemi K.O., Aina D.A., Olajuyigbe O.O. Soxhlet Extraction versus Hydrodistillation Using the Clevenger Apparatus: A Comparative Study on the Extraction of a Volatile Compound from Tamarindus indica Seeds. 2021.
6. Muhammad M. Effects of Different Extraction Methods on Yield of Essential Oil from Orange Peels. Undergraduate Thesis, Abubakar Tafawa Balewa University, Bauchi, Nigeria, 2017.
7. Kusuma, H., Putra AFP. Comparison of Two Isolation Methods for Essential Oils from Orange Peel (*Citrus auranticum* L) as a Growth Promoter for Fish: Microwave Steam Distillation and Conventional Steam Distillation. Journal of Aquaculture Research & Development, 2016, 7. 1-5. DOI: 10.4172/2155-9546.1000409
8. Gavahian, M., Chu, Y.-H. and Mousavi K.A, Recent advances in the orange oil extraction: an opportunity for the valorization of orange peel waste a review. Int J Food Sci Technol, 2019, 54: 925-932.
9. Golmohammadi M., Borghei A., Zenouzi A., Ashrafi N., Taherzadeh J.M. Optimization of essential oil extraction from orange peels using steam explosion. Heliyon, 2018. 4(11):e00893. DOI: 10.1016/j.heliyon.2018.e00893
10. Kammegne P., Bella O., Gervais M., Dongo Y. Phytochemical Screening of Essential Oil of Citrus sinensis by Gas Chromatography-Flame Ionization Detector. Journal of Agricultural Science and Technology, 2015, B. 5. DOI: 10.17265/2161-6264/2015.03B.005

УДК 57.085.23, 57.085.25

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ СЕЛЕКТИВНОГО ДАВЛЕНИЯ ГЛЮФОСИНАТОМ АММОНИЯ

А.А. Галимова, И.Ф. Рахматуллина, З.А. Ибрагимова, Б.Р. Кулуев

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра РАН, г. Уфа, 450054, Россия

Генетическая трансформация злаковых культур – активно развивающееся направление биотехнологии. Процесс получения трансгенных растений условно делится на следующие этапы: перенос чужеродного генетического материала, получение растений-регенерантов и отбор трансгенных растений. Эффективный отбор трансгенных растений требует знаний концентраций и времени воздействия селективных агентов для культур тканей исследуемых видов растений. Цель нашей работы – выявление оптимальной концентрации и продолжительности воздействия глюфосината аммония (гербицид Basta) для отбора трансгенных регенерантов мягкой пшеницы в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: глюфосинат аммония, Basta, селективный отбор, мягкая пшеница

EFFICIENCY OF OBTAINING REGENERANT PLANTS OF BREAD WHEAT UNDER CONDITIONS OF AMMONIUM GLUFOSINATE SELECTIVE PRESSURE

A.A. Galimova, I.F. Rakhmatullina, Z.A. Ibragimova, B.R. Kuluev

¹Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, 71 Prospekt Oktyabrya, 450054, Ufa, Russia

Genetic transformation of cereal crops is an actively developing area of biotechnology. The process of obtaining transgenic plants is conventionally divided into the following stages: transfer of foreign genetic material, obtaining regenerated plants and selection of transgenic plants. Effective selection of transgenic plants requires knowledge of the concentrations and exposure times of tissue culture selective agents for the plant species being studied. The purpose of our work is to identify the optimal concentration and duration of exposure to ammonium glufosinate (Basta herbicide) for the selection of transgenic regenerants of bread wheat *in vitro*.

Keywords: ammonium glufosinate, Basta, selective screening, bread wheat

Введение. Глюфосинат — природный контактный гербицид широкого спектра действия. Он впервые обнаружен разными исследовательскими группами, исследующими *Streptomyces hygroscopicus* и *S. viridochromogenes* [4]. В промышленных масштабах гербицид выпускается под торговыми марками Биалафос, Basta, Rely и другие. На сегодняшний день имеются убедительные доказательства того, что основным фактором быстрой фитотоксичности у растений, обработанных глюфосинатом, являются активные формы кислорода (АФК) [8]. Накопление АФК в тилакоидах хлоропластов вызывает перекисное окисление клеточных мембран [5, 9] и гибель клеток.

Устойчивые к глюфосинату культуры могут метаболизировать глюфосинат за счет экспрессии генов *pat* или *bar* [1, 3]. Экспрессия этих генов в растениях позволяет расщеплять глюфосинат до биологически инертного метаболита, что позволяет использовать их в качестве селективируемых маркеров в векторах для трансформации растений. Это, в свою очередь,

предусматривает необходимость знаний концентраций гербицида для той или иной культуры растения и его частей. Как правило, в качестве эксплантов для каллусогенеза у растений мягкой пшеницы используются незрелые и зрелые зародыши [6]. Но на сегодняшний день результатов исследований по определению оптимальных концентраций глюфосината аммония и времени его воздействия на культуры тканей мягкой пшеницы нет, что и определило цель настоящей работы. Мы исследовали влияние препарата Basta на эффективность побегообразования и ризогенез, а так же на развитие растений-регенерантов из морфогенных каллусов, полученных из зрелых зародышей и выдержанных на разных концентрациях селективного агента определенный промежуток времени.

Материалы и методы. В работе использовалась мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.). В качестве эксплантов для получения каллусов использовались зрелые зародышиярового сорта мягкой пшеницы Тая. Поверхностную стерилизацию зерновок проводили по [2]. Далее целые зерновки помещали на индукционные питательные среды [7], содержащие каллусоиндуцирующие регуляторы роста 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) в концентрации 2 мг/л и 3-индолилуксусную кислоту (ИУК) в концентрации 0,5 мг/л и культивировали при температуре 25°C, в темноте в течение 14 дней с целью получения морфогенных каллусов. Затем для регенерации целых растений морфогенные каллусы помещали на регенерационные среды без регуляторов роста растений [7]. Экспланты культивировали в камере роста Binder (Германия) при температуре 25°C и освещении 5000 люкс. Далее регенеранты пересаживали в пластиковые контейнеры (MAGENTA GA-7 VESSEL, Sigma-Aldrich, США) и продолжали культивировать при тех же условиях температуры и освещения. В качестве селективного агента на основе глюфосината аммония был использован химически чистый реактив Basta (Macklin, Китай).

Результаты и их обсуждение. Проведена оценка влияния глюфосината аммония на способность каллусов, полученных в культуре зрелых зародышей на эффективность побего- и корнеобразования. Так, после калусообразования каллусы отделяли от зерновок и помещали на регенерационную среду с разной концентрацией селективного агента (0; 5.0; 7.5; 10, 15 мг/л) и выдерживали на каждой концентрации 7, 14, 21 и 28 суток. Затем каллусы и/или регенеранты пересаживали на среду без глюфосината аммония. Спустя 4 недели культивирования определяли долю эксплантов, которые образовали зеленый каллус, побег, корневую систему и полноценные регенеранты (рис. 1).

Так, за 28 суток культивирования эксплантов на разных концентрациях глюфосината аммония зеленые каллусы были получены для всех опытных вариантов с достаточно высокой эффективностью (рис. 1 а). На стадии побегообразования начинают появляться различия в частоте образования зеленых побегов между разными концентрациями глюфосината аммония – уменьшение числа эксплантов, образовавших побег с ростом концентрации селективного агента (рис. 1 б). Продолжительность контакта с гербицидом так же сказывалась на частоте образования эксплантами корней. Культивирование эксплантов на среде с концентрацией препарата Basta 15 мг/л дольше 14 суток привело к полному отсутствию процесса корнеобразования. По рисунку 4в видно, что воздействие гербицида даже в концентрации 10 мг/л дольше 14 суток так же критично для процесса корнеобразования (рис. 1 в). Анализ доли эксплантов, давших растения-регенеранты, показал, что продолжительность контакта с гербицидом до 7 суток для эксплантов не критично. Регенеранты были получены даже при культивировании на среде с концентрацией селективного агента 15 мг/л (рис. 1 г).

Заключение. Таким образом, определена схема селективного давления глюфосината аммония, которая может быть использована для отбора каллуса и регенерантов мягкой пшеницы, полученных в культуре зрелых зародышей.

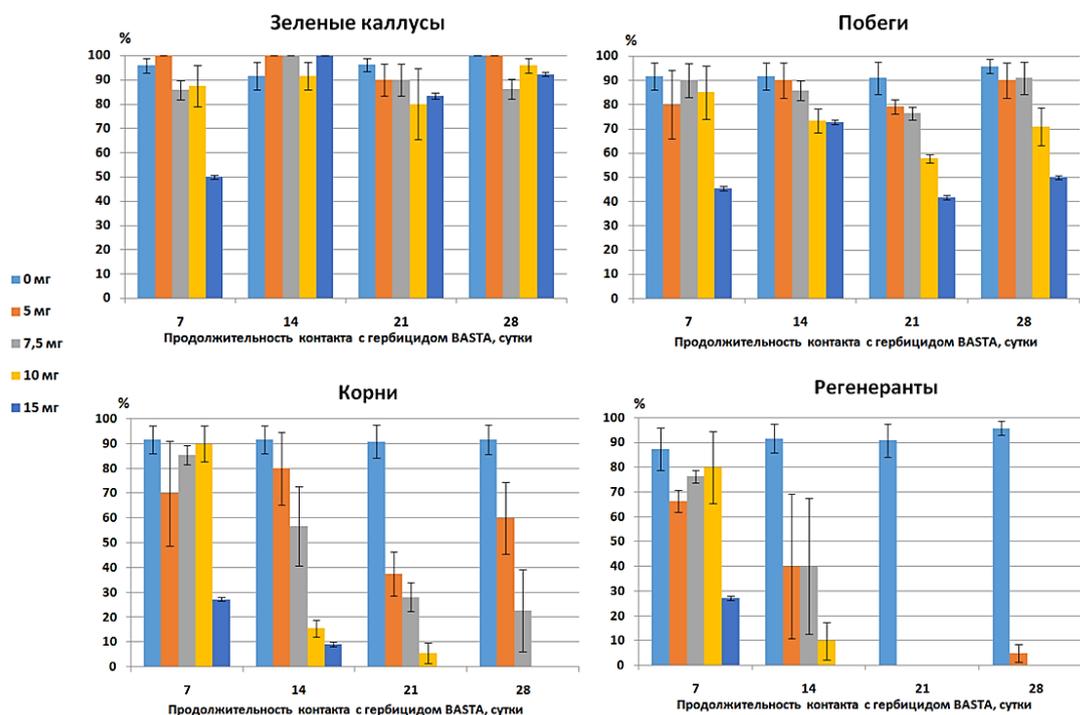


Рисунок 1. Доли (ось y) каллусов с зелеными точками регенерации (а), каллусов с побегами (б), каллусов с корнями (в), каллусов, образовавших растения-регенеранты (г) при использовании разных концентраций глюфосината аммония (0 мг/л, 5.0 мг/л, 7.5 мг/л, 10 мг/л и 15 мг/л) и разной продолжительности его воздействия (7, 14, 21 и 28 суток) (ось x).

Благодарности. Статья подготовлена при поддержке Минобрнауки России в рамках госзадания №122030200143-8

Библиографический список

- Anderson JA, Ellsworth PC, Faria JC, Head GP, Owen MDK, Pilcher CD, Shelton AM, Meissle M (2019) Genetically Engineered Crops: Importance of Diversified Integrated Pest Management for Agricultural Sustainability. *Front BioengBiotechnol* 7:24
- Bartok T, Sági F (1990) A new endosperm-supported callus induction method for wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 22: 37-41
- Bawa, AS, Anilakumar KR (2013). Genetically modified foods: safety, risks and public concerns- a review. *J Food Sci Technol* 50:1035–1046
- Bayer E, Gugel K, Hagele K, Hagenmaier H, Jessipow S, Koning W and Zahner H (1972) Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. Phosphinothricin und Phosphinothricyl-alanyl-alanin. *HelvChim Acta* 55: 224-239
- Demidchik V (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environ Exp Bot* 109: 212-228
- Gumerova GR, Galimova AA, Kuluev BR (2023) Bread wheat callusogenesis and organogenesis using mature embryos as explants. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding* 184: 19-28
- Sparks CA, Jones HD (2009) Biolistics transformation of wheat. *Methods in Molecular Biology* 478: 71-92.
- Takano HK, Beffa R, Preston C, Westra P and Dayan FE (2020) A novel insight into the mechanism of action of glufosinate: How reactive oxygen species are formed. *Photosynth Res* 144:361-372
- Takano HK, Patterson EL, Nissen SJ, Dayan FE and Gaines TA (2019) Predicting herbicide movement across semi-permeable membranes using three phase partitioning. *PesticBiochemPhysiol* 159: 22-26.

УДК 579.64

РИЗОСФЕРНЫЕ ЭНЕТРОБАКТЕРИИ АРИДНЫХ ЭКОСИСТЕМ КАК ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

*А.Р. Гальперина**, *О.Б. Сопрунова*, *А.Ш. Бареева*

*Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования
«Астраханский государственный технический университет», Астрахань, Россия;*

**E-mail: alina_r_s@rambler.ru*

В период 2019-2024 гг. проведены исследования по изучению микроорганизмов ризосферы культурных и дикорастущих растений. В ходе исследований сформирована коллекция из 50 изолятов, обладающих биотехнологически ценными свойствами: способностью к солюбилизации неорганических фосфатов, синтезу индолилуксусной кислоты, антифунгальной активностью и стимулирующим эффектом по отношению к семенам томатов. Видовая идентификация изолятов выявила доминирование представителей рода *Enterobacter*, также были выявлены представители родов *Klebsiella*, *Mixta*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*.

Ключевые слова: аридные экосистемы, микроорганизмы ризосферы, свойства микроорганизмов

Аридная зона – природная зона, характеризующаяся особенностями климата, приводящими к недостатку влаги для жизни организмов. Для растений, обитающих в аридных и полуаридных зонах, характерны сложные адаптационные стратегии, включающие в себя биохимические, физиологические и молекулярные механизмы для смягчения различных биотических и абиотических стрессов. Помимо приспособительных функций самих растений в аридных условиях существенно возрастает значимость ризосферной микробиоты, прошедшей эволюционный отбор на оптимальное функционирование и взаимодействие с макроорганизмом. Роль ризосферной микробиоты в увеличении доступности питательных веществ является ключом к разработке климатически оптимизированных агротехнических методов [1,2].

Сообщество микроорганизмов ризосферы обладает пластичностью и способно адаптироваться к абиотическим стрессам, повышая устойчивость к ним растения. Ризосферные микроорганизмы аридных экосистем являются природным резервуаром для выделения штаммов с широким перечнем биотехнологически ценных свойств: солюбилизации нерастворимых соединений фосфора, антагонизму к фитопатогенам, фиксацией молекулярного азота, увеличением пула органического углерода и синтезу фитогормонов [3].

В период 2019-2024 гг. проведены исследования по изучению микроорганизмов ризосферы следующих культурных и дикорастущих растений, произрастающих на территории Астраханской области: мята перечная – *Mentha piperita*, малина садовая – *Rubus idaeus*, смородина черная – *Ribes nigrum*, подсолнечник однолетний – *Helianthus annuus*, чеснок посевной – *Allium sativum*, подсолнечник клубеносный – *Helianthus tuberosus*, вяз мелколистный – *Ulmus parvifolia*, подорожник большой – *Plantago major*, верблюжья колючка обыкновенная – *Alhagi pseudoalhagi*, дурнишник обыкновенный – *Xanthium strumarium*; тростник южный – *Phragmites australis*; солодка голая – *Glycyrrhiza glabra*, полынь малоцветковая – *Artemisia pauciflora*, полынь австрийская – *Artemisia austriaca*, сарсазан шишковидный – *Halocnemum strobilaceum*; солерос европейский – *Salicornia europaea*; седобассия очитковидная – *Sedobassia sedoides*; сведа высочайшая – *Suaeda altissima*; камфоросма монпельйская – *Camphorosma monspeliaca*; хвойник двуколосковый – *Ephedra distachya*; солянка содоносная –

Salsola soda; астрагал яйцеплодный – *Astragalus testiculatus*; боялыч древовидный - *Xylosalsola arbuscula*; сведа солончаковая - *Suaeda salsa*.

Культурные растения подвергались агротехническому воздействию: регулярные поливы, подкормки и обработки от вредителей и заболеваний. Дикорастущие отбирались в местах, максимально удаленных от водоемов, солелюбивые – в местах явного засоления.

Изучение микроорганизмов вели методом накопительных культур, акцент делали на выделении фосфатмобилизирующих микроорганизмов [4]. Всего за указанный период было исследовано более 125 проб ризосферы растений, поставлено 300 накопительных культур и выделено более 140 изолятов. Изучение тинкториальных признаков изолятов выявило доминирование грамтрицательных форм - 97%, грамположительные формы составили – 3%. По морфологии клеток все выделенные изоляты были представлены палочковидными формами, из которых спорообразующих – 3%, неспорообразующих – 97%. Активной подвижностью обладали 54% изолятов. 50 изолятов, сохраняющих жизнеспособность *in vitro*, отобрали для последующих исследований [5, 6,7, 8].

При изучении способности изолятов к солибилизации фосфора отмечено, что наиболее активно проявляют эти свойства 6 изолятов, увеличивая количество подвижного фосфора в среде до 6 мкмоль/мл за 60 часов. Выявлено, что 19 изолятов способны к триптофаниндуцированному синтезу ИУК в количестве более 95 мкг/мл [9].

16 изолятов проявляют средний и высокий фунгистатический антагонизм по отношению к микромицетам р. *Alternaria*. Изоляты образуют зоны задержки роста микромицетов, подавляют развитие воздушного мицелия, способствуют формированию излишне разветвленного и септированного мицелия, а также сферопластоподобных структур. Выявлено, что 12 изолятов в виде водных суспензий обладают стимулирующим эффектом по отношению к семенам томатов сортов ранней и средней спелости. Стимулирующее действие проявляется как на всхожесть семян, так и на морфометрические параметры проростков.

Видовая идентификация изолятов проводилась путем секвенирования гена 16SpPНК с последующим поиском гомологичных последовательностей при использовании баз данных EzBioCloud. По итогам исследований изоляты были идентифицированы как представители родов: *Enterobacter* (филум *Pseudomonadota*, класс *Gammaproteobacteria*, порядок *Enterobacterales*, семейство *Enterobacteriaceae*) - 36 изолятов; *Klebsiella* (филум *Pseudomonadota*, класс *Gammaproteobacteria*, порядок *Enterobacterales*, семейство *Enterobacteriaceae*) - 2 изолята; рода *Mixta* (филум *Pseudomonadota*, класс *Gammaproteobacteria*, порядок *Enterobacterales*, семейство *Erwiniaceae*); *Pseudomonas* (филум *Pseudomonadota*, класс *Gammaproteobacteria*, порядок *Pseudomonadales*, семейство *Pseudomonadaceae*); *Bacillus* (филум *Bacillota*, класс *Bacilli*, порядок *Caryophanales*, семейство *Bacillaceae*); *Paenibacillus* (филум *Bacillota*, класс *Bacilli*, порядок *Bacillales*, семейство *Paenibacillaceae*) – по 1 изоляту.

Таким образом, среди выделенных и изученных ризосферных энтеробактерий 6 штаммов способны увеличивать количество подвижного фосфора в среде, 15 штаммов обладают повышенным синтезом ИУК, 10 штаммов проявляют средний и высокий фунгистатический антагонизм по отношению к микромицетам р. *Alternaria*, 11 штаммов в виде водных суспензий обладают стимулирующим эффектом по отношению к семенам томатов сортов ранней и средней спелости. Все выявленные свойства позволяют рассматривать имеющиеся штаммы как основу для создания новых агробiotехнологий, применяемых в условиях аридного климата Астраханской области.

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-26-00227 «Генетическая паспортизация ризосферных микроорганизмов аридных экосистем с биотехнологически значимыми свойствами».

Библиографический список

1. Гулянов Ю.А., Чибилёв А.А. Экологизация степных агротехнологий в условиях природных и антропогенных изменений окружающей среды // Теоретическая и прикладная экология. 2019. № 3. С. 5–11. doi:10.25750/1995-4301-2019-3-005-011.
2. Backer R., Rokem J.S., Pangumaran G., Lamont J., Praslickova D., Ricci E., Subramanian S., Smith D.L. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture // *Frontiers in Plant Science*. 2018. V. 9. Article No. 1473. doi:10.3389/fpls.2018.01473
3. Ayangbenro A.S., Babalola O.O. Reclamation of arid and semi-arid soils: The role of plant growth-promoting archaea and bacteria // *Current Plant Biology*. 2021. V. 25. Article No. 100173. doi:10.1016/j.cpb.2020.100173
4. Методические указания по выделению микроорганизмов, растворяющих труднодоступные минеральные и органические соединения фосфора // Под ред. Г.С. Муромцева. Л.: ВНИИСХМ, 1981. 20 с.
5. Malinovskaya I.M. Determination of phosphate-dissolving activity of microorganisms on liquid and agarised media // *Agroecological Journal*. 2002. No. 3. P. 68–71.
6. Щербаков, А.В. Эндофитные бактерии, населяющие семена пшеницы, перспективные продуценты микробных препаратов для сельского хозяйства // *Достижения науки и техники АПК*. 2013. №7. С.35–38.
7. Актуганов Г.Э., Мелентьев А. И., Галимзянова Н. Ф., Широков А. В. Исследование миколитических свойств аэробных спорообразующих бактерий продуцентов внеклеточных хитиназ // *Микробиология*. 2008. Т. 77. N 6. С. 788-797.
8. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* / Stackebrandt E., Goodfellow M. (Eds.) New York.: John Wiley and Sons, 1991. P. 115-175.
9. Юсупова Д.М., Бареева А.Ш., Гальперина А.Р., Сопрунова О.Б. «Изучение способности ризосферных микроорганизмов к продукции ИУК и влиянию на рост растений» // *Инновации и продовольственная безопасность*. 2023. №3. С. 83-90. doi:10.31677/2311-0651-2023-41-3-83-90

УДК 579.695

БАКТЕРИАЛЬНАЯ АССОЦИАЦИЯ АКТИНОМИЦЕТОВ – АКТИВНЫЙ БИОАККУМУЛЯТОР ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

А.А. Голышева^{1,2}, Л.В. Литвиненко¹, И.Б. Ившина^{1,2}

¹*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (ПФИЦ УрО РАН), г. Пермь, Россия*

²*ФГАОУ ВО “Пермский государственный национальный исследовательский университет”, г. Пермь, Россия*

В сравнительных исследованиях на примере штаммов *Gordonia paraffinivorans* ИЭГМ 735 и *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 560 проанализированы ответные реакции и степень устойчивости алканотрофных актиномицетов к токсическому воздействию тяжелых металлов (ТМ). Устойчивость свободных и иммобилизованных клеток к металлам варьировала от 0,08 до 1280,00 мМ в зависимости от условий эксперимента и использования конкретного ТМ. Выявлены изменения бактериальных клеток в присутствии экополлютантов, способствующие снижению токсического воздействия ТМ на микроорганизмы. У исследованных штаммов актиномицетов не обнаружены мобильные генетические элементы (плазмиды). В ходе биоинформатического анализа выявлены подсистемы кодирующих последовательностей, влияющие на устойчивость к ТМ. Получена иммобилизованная на твердом носителе микробная ассоциация. Разработанный бактериальный консорциум извлекает от 80 до 100% ионов кадмия, хрома, меди железа, ртути, марганца, магния, никеля, свинца и цинка из модельных сточных вод. **Ключевые слова:** актиномицеты, *Gordonia*, *Rhodococcus*, бактериальная ассоциация, биоремедиация, тяжелые металлы, устойчивость, аккумуляция.

BACTERIAL ASSOCIATION OF ACTINOMYCETES – AN ACTIVE BIOACCUMULATOR OF HEAVY METALS

A.A. Golysheva^{1,2}, L.V. Litvinenko¹, I.B. Ivshina^{1,2}

¹*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences – Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russia*

²*Perm State National Research University, Perm, Russia*

Alkanotrophic actinomycetes *Gordonia paraffinivorans* IEGM 735 and *Rhodococcus ruber* IEGM 560 were studied for their resistance to heavy metals (HM). The resistance of free and immobilized cells varied from 0.08 to 1280.00 mM, depending on experimental conditions and the specific HM. Changes in bacterial cells helped reduce the toxic effects of heavy metals. The studied strains did not contain any plasmids. Bioinformatics analysis revealed genetic subsystems influencing resistance to HM. A microbial association immobilized on a solid support was obtained, and this consortium extracted from 80 to 100% of cadmium, chromium, copper, iron, mercury, manganese, magnesium, nickel, lead and zinc ions from model wastewater.

Keywords: actinomycetes, *Gordonia*, *Rhodococcus*, bacterial association, bioremediation, heavy metals, resistance, accumulation.

Загрязнение объектов окружающей среды опасными отходами, органическими загрязнителями, тяжелыми металлами (ТМ) и пластиком отрицательно сказывается на

природной экосистеме в ущерб живым организмам. Металлы попадают в водные и наземные экосистемы в результате деятельности промышленных предприятий [1]. Сегодня практически отсутствуют незагрязненные ТМ территории, что представляет экологическую опасность для всего живого ввиду повышенной токсичности, небиоразлагаемости и стойкости металлического загрязнения [8].

Ионы ТМ легко аккумулируются в клетках по системам транспорта щелочных и щелочноземельных металлов, занимая их место в процессах метаболизма [10]. Наиболее часто в загрязненных объектах встречаются такие ТМ, как Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Mo, Pb и Zn [6]. По статистическим данным за 2021 г., фоновое содержание ТМ 1 класса опасности (кадмия, ртути, свинца) в поверхностных водах РФ соответствовало диапазонам значений от 0,02 до 3,0 мкг/л Cd (ПДК 0,001 мг/л), от 0,21 до 0,67 мкг/л Hg (ПДК 0,5 мкг/л) и от 0,28 до 1,62 мкг/л Pb (ПДК 0,03 мг/л) [4, 7].

Для решения проблемы загрязнения тяжелыми металлами требуются эффективные стратегии защиты окружающей среды и экономически выгодные технологии биоремедиации с использованием микроорганизмов [2, 9]. Цель настоящего исследования – изучение потенциала устойчивости непатогенных актиномицетов к ионам ТМ и создание микробной ассоциации на основе высокоустойчивых штаммов, пригодной для очистки промышленных сточных вод от ионов Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} , $Fe_{общ.}$, Hg^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} .

Материалы и методы. В работе использовали штаммы актиномицетов *Gordonia paraffinivorans* ИЭГМ 735 и *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 560 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, УНУ/ЦКП 73559/480868, номер 285 во Всемирной федерации коллекции культур, <http://www.iegmcoll.ru>). Бактериальные клетки предварительно выращивали на мясопептонном агаре в течение 48 ч. В работе использовали соли ТМ: $ZnSO_4 \times 7H_2O$, $Pb(NO_3)_2$, K_2CrO_4 , $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$, $NiSO_4 \times 7H_2O$, $CuSO_4 \times 5H_2O$, $(CH_3COO)_2Cd \times 2H_2O$, $HgCl_2$, MnO_2 , $MnSO_4 \times 7H_2O$, $MgSO_4 \times 7H_2O$ в концентрации от 0,02 до 1280,00 мМ. Для определения количественной характеристики резистентности свободных клеток актиномицетов к экотоксиканту использовали показатель минимальной ингибирующей концентрации (МИК) [5]. Влияние ТМ на морфологию и рельеф поверхности клеток исследовали с использованием системы атомно-силового (АСМ) сканирования MFP-3D-BIOTM (Asylum Research Inc., США).

Для изучения устойчивости иммобилизованных бактерий в качестве сорбента использовали отходы древесной промышленности – сосновые опилки. Степень адсорбции клеток на носителе оценивали с помощью спектрофотометра Lambda EZ201 UV/Vis (Perkin-Elmer, США) по показателю оптической плотности ($\lambda=600$ нм) клеточной суспензии. Жизнеспособность бактериальных клеток определяли по появлению мутности в питательной среде, а также специфическому окрашиванию хлоридом йодонитротетразолия на 7 сут эксперимента. Для оценки локализации генов, кодирующих признак устойчивости бактерий к ТМ, применяли метод горизонтального гель-электрофореза выделения плазмидной ДНК в агарозном геле.

В качестве контроля использовали маркер длин ДНК из 10 фрагментов в диапазоне от 100 до 1000 п.н. Поиск возможных генов, кодирующих белки, обуславливающие резистентность к ТМ, проводили с помощью базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и сервера RAST (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>), используя данные полногеномного секвенирования. Для очистки модельной сточной воды (МСВ) использовали лабораторный колоночный биореактор и модель биореактора с перемешиванием, заполненные носителем с иммобилизованными бактериальными клетками. Степень адсорбции клеток контролировали с помощью спектрофотометра. В качестве контроля использовали неинокулированный носитель. МСВ соответствовали элементному составу ТМ промышленных предприятий (табл. 1). Исходное содержание ТМ принимали за 100%. Эксперименты проводили в течение 7 сут. Остаточное

содержание ТМ регистрировали с помощью атомно-абсорбционного спектрометра “МГА-1000” (Люмэкс, Санкт-Петербург). Все эксперименты проводили в трехкратной повторности.

Таблица 1

Элементный состав модельных сточных вод промышленных предприятий

ТМ	Концентрация ТМ, мг/л		
	МСВ № 1	МСВ № 2	МСВ № 3
Cd ²⁺	<0,005	–*	0,001
Cr ⁶⁺	0,008	0,200	0,006
Cu ²⁺	0,270	0,200	0,004
Fe _{общ.}	0,653	0,050	0,284
Hg ²⁺	0,022	4,500	0,003
Mg ²⁺	<0,050	0,600	0,008
Mn ²⁺	0,005	–*	0,159
Ni ²⁺	–*	–*	0,034
Pb ²⁺	–*	–*	0,002
Zn ²⁺	–*	–*	0,021

Примечание: МСВ № 1 – ОАО “ВОЛГОЦЕММАШ”, Тольятти; МСВ № 2 – ОАО “Уральский оптико-механический завод” имени Э.С. Яламова”, гальванический цех, Екатеринбург; МСВ № 3 – Усольская промышленная зона “р. Ангара, канава гидрозолоудаления (ГЗУ)”, г. Усолье-Сибирское; * – ТМ не входит в состав МСВ.

Результаты. По нашим данным, устойчивость исследованных штаммов к ТМ находилась в диапазоне от 0,08 до 1280,00 мМ в зависимости от физико-химических характеристик того или иного металла. По степени токсичности в отношении микробной ассоциации ТМ распределены в ряд: Hg²⁺ > Cd²⁺ > Zn²⁺ > MoO₄²⁻ > Cu²⁺ > CrO₄²⁻ > Ni²⁺ > Pb²⁺ > Mn⁴⁺ > Mn²⁺. В присутствии ТМ бактериальные клетки демонстрировали высокую (80–100 %) степень жизнеспособности. Как видно из табл. 2, иммобилизованные клетки проявляли большую устойчивость к ТМ по сравнению с нативными (табл. 2). Так, устойчивость к Mo⁶⁺ и Hg²⁺ клеток *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 повышалась в 4,0 раза, в 2,0 раза – к Pb²⁺, Cr⁶⁺ и Zn²⁺, клеток *R. ruber* ИЭГМ 560 – в 15,6 раз к Hg²⁺, в 2,0 раза – к Cd²⁺, Mo⁶⁺, Cr⁶⁺ и Zn²⁺.

Таблица 2

Устойчивость к ТМ свободных и иммобилизованных актиномицетов

ТМ	МИК, г/л			
	<i>G. paraffinivorans</i> ИЭГМ 735		<i>R. ruber</i> ИЭГМ 560	
	Свободные	Иммобилизованные	Свободные	Иммобилизованные
Cd ²⁺	17,90	17,90	8,95	17,90
Cr ⁶⁺	16,61	33,22	4,15	8,30
Cu ²⁺	0,32	0,32	0,64	0,64
Hg ²⁺	0,02	0,08	0,02	0,32
Mg ²⁺	157,67	157,67	157,67	157,67
Mn ²⁺	151,01	151,01	24,16	24,16
Mn ⁴⁺	111,30*	111,30*	111,30*	111,30*
Mo ⁶⁺	3,36	13,44	6,72	26,88
Ni ²⁺	75,14	75,14	75,14	75,14
Pb ²⁺	8,29	16,58	33,16*	33,16*
Zn ²⁺	10,46	20,92	5,23	10,46

Примечание – * – выше пределов растворимости соли.

Экспериментально обосновано изменение размеров (уменьшение длины до 1,5 раз) и шероховатости (снижение до 2,3 раз) клеточной поверхности у штамма *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 (рис. 1) в присутствии ТМ по сравнению с контролем.

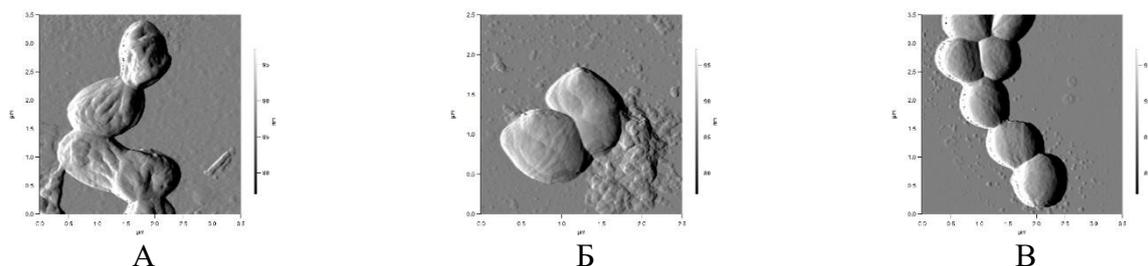


Рисунок 1. Клетки *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735, АСМ, 24 ч

А – МПБ, биотический контроль; Б – МПБ + Cd^{2+} (5,00 мМ); В – МПБ + Cr^{6+} (5,00 мМ)

Так, при воздействии кадмия наблюдалось нарушение мембран и клеточной стенки, нередко выход содержимого клетки в среду, в некоторых случаях – лизис клетки (рис. 1 Б), при этом жизнеспособность составляла 45–55%. При воздействии хрома (рис. 1 В), регистрировали формирование клеточных конгломератов, что, по-видимому, снижает негативное воздействие металла на бактериальную клетку. При воздействии ТМ на клетки *R. ruber* ИЭГМ 560 (рис. 2) также выявлены изменения размеров клеток (уменьшение длины более чем в 2,5 раза) и степени шероховатости клеточной поверхности (снижение до 2,3 раз) по сравнению с контролем.

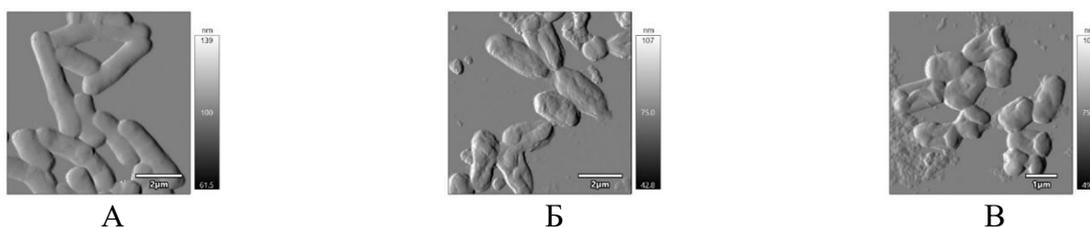


Рисунок 2. Клетки *R. ruber* ИЭГМ 560, АСМ, 24 ч

А – МПБ, биотический контроль; Б – МПБ + Cd^{2+} (5,00 мМ); В – МПБ + Cr^{6+} (5,00 мМ)

При воздействии сублетальных концентраций ТМ сохранялась исходная морфология клетки, не наблюдался лизис клеток. Однако при этом нарушалась внешняя мембрана и происходил выход клеточного содержимого (рис. 2 Б, рис. 2 В). Жизнеспособность сохраняется на уровне 65–75%. Проведенное исследование при помощи горизонтального гелевого электрофореза выявило отсутствие плазмид, что свидетельствует о хромосомном характере устойчивости использованных в работе штаммов к ТМ. В результате биоинформатического анализа были обнаружены (рис. 3) наиболее распространенные подсистемы кодирующих последовательностей, которые могут обуславливать устойчивость актиномицетов к ТМ. Нуклеотидные последовательности отвечают за синтез продуктов: транспортные белки; регуляторы транскрипции РНК; транспортеры катионов двухвалентных металлов; редуктазы Hg^{2+} ; семейство белков устойчивости к Co , Zn , Cd , Cr , Ni ; белки сборки цитохром-С-оксидаз и прочее.

По нашим данным, иммобилизованные на носителе актиномицеты способны к аккумуляции ТМ из МСВ. Условия проводимых экспериментов (состав МСВ, начальная концентрация ТМ, варианты очистки) влияли на процесс аккумуляции ТМ. Количество осевших на поверхность носителя клеток составляло 81,9–88,7%. При проведении процесса биоочистки (табл. 3) МСВ №1 с использованием бактериальной ассоциации в биореакторе с перемешиванием и колоночном биореакторе наблюдали полное (100%) извлечение Pb^{2+} и Zn^{2+} .

Остальные ТМ аккумулировались в диапазоне от 54,6 до 99,4%. Очистка МСВ № 2 в колоночном биореакторе от ионов Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} и Cr^{6+} составила 100%, $\text{Fe}_{\text{общ.}}$ – 96,7 %, в биореакторе с перемешиванием – 85,4–99,9 %. Очистка МСВ № 3 от ионов Pb^{2+} в колоночном биореакторе составила 100 %, в биореакторе с перемешиванием извлечение ТМ достигало 42,7–99,9 %. Очистка с помощью неинокулированного носителя не показала достоверно значимых изменений содержания ТМ.



Рисунок 3. Число кодирующих последовательностей у *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 и *R. ruber* ИЭГМ 560

Таблица 3

Извлечение ТМ из модельных сточных вод с помощью бактериальной ассоциации

ТМ	Аккумуляция ТМ, %				
	Биореактор с перемешиванием				Консорциум, колоночный биореактор
	Носитель (контроль)	ИЭГМ 735	ИЭГМ 560	Консорциум	
Модельная сточная вода № 1					
Cd^{2+}	10,0	96,0	96,0	94,0	100,0
Cr^{6+}	4,5	61,8	4,5	67,7	54,6
Cu^{2+}	5,0	87,5	76,3	72,5	63,5
$\text{Fe}_{\text{общ.}}$	0,0	4,4	1,0	45,0	38,6
Ni^{2+}	3,6	99,1	98,5	98,9	99,4
Pb^{2+}	10,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Zn^{2+}	8,6	100,0	100,0	100,0	100,0
Модельная сточная вода № 2					
Cr^{6+}	9,2	99,4	98,8	99,9	100,0
Cu^{2+}	10,0	99,9	98,3	99,2	100,0
$\text{Fe}_{\text{общ.}}$	6,7	91,6	90,8	90,3	96,7
Ni^{2+}	5,0	99,6	95,5	97,5	100,0
Zn^{2+}	8,0	85,4	88,2	96,8	100,0
Модельная сточная вода № 3					
Cd^{2+}	5,8	56,0	58,6	80,7	86,5

Cr ⁶⁺	10,9	56,4	79,9	84,3	89,9
Cu ²⁺	8,9	42,7	60,8	81,9	86,0
Fe _{общ.}	6,7	56,3	53,2	60,6	63,4
Hg ²⁺	8,1	47,9	52,1	76,4	77,5
Mg ²⁺	6,3	62,5	59,6	71,7	70,9
Mn ²⁺	2,5	96,0	96,1	96,7	97,7
Ni ²⁺	4,6	86,8	85,3	88,3	91,2
Pb ²⁺	6,7	99,0	98,5	99,9	100,0
Zn ²⁺	7,6	74,4	69,7	69,3	78,6

Заключение. В результате проведенных исследований выявлены морфофизиологические изменения в клетках *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 и *R. ruber* ИЭГМ 560, возникающие при стрессе в ответ на воздействие ТМ. Результаты очистки МСВ позволяют рассматривать иммобилизованный на носителе консорциум непатогенных актиномицетов *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 и *R. ruber* ИЭГМ 560 в качестве потенциального агента биоаккумуляции ТМ. По результатам экспериментальной работы получен патент на изобретение [3].

Благодарности. Исследования выполнены в рамках госзадания 124020500028-4 при использовании оборудования ЦКП “Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов” и “Исследование материалов и веществ” Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук.

Библиографический список

1. Булаев А.Г. Биотехнологические методы очистки сточных вод цветной металлургии // Биотехнология. 2015. № 3. С. 8–29.
2. Вертинский А.П. Физико-химические методы очистки сточных вод: проблемы, современное состояние и возможные пути усовершенствования // Инновации и инвестиции. 2019. № 11. С. 257–261.
3. Гольщева А.А., Литвиненко Л.В., Ившина И.Б. Иммобилизованная микробная ассоциация *Gordonia paraffinivorans* ИЭГМ 735 и *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 560 – активный аккумулятор тяжелых металлов. Патент РФ 2818318. Приоритет изобр. 13.12.2023. Зарег. в Госреестре изобр. РФ 02.05.2024. Бюл. № 13.
4. ГОСТ Р 70281-2022 от 5.10.2022 г. “Охрана окружающей среды. Почвы. Классификация химических веществ для контроля загрязнения”.
5. Ившина И.Б., Куюкина М.С., Костина Л.В. Адаптационные механизмы неспецифической устойчивости алканотрофных актинобактерий к ионам тяжелых металлов // Экология. 2013. № 2. С. 115–123.
6. Основные показатели охраны окружающей среды. Статистический бюллетень. М.: Федеральная служба государственной статистики. 2021. С. 24–33.
7. Черногаева Г.М. Обзор состояния и загрязнения окружающей среды в Российской Федерации за 2021 год. М.: Росгидромет. 2022. 220 с.
8. Abdel-Ghani N., El-Chagbaby G. Biosorption for metal ions removal from aqueous solutions: A review of recent studies // Int. J. Latest Res. Sci. Technol. 2014. No.3. P. 24–42.
9. Alvarez A. et al. Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals // Chemosphere. 2017. Vol. 166. P. 41–62.
10. Shen Z. et al. Ecological and health risks of heavy metal on farmland soils of mining areas around Tongling City, Anhui, China // Environ. Sci. Pollut. Res. 2019. Vol. 26. P. 15698–15709.

УДК 54.061: 54.062: 542.61: 542.973

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КИСЛОТНЫХ КАТАЛИЗАТОРОВ НА ДИНАМИКУ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В ПРОЦЕССЕ ГИДРОЛИЗА ДРЕВЕСНОЙ МАССЫ ХВОЙНЫХ ПОРОД

Т. М. Гребенкина

Медицинский университет «РЕАВИЗ», Самара, Россия

В статье представлены сведения по изучению кинетики процесса гидролиза для установления оптимальных условий определения глюкозы в присутствии кислотных катализаторов. В качестве объектов исследования использовали остатки древесной массы хвойных пород после переработки сырья. Гидролиз осуществляли при атмосферном давлении, температуре 100 °С в течение 5 часов. В качестве катализаторов использовали 2н хлороводородную и 2н ортофосфорную кислоты. Содержание глюкозы в гидролизатах устанавливали методом хроматографии в тонком слое с последующим денситометрическим детектированием. Общее содержание свободных углеводов определяли спектрофотометрическим методом с пикриновой кислотой в пересчете на глюкозу. Расчет степени конверсии древесной массы осуществляли после её высушивания при 103 °С до постоянного веса. Исследования показали, что через 1 час процесса гидролиза содержание глюкозы в присутствии 2н хлороводородной кислоты было в 5,5 раза больше, чем в присутствии 2н ортофосфорной и продолжало накапливаться в последующие два часа. Дальнейшее ведение гидролиза не установило существенного изменения в накоплении целевого продукта. В результате экспериментов были рассчитаны эффективные константы скорости образования глюкозы и степень конверсии древесной массы хвойных пород в присутствии 2н хлороводородной и 2н ортофосфорной кислот. Показано, что процесс гидролиза при 100 °С в присутствии 2н хлороводородной кислоты является оптимальным через 3 часа от начала реакции. Анализ влияния продолжительности кислотного гидролиза биополимеров на примере древесной массы хвойных пород подтвердил возможность осуществления управляемого процесса с целью получения целевого мономера – глюкозы.

Ключевые слова: глюкоза, общие свободные углеводы, кислотный гидролиз, кинетика.

Введение

В условиях повышения требований к рациональному использованию возобновляемых природных ресурсов возникает необходимость эффективного применения и внедрения на различных стадиях производства остатков и отходов, образующихся в процессах переработки сырья [6]. Древесина – это дешевый возобновляемый, экологически чистый материал, обладающий антиаллергенными свойствами, один из основных стратегических запасов России, который используется во многих отраслях: строительство, создание конструкций, в качестве сырья для изготовления связующих композитов. Известно, что процессы химической переработки древесины включают гидролиз, делигнификацию, экстракцию, пиролиз, в результате чего получают различные вещества. В частности, при переработке древесины гидролизом получают глюкозу, этанол, органические кислоты, фурфурол и его производные.

Самый распространенный природный мономер – глюкоза – образуется в результате фотосинтеза и, участвуя в биохимических реакциях, синтезирует биополимеры, одна из функций которых обеспечивать механическую прочность растительных тканей. Глюкоза и её изомеры используются в качестве сырья для получения глюкозного сиропа, продуктов для спортсменов, кормовых добавок, аскорбиновой кислоты, сорбита, ветеринарных препаратов, производства этилового спирта, лимонной, молочной и леулиновой кислот. Основной способ получения глюкозы из растительного сырья – гидролиз, который может осуществляться в присутствии ферментативных [8], кислотных и щелочных катализаторов. В гидролизной промышленности

применяются методы кислотно-каталитического воздействия [4, 7], которые требуют энергетических затрат. В промышленных масштабах гидролиз древесной массы осуществляется в присутствии 0,4–0,7 % серной кислоты при температуре 180–190 °С и давлении 0,6–1,5 МПа [5].

Изучение влияния различных катализаторов на процессы гидролиза биополимеров продолжает оставаться актуальным, поскольку важно не только получение целевого продукта, но и рациональный подход к процессам энерго- и ресурсосбережения.

Цель работы: изучить влияние кислотных катализаторов на динамику содержания глюкозы в процессе гидролиза древесной массы хвойных пород.

Материал и методы

Образцы для исследования. Отходы древесной массы хвойных пород. Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц 2–4 мм.

Кинетические измерения проводили от 1 до 5 ч при 100 °С, подвергая гидролизу по 5 г подготовленного материала в 100 мл 2 н растворов хлороводородной и ортофосфорной кислот. Отбор гидролизатов проводили через каждый час. Расчеты кривых осуществляли с применением методов математической статистики [3].

Определение конверсии древесной массы. Негидролизованную древесную массу промывали дистиллированной водой, высушивали при 103 °С до постоянного веса, рассчитывали степень конверсии. *Общее содержание свободных углеводов* определяли спектрофотометрическим методом с антроновым реактивом в пересчете на глюкозу по ОФС.1.2.3.0019.15 Определение сахаров спектрофотометрическим методом [2].

Определение глюкозы осуществляли методом хроматографии в тонком слое с однократным одномерным элюированием и последующим денситометрическим детектированием при помощи программного обеспечения «ДенСкан-04». *Метрологическую обработку* результатов экспериментов осуществляли с помощью программы Microsoft Excel 2010.

Результаты и их обсуждение

Каталитические свойства 2н HCl и 2н H₃PO₄ изучены при атмосферном давлении, температуре 100°С и постоянном перемешивании 15 об/с в интервале времени от 1 до 5 часов.

Динамика содержания глюкозы в зависимости от влияния катализатора и продолжительности гидролиза показала, что через 1 час процесса содержание мономера в присутствии 2н HCl было в 5,5 раза больше, чем в присутствии 2н H₃PO₄. В последующие 2 часа накопление глюкозы продолжало увеличиваться в присутствии обоих катализаторов. После 3-х часов от начала гидролиза содержание глюкозы существенно не менялось, но в присутствии 2н HCl она извлекалась легче, т. к. ее концентрация была в 1,5 раза больше, чем в присутствии 2н H₃PO₄ (рис. 1).

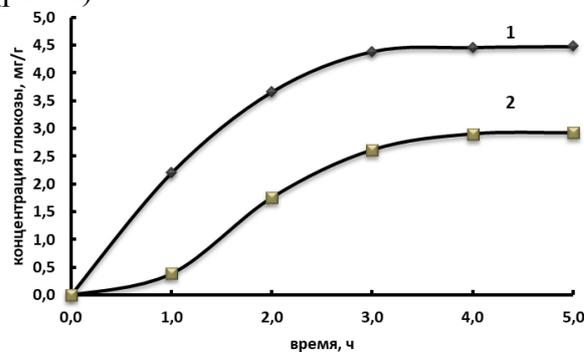


Рисунок 1 – Влияние продолжительности гидролиза и катализатора на концентрацию целевого мономера (глюкозы)

Примечание: 1. HCl 2. H₃PO₄

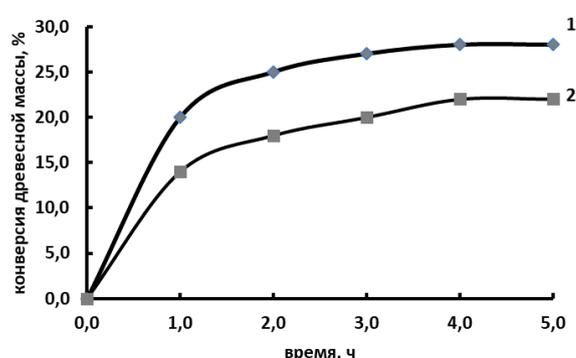


Рисунок 2 – Влияние продолжительности гидролиза и катализатора на конверсию древесной массы хвойных пород

Примечание: 1. HCl; 2. H₃PO₄

Показано, что кинетические зависимости концентрации глюкозы имеют вид, характерный для реакций псевдопервого порядка. Реакции с участием двух реагентов, протекающие по законам не второго, а первого порядка относят к псевдомолекулярным [1]. К этому типу причисляют и реакция гидролиза полисахаридов.

Обнаружено, что степень конверсии древесной массы в присутствии 2н HCl была выше, чем с 2н H₃PO₄ и менялась в течение процесса от 20 до 28 % мас. и от 14 до 22 % мас., соответственно (рис. 2). Константы скоростей образования глюкозы в присутствии 2н HCl и 2н H₃PO₄ определяли как значение тангенса угла наклона прямой, построенной в координатах $\ln[m_{\infty}/(m_{\infty}-m_t)] - f(t)$, где m_{∞} - масса глюкозы после проведения гидролиза в течение 5 часов, m_t - масса глюкозы в момент времени t [3] (рис. 3).

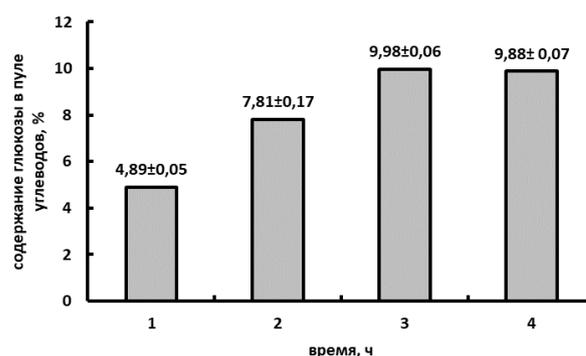
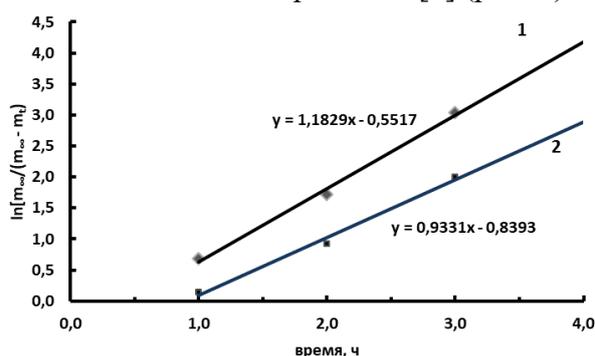


Рисунок 3 – Влияние продолжительности гидролиза на логарифм относительной массы

Примечание: 1. HCl 2. H₃PO₄

Рисунок 4 – Влияние продолжительности гидролиза в присутствии 2н HCl на концентрацию мономера в общем содержании свободных углеводов

В результате установлено, что эффективная константа скорости образования глюкозы в присутствии 2н HCl в 1,2 выше, чем в присутствии 2н H₃PO₄ (таблица 1).

Таблица 1

Эффективные константы скорости реакций гидролиза глюкозы ($k_{эф}$) в зависимости от кислотного катализатора

Наименование катализатора	$k_{эф}, c^{-1}$
2 н HCl	$0,021 \pm 0,001$
2 н H ₃ PO ₄	$0,017 \pm 0,001$

Динамика накопления извлечений глюкозы показала, что каталитическая активность ортофосфорной кислоты меньше соляной. Это можно объяснить тем, что полная диссоциация трехосновной кислоты происходит только на первой ступени, поэтому степень диссоциации ее молекул с образованием ионов водорода меньше, чем одноосновной хлороводородной кислоты.

Дальнейшее изучение процесса гидролиза древесной массы происходило только с применением катализатора 2н HCl. Установлено, что концентрация глюкозы в пуле общего содержания свободных углеводов, измеренных спектрофотометрически, увеличивалась в течение 3 часов до 9,98 %. Дальнейшее ведение гидролиза не влияло на извлечение глюкозы, которое составило 9,88 %. (рис. 4).

Таким образом, при ведении гидролиза древесной массы хвойных пород в условиях атмосферного давления, температуре 100°C и постоянном перемешивании, значения концентрации целевого мономера (глюкозы), его эффективной константы образования и степени конверсии древесной массы в присутствии 2н HCl были выше, чем в присутствии 2н H₃PO₄.

Выводы

Изучено влияние продолжительности гидролиза древесной массы хвойных пород в присутствии 2н HCl и 2н H₃PO₄. Оптимальным является процесс гидролиза при 100 °С в течение 3 часов в присутствии 2н HCl. Анализ влияния продолжительности кислотного гидролиза биополимеров на примере древесной массы хвойных пород подтвердил возможность осуществления управляемого процесса с целью получения целевого мономера с перспективой разработки технологии получения кристаллической глюкозы.

Библиографический список

1. Корольков И.И. Перколяционный гидролиз растительного сырья. - 3-е изд., перераб. М.: Лесн. пром-сть, 1990. 272 с.
2. Общая фармакопейная статья ОФС.1.2.3.0019.15 Определение сахаров спектрофотометрическим методом [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-3-0019-15-opredelenie-saharov-spektofotometrisheskim-metodom/> (дата обращения: 10.05.2024).
3. Олиференко Г.Л., Иванкин А.Н., Жилин Ю.Н., Прошина О.П., Зарубина А.Н., Вострикова Н.Л., Куликовский А.В., Бабурина М.И. Кинетика кислотной трансформации природных полисахаридов древесной биомассы в моносахара для получения кормовых добавок и микробиологических сред // Лесной вестник / Forestry Bulletin. 2017. Т. 21. № 6. С. 61-67.
4. Сушкова В.И., Воробьёва Г.И., Безотходная конверсия растительного сырья в биологически активные вещества. М: Дели принт, 2008. 216 с.
5. Холькин Ю.И. Технология гидролизных производств. М.: Лесная промышленность, 1989. 495 с.
6. Цховребов Э.С. Ресурсосбережение: основные этапы становления, теории и методы, тенденции и перспективы развития в промышленности и строительной индустрии России // Вестник МГСУ. 2020. Т. 15. № 1. С. 112-158.
7. Шарков В.И., Сапотницкий С.А., Дмитриева О.А., Туманов И.Ф. Технология гидролизных производств. М: Лесная промышленность, 1973. 408 с.
8. Revin V., Atykyan N., Zakharkin D. Enzymatic hydrolysis and fermentation of ultradispersed wood particles after ultrasonic pretreatment // Electronic Journal of Biotechnology, 2016. Vol. 20. P. 14-19.

УДК 631.46: 631.461.5

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПОЧВЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ*И.А. Дегтярева, Ш.З. Валидов*

*Лаборатория молекулярно-генетических и микробиологических методов Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук»,
Казань, Россия*

Выделение автохтонных штаммов для создания на их основе микробных препаратов при выращивании сельскохозяйственных культур является экологически целесообразным приемом для получения высококачественной конкурентоспособной растениеводческой продукции, сохранения плодородия почвы и окружающей среды. Для эффективного применения биопрепаратов необходимы глубокие исследования взаимоотношений в системе почва – микроорганизмы – растение с учетом экологических законов ее функционирования. Лаборатория молекулярно-генетических и микробиологических методов Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», имея современное высокоточное оборудование, ориентирована на решение проблем эффективности биопрепаратов при их использовании в открытом грунте, а также внедрении молекулярно-генетических методов для анализа консорциумов микроорганизмов, характеристике наиболее перспективных штаммов и разработке систем мониторинга фитопатогенов в решении проблем защиты растений. Детально изучается микрофлора культурных растений (более шести тысяч бактериальных изолятов) и создаются консорциумы, состоящие из полезных и совместимых между собой автохтонных микроорганизмов. В модельных системах выделяются новые штаммы – агенты биологической защиты растений. Штаммы бактерий, прошедшие все этапы отбора (определение различных типов ферментативных активностей, исключение повторов и патогенов, проверка антагонистических и колонизирующих свойств, способности к синтезу индол-3-уксусной кислоты (ИУК)), представлены четырьмя условными группами: (1) бактерии, способные колонизировать корневую систему растений; (2) бактерии – антагонисты фитопатогенных грибов; (3) бактерии – продуценты ИУК; (4) бактерии, стимулирующие рост растений за счет своих ферментативных активностей. Конкретный консорциум собирается из четырех штаммов (по одному из каждой группы) для проверки совместимости. Поэтапная экспресс-диагностика перспективных штаммов позволяет сократить сроки работ по выделению агентов биозащиты растений без потери качества выделяемых штаммов. ДНК-фингерпринтинг изолятов с помощью ВОХ-ПЦР значительно сокращает количество изолятов без потери штаммового разнообразия, удаляя клоны одного и того же штамма в пробе. При идентификации можно избавиться от потенциально патогенных штаммов, применение которых нежелательно. В процессе исследований выявлены биосинтетические гены и кластеры генов, задействованные в продукции широкого ряда вторичных метаболитов и ферментов, что подтверждает обоснованность выбора данных штаммов как потенциальных биоконтрольных агентов и их дальнейшее исследование для создания биопрепаратов. Созданы образцы биопрепаратов комплексного действия, эффективность которых экспериментально доказана в модельных системах.

Ключевые слова: почва, микроорганизмы, ферментативная активность, генотипирование, фунгистатический эффект, биологическая защита растений

Введение. Одним из основных и определяющих факторов почвенного плодородия является изучение почвенной и ризосферной микрофлоры. Именно состав микробных сообществ

определяет функционирование почвенной экосистемы в соответствии с биогеохимическими процессами и позволяет оценить ее состояние [1, 2]. Почва является уникальной биологической мембраной, главным природным банком при поиске микроорганизмов с любыми необходимыми свойствами [3-5].

Лаборатория молекулярно-генетических и микробиологических методов ФИЦ КазНЦ РАН, имея современное высокоточное оборудование, ориентирована на решение проблем эффективности биопрепаратов при их использовании в открытом грунте, а также внедрении молекулярно-генетических методов для анализа консорциумов микроорганизмов, характеристике наиболее перспективных штаммов и разработке систем мониторинга фитопатогенов в решении проблем защиты растений. Детально изучается микрофлора культурных растений и создаются консорциумы, состоящие из полезных и совместимых между собой автохтонных микроорганизмов. В модельных системах выделяются новые штаммы – агенты биологической защиты растений.

В перечне значимых этапов после выделения автохтонных штаммов из почв различных типов и ризосферы важнейших сельскохозяйственных культур является их отбор по полифункциональным свойствам с последующей идентификацией. Среди выявляемых характеристик важной является проверка ферментативной активности микроорганизмов, связанная с их функциональными характеристиками. Этот показатель относится к способности бактерий производить различные ферменты (протеолитические, амилолитические, хитинолитические и др.), играющие ключевую роль в различных биохимических процессах. Изучение ферментативной активности, для проверки которой используют различные методы (химический, спектрофотометрия, изучение продуктов ферментативной реакции, электрофорез), позволяет понять потенциал бактерий для различных биотехнологических приложений (средства биозащиты, очистка сточных вод, производство пищевых продуктов, медицинское применение и другие области) [6-8].

Важным этапом является генотипирование, позволяющее определить молекулярно-генетические характеристики каждого штамма. Современные методы генотипирования бактерий разделяют на три основные категории: методы, основанные на фрагментном анализе (DNA banding pattern), секвенирование и гибридизация ДНК. Наиболее быстрым и технологичным способом идентификации микроорганизмов является сравнительный анализ генов 16S рРНК у эубактерий и анализ межгенных спейсеров ITS1, ITS2 у эукариотических микроорганизмов. Необходимым является и полногеномное секвенирование новых штаммов.

В дальнейшем специальные методики позволяют выявить совместимые штаммы и использовать их в виде консорциума с комплексным положительным действием на растение. Перечисленные методы имеют важное значение для идентификации и классификации бактерий, а также их депонирования с целью их дальнейшего использования на практике. Алгоритм для быстрого и качественного выявления эффективных штаммов для целей биозащиты позволяет не только сократить время для выделения сельскохозяйственно значимых автохтонных штаммов и оценить их биотехнологический потенциал, но и в дальнейшем использовать наиболее перспективные из них в качестве основы создаваемых биопрепаратов.

Цель исследований – создание алгоритма конструирования консорциумов на основе эффективных автохтонных штаммов для создания биопрепаратов в растениеводстве.

Описание методов и методик проводимого исследования. Отбор и учет количества аэробных ассоциаций микроорганизмов проводили по методике О.И. Колешко [9]. Спектр различных активностей бактериальных изолятов включал определение: способности к гидролизу крахмала за счет продукции внеклеточных амилаз – на модифицированной среде ААМ (amylase activity medium) [10]; внеклеточных липаз – на среде с добавлением среды Tween 80 (полиоксиэтилен сорбитан моноолеат) как аналога высокомолекулярных жирных кислот [11]; способности к азотфиксации – на среде Йенсена [12]; протеаз и хитиназ – на модифицированной среде ВМ (basal medium) с добавлением 1% сухого обезжиренного молока [13] и 1% хитина

соответственно [14]; целлюлаз и фитаз – на среде BM с добавлением 1% карбоксиметилцеллюлазы натриевой соли [15] и среде PSM (phytase screening medium) [16] соответственно. Антагонистическую активность выделенных бактерий против патогенных микроорганизмов определяли, внося в чашку Петри со средой PDA (potato dextrose agar) в равноудаленном расстоянии друг от друга 3 мкл суспензии изолятов бактерий и 2 мкл суспензии фитопатогенного гриба. Количественное определение индол-3-уксусной кислоты (ИУК) проводили колориметрическим методом по S.A. Gordon и R.P. Weber [17]. Стерильные гнотобиотические системы использовали для изучения макроорганизмов, свободных от воздействия других организмов [18]. Статистический анализ проводили с использованием пакета программ OriginLab pro SR1 b9.5.1.195. Достоверную разницу между группами проверяли с использованием одностороннего ANOVA и апостериорного теста Тьюки на достоверно значимую разницу при $p < 0,05$.

Полученные результаты и их обсуждение. Из различных почв Республики Татарстан выделено более шести тысяч бактериальных изолятов – непосредственно из почв различных типов и ризосферы важнейших сельскохозяйственных культур (озимая и яровая пшеница, рапс, подсолнечник, кукуруза, ячмень). В качестве первичных селективных параметров проанализирована способность изолятов к мобилизации основных неорганических элементов (азота и фосфора), способность к разложению сложных органических соединений (целлюлозы, крахмала, липидов) и предрасположенность к антагонистической активности, а именно наиболее предпочтительные в случае биоконтрольных агентов ферментативных активностей (амилазная, липазная, протеиназная, фитазная и др.).

Так, амилазная активность детектирована при гидролизе крахмала в среде по образованию зон просветления при окраске среды раствором Люголя. Внеклеточная липазная активность у бактериальных изолятов выявлена по наличию вокруг колоний непрозрачной зоны кальциевых солей жирных кислот, освобожденных из Tween 80. Штаммы, растущие на среде Йенсена, отобраны как способные фиксировать атмосферный азот. Вокруг колоний бактериальных изолятов, обладающих протеиназной активностью, отмечены зоны просветления, образуемые в результате гидролиза казеина в среде. Штаммы, проявляющие протеолитическую и хитиназную активности, образуют зоны просветления вокруг колоний. Целлюлолитическая активность идентифицирована методом детекции зон просветления (желтого цвета) вокруг колонии после окрашивания конго красным, образующимся в связи с разрушением целлюлозы и образованием ее комплексов с красителем. О наличии антагонистической активности свидетельствуют зоны подавления.

Впоследствии штаммы бактерий, прошедшие все этапы отбора (определение различных типов ферментативных активностей, исключение повторов и патогенов, проверка антагонистических и колонизирующих свойств, способности к синтезу ИУК), разделены на четыре условные группы: (1) бактерии, способные колонизировать корневую систему растений; (2) бактерии – антагонисты фитопатогенных грибов; (3) бактерии – продуценты ИУК; (4) бактерии, стимулирующие рост растений за счет своих ферментативных активностей. Конкретный консорциум собирается из четырех штаммов (по одному из каждой группы) для проверки совместимости. При отсутствии возможности совместимости штаммов внутри консорциума в данной системе образуются зоны подавления различной величины. Метод совмещения штаммов позволяет получить консорциумы, эффективность которых экспериментально доказана и в модельных системах [19]. Эксперименты на совместимость подходят только как первичный скрининг бактериального консорциума. Питательные среды, как правило, не моделируют условия голодания, синтеза некоторых метаболитов, антитоксинов и иных веществ, которые могут образовываться при взаимодействии с растением и играют значимую роль в формировании и функционировании консорциума.

Дальнейшие исследования бактериального консорциума, полученного методом подбора совместимых штаммов, включают удержание изолятов в прикорневой зоне. Поэтапная экспресс-

диагностика перспективных штаммов позволяет сократить сроки работ по выделению агентов биозащиты растений без потери качества выделяемых штаммов. ДНК-фингерпринтинг изолятов с помощью ВОХ-ПЦР значительно сокращает количество изолятов без потери штаммового разнообразия, удаляя клоны одного и того же штамма в пробе. При идентификации можно избавиться от потенциально патогенных штаммов, применение которых нежелательно. Проводится полногеномное секвенирование отобранных потенциальных биоконтрольных штаммов и предоставляется полная характеристика данных штаммов на уровне генома. В процессе исследований выявлены биосинтетические гены и кластеры генов, задействованные в продукции широкого ряда вторичных метаболитов и ферментов, что подтверждает обоснованность выбора данных штаммов как потенциальных биоконтрольных агентов и их дальнейшее исследование для создания биопрепаратов.

Заключение. Таким образом, выделение автохтонных штаммов для создания на их основе микробных препаратов при выращивании сельскохозяйственных культур является экологически целесообразным приемом для получения высококачественной конкурентоспособной растениеводческой продукции, сохранения плодородия почвы и окружающей среды. Для эффективного применения биопрепаратов необходимы глубокие исследования взаимоотношений в системе почва – микроорганизмы – растение с учетом экологических законов ее функционирования. Изучение почвенных микроорганизмов является важным направлением в науке о почве, которое может принести значительные экономические и экологические выгоды.

Считаем, что междисциплинарные фундаментальные и прикладные исследования в микробиологии, генетике, молекулярной биологии, биоинженерии по проблеме автохтонных штаммов, создаваемых на их основе эффективных консорциумов и биопрепаратов, способствуют решению приоритетного направления развития науки, технологий и техники в Российской Федерации, а именно проблеме рационального природопользования.

Благодарности. Работа выполнена в рамках Государственного задания № FMEG-2021-0003, регистрационный номер 121021600147-1.

Библиографический список

1. Cookson W.R., Murphy D.V., Roper M.M. Characterizing the relationships between soil organic matter components and microbial function and composition along a tillage disturbance gradient // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2008. – № 40. – P. 763-777. DOI:10.1016/j.soilbio.2007.10.011.
2. Griffiths B.S., Philippot L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2012. – № 37. – P. 112-129. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00343.x.
3. Умаров М.М., Кураков А.В., Степанов Л.А. Микробиологическая трансформация азота в почве. – М.: ГЕОС, 2007. – 138 с.
4. Дегтярева И.А., Яппаров Д.А., Хидиятуллина А.Я., Зарипова С.К. Оценка эффективности жидких форм биопрепаратов // *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана*. – 2013. – Т. 215. – С. 96-100.
5. Дегтярева И.А., Бабынин Э.В., Сироткин А.С., Яппаров И.А. Биоремедиация почв: методы и подходы. Учебно-методическое пособие. – Казань: Изд-во КНИТУ, 2018. – 100 с.
6. Bergmeyer H.U. *Methods of enzymatic analysis*. – Elsevier, 2012. – 1088 p.
7. Hooff G.P., Van Kapmen J., Mesteers R.J.V., Van Belkum A. et al. Characterization of β -lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry // *Journal of proteome research*. – 2012. – Vol. 11. – № 1. – P. 79-84. DOI:10.1021/pr200858r.
8. Šebela M. The use of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in enzyme activity assays and its position in the context of other available methods // *Mass Spectrometry Reviews*. – 2023. – Vol. 42. – № 3. – P. 1008-1031. DOI:10.1002/mas.21733.

9. Колешко О.И. Экология микроорганизмов почвы. Лабораторный практикум // Минск: Высшая школа, 1981. – 175 с.
10. Nimisha P., Moksha S., Gangawane A.K. Amylase activity of starch degrading bacteria isolated from soil // *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. – 2019. – Vol. 8. – № 4. – P. 659-671. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.804.071>.
11. Kumar D., Kumar L., Nagar S., Raina C., Parshad R., Gupta V.K. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions // *Archives of Applied Science Research*. – 2012. – Vol. 4. – № 4. – P. 1763-1770.
12. Zebua A.C., Guchi H., Sembiring M. Isolation of non-symbiotic Nitrogen-fixing bacteria on andisol land affected by Sinabung eruption // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – IOP Publishing, 2020. – Vol. 454. – № 1. – P. 012167. DOI: [10.1088/1755-1315/454/1/012167](https://doi.org/10.1088/1755-1315/454/1/012167).
13. Sharma A.K., Sharma V., Saxena J., Yadav B., Alam A., Prakash A. Isolation and screening of extracellular protease enzyme from bacterial and fungal isolates of soil // *International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences*. – 2015. – Vol. 3. – № 9. – P. 334-340. DOI: [10.12983/ijres-2015-p0334-0340](https://doi.org/10.12983/ijres-2015-p0334-0340).
14. Krithika S., Chellaram C. Isolation, screening, and characterization of chitinase producing bacteria from marine wastes // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2016. – Vol. 8. – № 5. – P. 34-36.
15. Islam F., Roy N. Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses // *BMC research notes*. – 2018. – Vol. 11. – № 1. – P. 1-6. DOI: [10.1186/s13104-018-3558-4](https://doi.org/10.1186/s13104-018-3558-4).
16. Singh N.K., Joshi D.K., Gupta R.K. Isolation of phytase producing bacteria and optimization of phytase production parameters // *Jundishapur Journal of Microbiology*. – 2013. – Vol. 6. – № 5. <https://doi.org/10.5812/jjm.6419>.
17. Gordon S.A., Weber R.P. Colorimetric estimation of indole-3-acetic acid // *Plant physiology*. – 1951. – Vol. 26. – № 1. – P. 192. DOI: [10.1104/PP.26.1.192](https://doi.org/10.1104/PP.26.1.192).
18. Luckey T. *Germfree life and gnotobiology*. – Elsevier, 2012. – 536 p.
19. Diabankana R.G.C., Shulga E.U., Validov S.Z., Afordoanyi, D.M. Genetic characteristics and enzymatic activities of *Bacillus velezensis* KS04AU as a stable biocontrol agent against phytopathogens // *International Journal of Plant Biology*. – 2022. – Vol. 13. – № 3. – P. 201-222. <https://doi.org/10.3390/ijpb13030018>.

УДК 632.953.1

ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ *ECHINOPS SPHAEROCEPHALUS* В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БУРОЙ ГНИЛИ *RALSTONIA SOLANACEARUM* В УСЛОВИЯХ *IN VIVO*

Д.А. Доморацкая^{1,2}, *Р.Н. Киракосян*², *О.Ю. Словарева*¹

¹ ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», р.п. Быково, Россия, ² ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, г. Москва, Россия

Работа посвящена исследованию действия мордовника шароголового на возбудителя бурой бактериальной гнили картофеля в условиях продолжающегося вегетационного опыта. Опыт включал в себя вариант с зараженными растениями картофеля с подсевом мордовника, контроль с зараженными растениями без посева, контроль со здоровыми растениями. Ингибирующее действие было подтверждено путем сравнения симптоматики, длины побегов и количества погибших растений картофеля в варианте с подсевом мордовника и контролей.

Ключевые слова: биологически активные вещества, бурая гниль, мордовник шароголовый, картофель, продуценты.

INHIBITORY EFFECT OF *ECHINOPS SPHAEROCEPHALUS* ON THE BROWN ROT PATHOGEN *RALSTONIA SOLANACEARUM* *IN VIVO*

D.A. Domoratskaya^{1,2}, *R.N. Kirakosyan*², *O.Yu. Slovareva*¹

¹ All-Russian Plant Quarantine Center, Bykovo, Russia, ² Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

This study is devoted to the research of the effect of great globe-thistle on brown rot pathogen in the conditions of ongoing pot experiment. The experiment included a variant with infected potato plants cocultivated with great globe-thistle, control with infected potato without great globe-thistle, and control with healthy potato plants. The inhibitory effect was confirmed by comparing the symptoms, the length of shoots and the number of dead potato plants in the variant cocultivated with great globe-thistle to the controls.

Keywords: bioactive substances, brown rot, great globe-thistle, potato, producers.

Картофель является одной из важнейших сельскохозяйственных культур России, не только из-за его популярности в нашей стране в качестве пищи и сырья для различных областей промышленности, но также и из-за того, что ежегодно экспорт этой продукции значительно увеличивается – за первое полугодие 2024 года продажа отечественного картофеля выросла в 1,8 раза по сравнению с прошлым годом [1]. Этот овощ выращивают по всему миру из-за его высоких питательных свойств и относительной неприхотливости к условиям возделывания, выведено множество сортов, районированных под различные климатические условия. Картофель подвержен ряду болезней, среди которых особо опасной является бурая гниль картофеля. Эта болезнь вызывается бактерией *Ralstonia solanacearum*, проникающей в растение через поранение с почвой и водой, и вызывающая системное увядание всего организма хозяина, размножаясь в его сосудах.

Симптоматика проявляется в виде поздней и малой всхожести клубней, а всходы увядают, гниют и засыхают. Клубнеобразование также резко падает, у семенного и новых клубней

поражается сосудистый пучок, который заполняется темной массой бактерий, отчего болезнь получила свое название – бурая гниль. Возбудитель бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* входит в Единый перечень карантинных организмов Евразийского экономического союза и фитосанитарные списки других стран, но при этом распространен в ряде стран (Египет, Турция, Китай), осуществляющих экспорт картофеля в РФ. Риск интродукции фитопатогена на территории РФ является высоким, в связи с чем, кроме фитосанитарного контроля, актуальна разработка других профилактических мер борьбы.

Частью комплекса таких мер, а также одним из способов повышения качества и количества семенного и продовольственного картофеля на данный момент является применение биологизированных мер защиты растений, которые разрабатываются с использованием биотехнологических методов поиска новых биологически активных веществ и их продуцентов. Одним из таких перспективных продуцентов является мордовник шароголовый – растение семейства Астровые, которое в ходе своего метаболизма производит соединения ряда тиофенов, к которым в последнее время проявляется высокий интерес в области медицины из-за их антимикробных, противовоспалительных и других свойств [2].

Цель работы заключалась в определении ингибирующего влияния мордовника шароголового на бурую бактериальную гниль в условиях *in vivo*.

В исследовании использовали сорт столового картофеля Ред Скарлет, районированный для южных регионов России, страной-оригинатором которого являются Нидерланды. Этот сорт широко выращивается в стране как частными фермерами, так и компаниями по производству чипсов и картофеля фри. Партию клубней перед закладкой опыта протестировали на отсутствие наиболее распространенных бактериальных, вирусных и грибных болезней.

Искусственное заражение производили референтным штаммом *Ralstonia solanacearum* из внутрилабораторной коллекции бактериологии и анализа ГМО ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», видовая принадлежность которого была установлена методами ПЦР, секвенирования участка 16S рДНК и анализом белкового состава методом MALDI-TOF. Схема опыта – инфицированный картофель (положительный контроль), картофель без инфекционного фона (отрицательный контроль), инфицированный картофель с сокультивируемыми в непосредственной близости к клубню растениями мордовника шароголового (вариант). Опыт закладывали в условиях теплицы при контролируемых значениях температуры (23-25°C) и относительной влажности воздуха (60-65%) без искусственного освещения, длина светового дня 15-16 часов.

Результаты. Через 60 дней после закладки опыта в положительном контроле 30% растений картофеля погибло, отрицательный контроль остался без симптомов поражения бурой гнилью на побегах, вариант проявлял симптомы болезни в виде увядания и бурых пятен на листьях. Длина побегов варианта была в среднем в 1,5 раза меньше, чем у отрицательного контроля.

Проведенный ПЦР-тест образцов отобранных участков вегетативных частей растений (в том числе погибших) с помощью набора для проведения ПЦР в реальном времени «*Ralstonia solanacearum* (раса 3, bv.2)-РВ» (ЗАО «Синтол», Россия) показал, что уровень зараженности варианта меньше уровня зараженности положительного контроля. Исходя из значений пороговых циклов ПЦР-РВ концентрация патогена в положительном контроле превышала указанный показатель в варианте. На данный момент опыт продолжается, планируется снятие урожая с растений и оценка количества и качества клубней по нескольким показателям (уровень зараженности, размер, содержание крахмала). По результатам проведенной работы можно сказать, что мордовник шароголовый ингибирует развитие бурой бактериальной гнили картофеля. Растение не проявляет бактерицидные свойства, но проявляет бактериостатическую активность, сдерживая развитие болезни даже при высокой концентрации инокулюма.

Благодарности. Работа проведена при финансировании ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» по теме НИР 5.5 «Изучение карантинных и особо опасных бактериальных болезней растений и их возбудителей в целях обеспечения биобезопасности территории РФ и экспортной продукции».

Библиографический список

1. Экспорт российского картофеля в I квартале 2024 года вырос почти в два раза URL: <https://fsvps.gov.ru/news/jeksport-rossijskogo-kartofelja-v-i-kvartale-2024-goda-vyros-pochti-v-dva-raza> (дата обращения: 08.07.2024).
2. Mabkhot, Y.N., Kaal, N.A., Alterary, S. et al. Antimicrobial activity of thiophene derivatives derived from ethyl (E)-5-(3-(dimethylamino)acryloyl)-4-methyl-2-(phenylamino)thiophene-3-carboxylate // Chemistry Central Journal. 2017. Vol. 11. № 75. DOI: 0.1186/s13065-017-0307-z.

УДК 661.187.03/.099

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕРХНО-АКТИВНЫХ СВОЙСТВ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ ДИЭТАНОЛАМИНА С ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ РАСТИТЕЛЬНОГО МАСЛА

А.А. Дорофеева, А.В. Протопопов

Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, г. Барнаул, Россия

В данной статье рассматривается процесс получения эстерквата, при разном соотношении диэтанолamina к подсолнечному маслу, а также при разной протяженности синтеза. Полученный сложный эфир был исследован на значение свободного амина и связанной кислоты. Проведенные исследования на поверхностно-активные характеристики растворов показали их соответствие эстеркватам.

Ключевые слова: эстеркват, масло, диэтанолamin, связанная кислота, свободный амин.

STUDY OF THE SURFACTANT PROPERTIES OF DIETHANOLAMINE ESTERS WITH VEGETABLE OIL FATTY ACIDS

A.A. Dorofeeva, A.V. Protopopov

Polzunov Altai State Technical University, Barnaul, Russia

This article discusses the process of obtaining esterquat, with different ratios of diethanolamine to sunflower oil, as well as with different lengths of synthesis. The resulting ester was tested for free amine and bound acid values. Conducted studies on the surface-active characteristics of the solutions showed their compliance with esterquats.

Keywords: esterquat, oil, diethanolamine, bound acid, free amine.

Четвертичные аммониевые соли (ЧАС или «кваты») широко известны как органические соединения, которые включают положительно заряженный атом азота, замещенный четырьмя алкильными заместителями в качестве катиона, и любой совместимый противоион в качестве аниона. Исторически термин «эстеркват» был впервые использован в 1931 году в заявке на патент для определения конкретной соли четвертичной аммонии, которая обладала эфирной связью внутри катиона [1,2].

Эфирная связь в структурах эстеркватов облегчает их гидролиз и биоразложение, что позволяет химикам воспринимать их как более экологически чистые соединения по сравнению с ЧАС, несущими насыщенные или ненасыщенные алкильные цепи на атомах азота и содержащими только связи С–С и С–N внутри катиона [3,4,5]. Например, как химический, так и ферментативный гидролиз эстеркватов бетаина дает глицин-бетаин и жирный спирт — оба продукта, которые можно считать экологически безопасными и, возможно, даже съедобными [2]. Следовательно, эстеркваты способны демонстрировать меньшую токсичность и устойчивость в биосфере по сравнению с классическими ЧАС. Однако это свойство широко варьируется в зависимости от типа эстерквата, а также количества и положения присоединенных функциональных групп; поэтому следует остерегаться создания строгих, односторонних обобщений, лишенных объективности [6].

В настоящее время эстеркваты рассматриваются как уникальный класс соединений с очень полезными свойствами, которые подчеркивают их огромный потенциал применения. Они гораздо популярнее, чем несколько десятилетий назад, из-за перехода общества к экономике

замкнутого цикла и усилий по спасению планеты. Было отмечено, что из-за потенциально превосходных экотоксикологических профилей (особенно восприимчивости к биоразложению и более низкой токсичности для водных организмов) эстеркваты начинают заменять некоторые ЧАС как в Европе, так и в США [7]. В частности, первичная потребность в энергии (PED) триэтанолamina эстерквата (TEAQ) составляет около 40 ГДж/тонну, тогда как для большинства «кватов» этот параметр обычно на ~30–90% выше, от 52 до 77 ГДж/тонну. [8]. Несмотря на то, что эстеркваты хорошо известны, их свойства можно легко адаптировать для удовлетворения конкретных требований к производительности, что открывает множество перспективных областей для их будущего развития, которые до сих пор не изучены.

В 2015 году объем мирового рынка эстеркватов оценивался в 1,35 миллиарда долларов США и, согласно прогнозам, будет расти со среднегодовым темпом роста (CAGR) 11% в период с 2016 по 2024 год [28]. Эта тенденция также является следствием нынешних более жестких требований со стороны потребителей, которые гораздо чаще выбирают менее вредные для человека и окружающей среды продукты. В настоящее время наиболее популярные представители эстеркватов (по объему производства) основаны на триэтанолamine (TEAQ), диэтанолamine (DEEDMAC) или N,N,-диметил-3-аминопропан-1,2-диоле (HEQ) и используются в основном в качестве поверхностно-активных веществ и смягчителей тканей [29,30,31,32,33]. Недавно компании Dow Global Technologies LLC, Dow Silicones Corp и Rohm & Haas запатентовали инновационный продукт для ухода за тканями, содержащий эстеркват TEAQ и декстрановый полимер, функционализированный четвертичным аммонием, облегчающий его осаждение на ткани [34].

Первые применения эстеркватов также включали в себя вспомогательные средства для текстиля и выравниватели красителей [3], поскольку они обеспечивают более эффективную операцию крашения, стабилизируя красильную ванну для достижения однородного оттенка ткани. Еще одно интересное применение относится к так называемым флокулянтам — соединениям, которые способствуют агрегации взвешенных частиц в жидкостях. Растущая потребность во флокулянтах в горнодобывающей промышленности и водоочистке в настоящее время стимулирует рост доходов рынка флокулянтов, который также опирается на определенную группу эстеркватов [35].

Анализ патентных баз данных выявил еще одно значительное применение соединений типа эстерквата, относящееся к огромному и быстро развивающемуся рынку средств личной гигиены. Среди различных товаров домашнего обихода эстеркваты разнообразного состава используются в качестве компонентов кремов и лосьонов, шампуней, кондиционеров и средств по уходу за кожей [1,36,37]. Ключевой аспект новизны этих изобретений связан с повышенной безопасностью для клиентов и/или более благоприятными экологическими характеристиками по сравнению с классическими QAS, которые предназначены для замены. Повышенный интерес к эстеркватам со стороны крупнейших химических компаний, таких как BASF, Henkel, Procter Gamble или Evonik, служит индикатором их большого удобства использования и достаточной безопасности, что потенциально может привести к их широкой коммерциализации и масштабированию производства [37-41].

Интересно, что рН-лабильные связи в эстеркватах позволяют рассматривать их как потенциально полезные агенты для специальных применений в биотехнологической промышленности, такие как биоциды (включая как антисептики, так и дезинфицирующие средства), средства доставки лекарств и агенты генной терапии [2].

В ходе проведенной работы нами была рассмотрена возможность использования растительного масла для получения сложных эфиров диэтанолamina с последующей кватеринизацией полученных сложных эфиров. Взаимодействие этанолamида с жирными кислотами растительного масла проводили путем переэтерификации триглицеридов при высоких температурах в присутствии катализатора. В ходе проделанной работы, рассмотрено влияние температуры на содержание связанной кислоты при соотношении растительного масла

к диэтаноламину 3:1. Синтезы проводили при температурах 150°, 120° и 140°C. Во всех случаях наблюдается отсутствие свободного амина, что показывает прохождение реакции амидирования, при этом в случае проведения синтеза при 150° C содержание связанной кислоты составляет 73%, что говорит о протекании реакции только по аминогруппе, в случаях проведения процесса при 120° и 140°C содержание связанной кислоты составило 194 и 207 % соответственно. Проведение взаимодействия при 140°C и соотношении растительного масла к диэтаноламину 2:1 привело к снижению содержания связанной кислоты до 201 %.

Таблица 1

Количество связанной кислоты в полученных продуктах

Название продукта	Кислотное число	Свободный амин	Связанная кислота
ДЭАМ 6	8,9	0	73,29
ДЭАМ 7	4,95	0	194,48
ДЭАМ 8	4,93	0	207,35
ДЭАМ 9	3,97	0	201,06

Полученные продукты были проанализированы методом ИК-спектроскопии.

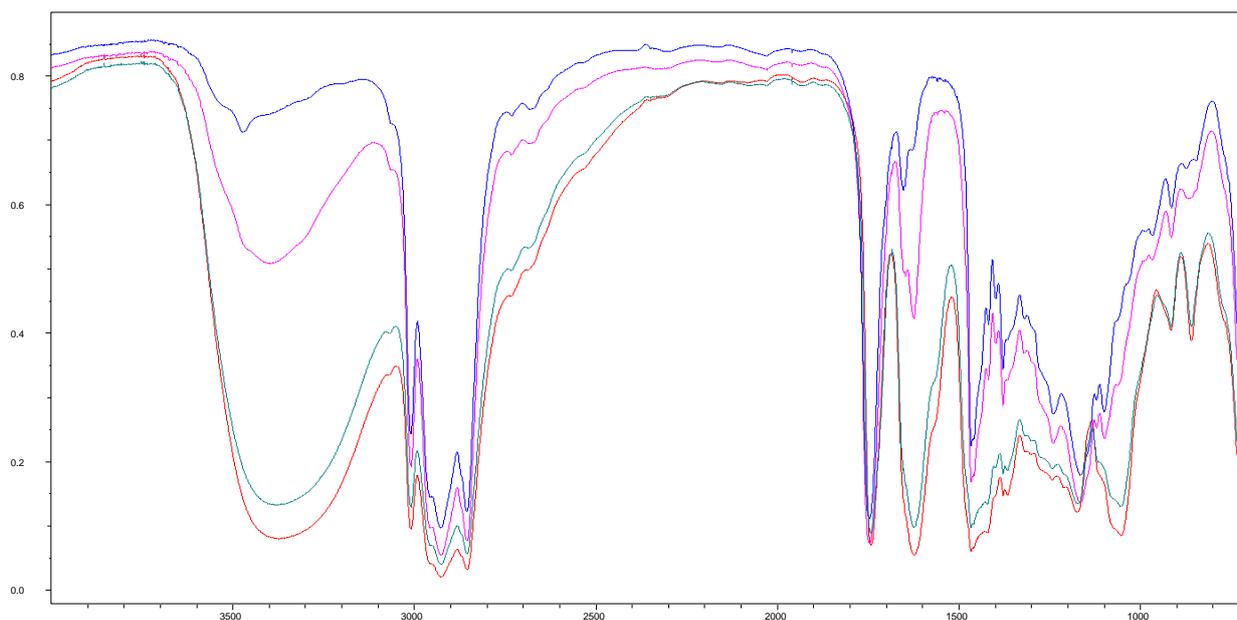


Рис. 1. ИК-спектры полученных продуктов

На ИК-спектре продуктов взаимодействия наблюдаем уменьшение, а также практически исчезновения, полосы поглощения в области 3400 см^{-1} , что свидетельствует об исчезновении гидроксильных групп и протекании реакции по ним. Вместе с тем, проявляется полоса средней интенсивности при 1170 см^{-1} и 1740 см^{-1} , которую можно отнести к $(\text{C}=\text{O})$ в амидах и сложных эфирах. В интервале 1620 см^{-1} наблюдается еще одна полоса интенсивности, которую также можем отнести к амидным группам.

Полученные сложные эфиры диэтанламида в дальнейшем подвергались кватернизации хлористым метиленом и диметилсульфоксидом. Образовавшийся продукт исследован на мицеллярные свойства методом оптической спектроскопии. Для кватернизованного эфира, полученного при 150 °C характерна высокая светопропускаемость раствора, в отличии от

остальных кватернизованных эфиров, что объясняется меньшим размером мицеллярных структур характерных для диэтаноламида, в отличие от эфиров диэтаноламида, При этом для первого продукта наблюдается излом на кривой светопропускания при значениях концентрации 0,003 г/100 мл, характеризующий начало мицеллообразования, в отличие от остальных продуктов, для которых мицеллообразование происходит при концентрациях ближе к 0,01 г/100 мл. Это свидетельствует о больших размерах мицеллярных структур для полученных эфиров диэтаноламида.

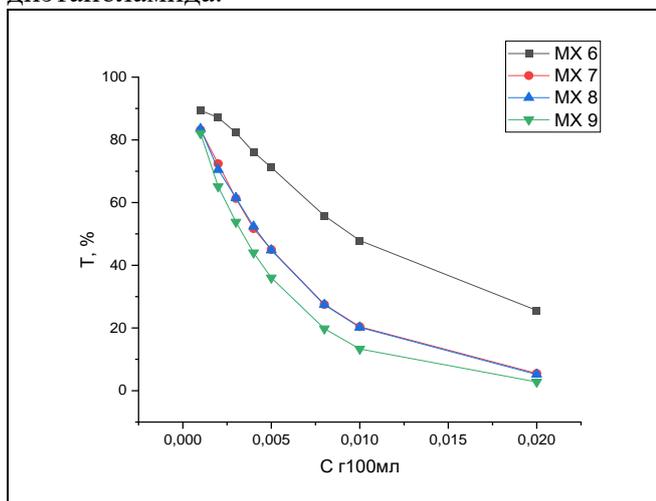


Рис. 2 - Зависимость светопропускания от концентрации раствора для продуктов кватернизованных метиленхлоридом

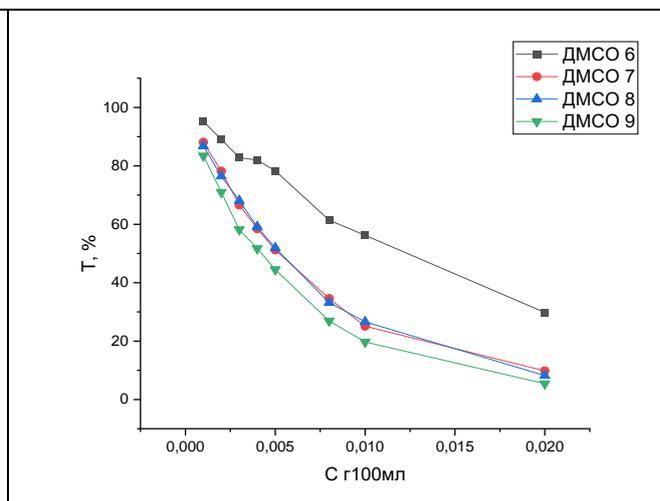


Рис. 3 - Зависимость светопропускания от концентрации раствора для продуктов кватернизованных ДМСО

Также, полученные продукты были исследованы по влиянию на поверхностное натяжение водных растворов. Определение поверхностного натяжения водных растворов проводили по методу Ребиндера.

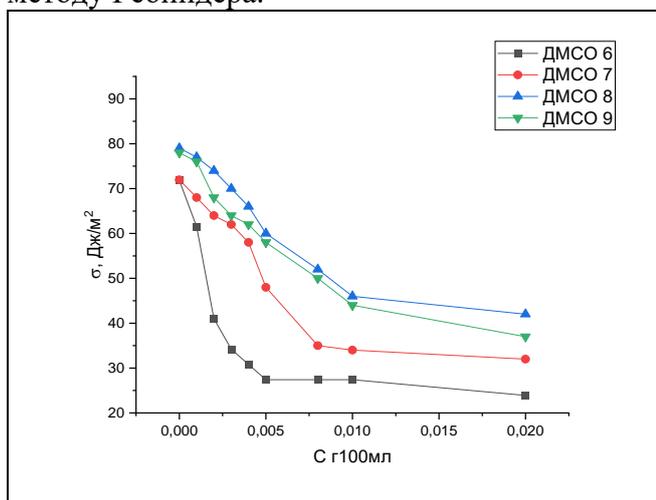


Рис. 4 - Зависимость поверхностного натяжения от концентрации раствора для продуктов кватернизованных ДМСО

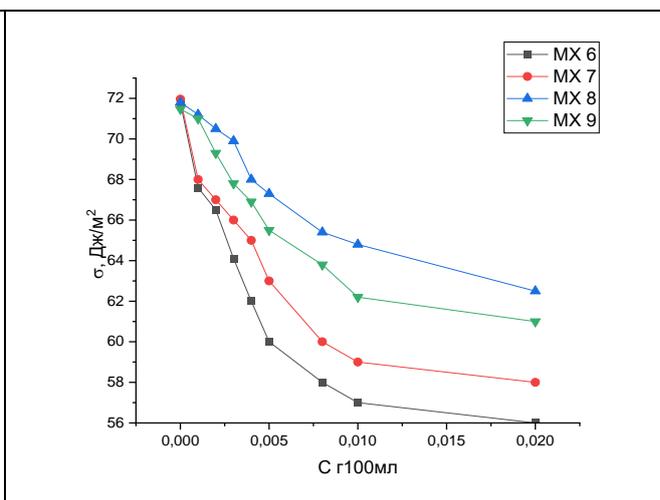


Рис. 5 - Зависимость поверхностного натяжения от концентрации раствора для продуктов кватернизованных хлористым метиленом

Характер зависимостей по изменению поверхностного натяжения аналогичен зависимости светопропускания, что подтверждает точку мицеллообразования. Также стоит отметить более резкое снижение поверхностного натяжения для продукта 6 в связи с его более активной дифильной природой, характерной для этаноламидов, которые более поверхностно-активны по

сравнению с эстеркватами. Также зависимости показывают незначительное изменение поверхностного натяжения для продукта 8, характеризующегося более близкой по характеристикам природой к эстеркватам.

Библиографический список

1. Mishra S., Tyagi V.K. Ester Quats: The Novel Class of Cationic Fabric Softeners. *J. Oleo Sci.* 2007, 56, 269–276.
2. Javadian S., Aghdastinat H., Tehrani-Bagha A., Gharibi H. Self-Assembled Nano Structures of Cationic Ester-Containing Gemini Surfactants: The Surfactant Structure and Salt Effects. *J. Chem. Thermodyn.* 2013, 62, 201–210.
3. Tehrani-Bagha A.R., Oskarsson H., van Ginkel C.G., Holmberg K. Cationic Ester-Containing Gemini Surfactants: Chemical Hydrolysis and Biodegradation. *J. Colloid Interface Sci.* 2007, 312, 444–452.
4. Gaida B., Brzeczek-Szafran A. Insights into the Properties and Potential Applications of Renewable Carbohydrate-Based Ionic Liquids: A Review. *Molecules* 2020, 25, 3285.
5. Lundberg D., Stjern Dahl M., Holmberg K. Ester-based Surfactants: Are They Stable Enough? *J. Surfact Deterg.* 2022, 26, 229–236.
6. Para G., Łuczyński J., Palus J., Jarek E., Wilk K.A., Warszyński, P. Hydrolysis Driven Surface Activity of Esterquat Surfactants. *J. Colloid Interface Sci.* 2016, 465, 174–182. [
7. Watson M.K., Tezel U., Pavlostathis S.G. Biotransformation of Alkanoylcholines under Methanogenic Conditions. *Water Res.* 2012, 46, 2947–2956.

УДК 579.264

ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ ШТАММОВ *BACILLUS* SPP. И *LACTOBACILLUS* SPP.

Д.Е. Дудник, А.Н. Иркитова, А.В. Малкова, Е.Н. Кожевникова
Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

В статье представлены результаты исследования биосовместимости штаммов молочнокислых и споровых бактерий, перспективных для включения в состав биологических препаратов для сельского хозяйства. Биологические препараты являются альтернативным способом борьбы с патогенной микрофлорой в условиях животноводческих предприятий. Большую эффективность демонстрируют препараты, состоящие из 2 и более штаммов микроорганизмов. При разработке таких препаратов важно учитывать биосовместимость микробных культур.

Ключевые слова: биосовместимость, *Bacillus*, *Lactobacillus*, биопрепараты

ASSESSMENT OF BIOCOMPATIBILITY OF *BACILLUS* SPP. AND *LACTOBACILLUS* SPP. STRAINS.

E.D. Dudnik, A.N. Irkitova, A.V. Malkova, E.N. Kozhevnikova
Altai State University, Barnaul, Russia

The article presents the results of a study of the biocompatibility of strains of lactic acid and spore bacteria that are promising for inclusion in biological preparations for agriculture. Biological preparations are an alternative way to combat pathogenic microflora in livestock enterprises. Preparations consisting of 2 or more strains of microorganisms demonstrate great effectiveness. When developing such preparations, it is important to take into account the biocompatibility of microbial cultures.

Keywords: biocompatibility, *Bacillus*, *Lactobacillus*, biological preparations.

Введение

Распространение устойчивости к антибиотикам и средствам химической дезинфекции в микробной популяции вынуждает искать альтернативные способы для борьбы с патогенной микрофлорой в условиях животноводческих предприятий. Наиболее перспективным в этом отношении является биологический контроль болезнетворных микроорганизмов посредством внедрения практики использования препаратов на основе непатогенных бактерий, грибов и дрожжей, а также их метаболитов. Микробные препараты, применяемые в животноводстве, уже доказали свою эффективность в качестве пробиотиков и средств для обработки помещений и подстилки. Установлено их благоприятное действие на макроорганизмы, микроклимат и санитарный фон животноводческих помещений [4, 5, 13].

В качестве перспективных микроорганизмов для разработки биологических препаратов сельскохозяйственного назначения рассматриваются молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus* и споровые бактерии рода *Bacillus*. Штаммы этих микроорганизмов обладают антагонистической активностью в отношении инфекционных агентов за счет продукции органических кислот, ферментов, бактериоцинов, липопептидов и др. [6, 9, 14]. Виды *Lactobacillus* и *Bacillus* признаны безопасными (QPS) для человека и животных и разрешены для использования в пище и кормах [11].

Микробные биопрепараты для животноводства могут иметь в своем составе один или несколько штаммов микроорганизмов. Мультиштабные препараты обладают преимуществами, выражающимися в синергии действия составляющих их штаммов, более эффективной колонизации среды и увеличении жизнеспособности штаммов при действии стрессовых факторов. Синергия антагонистической активности штаммов препарата обуславливается продукцией различных антимикробных метаболитов каждым штаммом препарата [6, 10]. Помимо этого, микроорганизмы консорциума способны к взаимной индукции синтеза бактерицидных или фунгицидных соединений, не свойственных для монокультуры. Секрция новых метаболитов регулируется Quorum sensing [7].

Микроорганизмы из многоштабных препаратов обладают разными свойствами и соответственно имеют большие шансы на выживание и колонизацию целевой ниши [10, 13]. При совместном применении некоторые культуры могут оказывать защитное действие на другие путем образования биопленок. Так, виды *Bacillus* способны формировать совместную с видами *Lactobacillus* биопленку, чем повышают сохранность лактобактерий при действии неблагоприятных факторов среды [7].

Мультиштабные биопрепараты показывают большую эффективность по сравнению с моноштабными в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. В лабораторных исследованиях для комплекса штаммов споровых и молочнокислых бактерий было установлено бактерицидное действие в отношении *Escherichia coli*, превышающее действие каждого штамма по отдельности [15]. Применение многовидовых пробиотиков, включающих виды *Bacillus* и *Lactobacillus*, благоприятно сказалось на биохимических показателях крови и увеличило среднесуточный привес телят на 15-50% по сравнению с препаратами из одного штамма бактерий [5]. Таким образом, мультиштабные препараты, содержащие разные бактерии, воздействуют на разные участки организма и проявляют более выраженный эффект на патогены.

Цель исследования: оценка биосовместимости штаммов *Bacillus* spp. и *Lactobacillus* spp. для разработки многоштабного биологического препарата.

Материалы и методы.

В качестве объекта исследования использовали штаммы *B. atrophaeus* 7, *B. licheniformis* 6, *B. subtilis* 1/8, *Lactobacillus* sp.8Б, *L. pentosus* М, *L. pentosus* ЛВ из коллекции ИЦ «Промбиотех» АлтГУ. Все штаммы обладают антагонистической активностью в отношении бактериальных и грибных патогенных микроорганизмов.

Штаммы бацилл культивировали в течение 24 ч на L бульоне в шейкере-инкубаторе при 37°C и 220 об/мин. Штаммы *Lactobacillus* spp. выращивали в термостате на MRS бульоне при 30°C в течение 24 ч.

Определение биосовместимости проводили на питательном агаре. Штаммы культивировали 24 ч при температуре оптимальной для роста штамма, используемого в качестве тест-культуры.

Биосовместимость штаммов *Lactobacillus* spp. изучали методом лунок [2]. Для этого исследуемый штамм засеивали поверхностно (штаммы *Bacillus* spp.) или глубинно (штаммы *Lactobacillus* spp.) «газоном». Затем в нем пробочным сверлом прорезали лунки, не доходя до дна чашки. В полученные лунки вносили по 30 мкл культуральной жидкости тест-культуры. Штаммы считали биосовместимыми при отсутствии зон угнетения роста вокруг лунок.

Определение биосовместимости бацилл проводили методом перпендикулярных штрихов [1]. Исследуемый штамм высевали прямым штрихом по диаметру чашки и культивировали 24 ч при температуре 37°C. По окончании инкубации к штриху подсеивали перпендикулярно штаммы, используемые в качестве тест-культур. Культивировали чашки в течение 24 ч при 37°C. Биосовместимыми считали штаммы, имеющие нормальный рост, без зон подавления, на границе контакта их штрихов.

Эксперименты проводили в 3 повторностях. Все полученные данные статистически обработаны и представлены в виде “среднее значение ± стандартное отклонение”.

Результаты и обсуждение

Биосовместимость является важным критерием отбора штаммов при разработке многоштабных биологических препаратов. Штаммы не должны проявлять антагонистическую активность в отношении друг друга, так как это существенно снизит эффективность готового препарата.

По результатам исследования, все проверенные штаммы *Lactobacillus* spp. оказались биосовместимыми. Они не проявляли антагонистической активности в отношении друг друга и характер роста не менялся при совместном культивировании на агаризованной среде (табл. 1).

Таблица 1

Биосовместимость штаммов *Bacillus* spp. и *Lactobacillus* spp.

Исследуемый штамм	Тест-культура					
	<i>L. pentosus</i> ЛВ	<i>L. pentosus</i> М	<i>Lactobacillus</i> sp.8Б	<i>B. atrophaeus</i> 7	<i>B. licheniformis</i> 6	<i>B. subtilis</i> 1/8
	Размер зон подавления роста, мм					
<i>L. pentosus</i> ЛВ	-	-	-	-	-	-
<i>L. pentosus</i> М	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp.8Б	-	-	-	-	-	-
<i>B. atrophaeus</i> 7	-	-	-	-	4,7±0,3	-
<i>B. licheniformis</i> 6	22,5±0,5	25,7±0,3	18,5±0,6	-	-	-
<i>B. subtilis</i> 1/8	-	-	-	-	3,7±0,3	-

Примечание: «-» - антагонизма нет

Для штаммов *Bacillus* spp., напротив, было установлено угнетение роста одного из штаммов другими. Подавление роста штамма *B. licheniformis* 6 отмечено при его культивировании в качестве тест-культуры со штаммами *B. atrophaeus* 7 и *B. subtilis* 1/8. Антагонизм в отношении этого штамма может быть опосредован низкомолекулярными метаболитами, выделенными в среду штаммом, засеянным основным штрихом. Угнетение роста близких видов или штаммов связывают с продукцией антимикробных пептидов – бактериоцинов [8, 9].

Антагонистическая активность штаммов *Lactobacillus* spp. в отношении *B. licheniformis* 6 также может быть опосредована продукцией ими антимикробных метаболитов. Виды *Lactobacillus* могут подавлять рост грамположительных микроорганизмов за счет синтеза ферментов и бактериоцинов [12].

Помимо этого, подавление роста *B. licheniformis* 6 штаммами *Lactobacillus* spp. может быть следствием закисления среды, вызванного синтезом микроорганизмами молочной кислоты. Образование молочной кислоты может варьировать и в зависимости от питательной среды и штамма и достигать 40-50 г/л. При этом рН среды снижается до 3,5-4,5. [3, 12] Угнетение штамма *B. licheniformis* 6 в этом случае определяется его слабой кислотоустойчивостью.

Заключение.

Установлена биосовместимость штаммов *B. atrophaeus* 7, *B. subtilis* 1/8, *Lactobacillus* sp.8Б, *L. pentosus* М и *L. pentosus* ЛВ. Данные штаммы могут использоваться для разработки мультиштабного препарата для животноводства.

Библиографический список

1. Байгазанов А. Н., Финогенов А. Ю., Нуркенова М. К., Икимбаева Н. А., Зайнеттинова Д. Б. Антагонистические свойства бациллярных пробиотических штаммов // Авиценна. 2017. № 10. С. 7–10.

2. Проскурнина И. А. Исследование пробиотических свойств штаммов *Bacillus velezensis* БИМ в-497 д и *Bacillus velezensis* БИМ в-1312 д - основы кормовой добавки // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: Сборник научных трудов. Минск: Республиканское унитарное предприятие Издательский дом «Белорусская наука», 2020. С. 206–216.
3. Саламатзадех А. А., Ганбаров Х. Г., Кафшдарджалал А. М. Влияние условий культивирования на продуцирование молочной кислоты у бактерий рода *Lactobacillus* // Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. 2011. № 2. С. 73–77.
4. Сверчкова, Н. В. Пробиотические препараты на основе бактерий рода *Bacillus* для животноводства, птицеводства и промышленного рыбководства // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: Сборник научных трудов. Минск: Республиканское унитарное предприятие Издательский дом «Белорусская наука», 2020. С. 252–264.
5. Аyyat M. S., El-Nagar H. A., Wafa W. M., Abd El-Latif K. M., Mahgoub S., Al-Sagheer A. A. Comparable Evaluation of Nutritional Benefits of *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus toyonensis* Probiotic Supplementation on Growth, Feed Utilization, Health, and Fecal Microbiota in Pre-Weaning Male Calves // *Animals* (Basel). 2023. V 13. doi: 10.3390/ani13213422.
6. Hirozawa M. T., Ono M. A., Suguiura I. M. S., Bordini J. G., Ono E. Y. S. Lactic acid bacteria and *Bacillus* spp. as fungal biological control agents // *J Appl Microbiol*. 2023. V. 134. doi: 10.1093/jambio/txac083.
7. Kimelman H., Shemesh M. Probiotic Bifunctionality of *Bacillus subtilis* - Rescuing Lactic Acid Bacteria from Desiccation and Antagonizing Pathogenic *Staphylococcus aureus* // *Microorganisms*. 2019. V. 7. doi: 10.3390/microorganisms7100407.
8. Kwoji I. D., Aiyegoro O. A., Okpeku M., Adeleke M. A. Multi-Strain Probiotics: Synergy among Isolates Enhances Biological Activities // *Biology* (Basel). 2021. V. 10. doi: 10.3390/biology10040322.
9. McFarland L. V. Efficacy of Single-Strain Probiotics Versus Multi-Strain Mixtures: Systematic Review of Strain and Disease Specificity // *Dig Dis Sci*. 2021.V. 66. doi: 10.1007/s10620-020-06244-z.
10. Puvanasundram P., Chong C. M., Sabri S., Yusoff M. S. M., Lim K. C., Karim M. Efficacy of Single and Multi-Strain Probiotics on In Vitro Strain Compatibility, Pathogen Inhibition, Biofilm Formation Capability, and Stress Tolerance // *Biology* (Basel). 2022. V. 11. doi: 10.3390/biology11111644.
11. Ricci A., Allende A., Bolton D., Chemaly M. et. al. Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA // *EFSA Journal*. 2017. V. 15. P. 4664 [1-177].
12. Soria M. C., Audisio M. C. Inhibition of *Bacillus cereus* Strains by Antimicrobial Metabolites from *Lactobacillus johnsonii* CRL1647 and *Enterococcus faecium* SM21 // *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2014.V. 6. P. 208–216. doi: 10.1007/s12602-014-9169-z.
13. Timmerman H. M., Koning C. J., Mulder L., Rombouts F. M., Beynen A. C. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics-A comparison of functionality and efficacy // *Int J Food Microbiol*. 2004. V. 96. P. 219–233. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.012.
14. Tran C., Cock I. E., Chen X., Feng Y. Antimicrobial *Bacillus*: Metabolites and Their Mode of Action // *Antibiotics* (Basel). 2022. V. 11. doi: 10.3390/antibiotics11010088.
15. Yang J. J., Niu C. C., Guo X. H. Mixed culture models for predicting intestinal microbial interactions between *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in the presence of probiotic *Bacillus subtilis* // *Benef Microbes*. 2015. V. 6. P. 871-877. doi: 10.3920/BM2015.0033.

УДК 579.66/579.62

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ШТАММОВ *BACILLUS TOYONENSIS* В-13249 И *B. PUMILUS* В-13250, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ОСНОВЕ ПРОБИОТИКА ДЛЯ АКВАКУЛЬТУРЫ

И.Ю. Евдокимов, А.Н. Иркитова

Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

При промышленном разведении аквакультур предприятия сталкиваются с различными инфекциями, что часто приводит к массовой гибели поголовья водных животных. В последние годы всё большую популярность набирают пробиотики, которые эффективны в профилактике и предотвращении развития инфекций. Оздоровляющие свойства пробиотиков заключаются в проявлении антагонизма к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, в создании благоприятных условий для представителей нормальной микрофлоры и снабжении организма-хозяина биологически активными веществами. В данном исследовании выявлено, что и *Bacillus toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250 проявляют высокий антагонистический эффект к представителям патогенной и условно-патогенной микрофлоры: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Salmonella abony*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*. Штаммы *Bacillus pumilus* В-13250 и *Bacillus toyonensis* В-13249 оказались высокочувствительны к широкоприменяемым в животноводстве и птицеводстве антибиотикам: олеандомицин, энрофлоксацин, мономицин, цефалексин, бензилпенициллин и, практически, не чувствительны к оксациллину.

Ключевые слова: пробиотики, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus pumilus*, аквакультура.

Разведение различных водных животных широко распространено в прибрежных странах, таких как Индия, Тайланд, Мексика и др. В России эта отрасль также динамично развивается. Успешное разведение аквакультур для получения продуктов питания водного происхождения может стать ключевым фактором в решении продовольственной проблемы [1, 2]. При этом промышленное разведение аквакультур имеет ряд особенностей. Многие производимые объекты на ранних стадиях развития нуждаются в подвижности корма. Так, активное питание, следовательно, и интенсивный рост организма, происходит при самостоятельном передвижении кормовых единиц. В связи с указанной особенностью, в качестве оптимального стартового корма стали повсеместно использовать планктонных галофильных рачков рода *Artemia*, распространенных в соленых озерах Западной Сибири [3].

При разведении аквакультур производственные предприятия сталкиваются с различными инфекциями на производстве, что часто приводит к массовой гибели поголовья водных животных. К патогенным бактериям, распространенным в водной среде, относятся представители рр. *Vibrio* [4], *Salmonella*, *Escherichia* [5] и многие др. Для предотвращения крупных потерь водных животных и восстановления санитарного фона предприятий при производстве промысловых объектов, долгие годы применялись антибиотики. Антибиотикотерапия со временем привела к развитию генов резистентности к ним у большинства патогенных микроорганизмов, что требовало повышение доз антибиотических веществ, либо смену антибиотика. Чтобы устойчивость бактерий к антибиотикам не привела к экологической катастрофе, в последние годы большую популярность набирают пробиотики как безопасный способ профилактики микробных инфекций [6].

Оздоровляющие свойства пробиотиков заключаются в проявлении антагонизма к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, в создании благоприятных условий

для представителей нормальной микрофлоры и снабжении организма-хозяина биологически активными веществами. Являясь транзиторными микроорганизмами, представители рода *Bacillus*, даже при приобретении резистентности к антибиотикам, не успевают передать данные гены представителям патогенной микрофлоры. Вследствие чего, биологические риски при использовании пробиотиков на основе бацилл минимальны. Кроме того, из-за образования эндоспор, бациллы являются удобным биотехнологическим объектом, так как устойчивы к различным факторам среды, легко переносят сушку, долго сохраняются, легко транспортируются и пр.

Цель нашего исследования – оценить биотехнологический потенциал штаммов *B. toyonensis* В-13249, *B. pumilus* В-13250 для использования в качестве основы пробиотика для аквакультур.

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали 2 штамма споровых бактерий из коллекции ИЦ «Промбиотех» АлтГУ (табл. 1).

Таблица 1

Штаммы бацилл, использованные для проведения исследования

Штамм	Источник выделения	Регистрационный номер (ВКПМ)	Морфология
<i>B. toyonensis</i>	Ризосфера р. <i>Helianthus</i>	В-13249	Палочки (около 1 мкм), чаще расположенные парами или цепочками. Колонии на L–среде грязно-белого цвета, 1,0–1,2 см, блестящие, приподнятые, с неровным краем.
<i>B. pumilus</i>	Ризосфера р. <i>Cichorium</i>	В-13250	Палочки (около 0,7 мкм), чаще расположенные одиночно или парами. Колонии на L–среде белого цвета, с максимальным диаметром 0,5–0,8 см, матовые, приподнятые, ровной округлой формы, со складчатой каймой.

Микробиологические методы исследования. Посев на твердые питательные среды проводили чашечным методом Коха с применением десятикратных разведений. Для восстановления культур, посева на твердый субстрат, контроля численности и чистоты использовали физиологический раствор, L(Лурия)-среду, среду Левина.

Антагонистическую активность исследуемых культур определяли диффузионным методом перпендикулярных штрихов при совместном высеве с патогенными тест-культурами на агаризованные среды. В качестве штаммов-антагонистов использовали *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250, в качестве тест-культур патогенные и условно-патогенные штаммы (10 тест-культур).

Антибиотикорезистентность исследуемых штаммов определяли диско-диффузионным методом на твердой L-среде. Для этого на поверхность агара сплошным газом рассеивали культуру бацилл. На среду помещали диски с различными антибиотиками. Учет проводили после культивирования по зонам отсутствия или подавления роста бактерий вокруг дисков с антибиотиками.

Для статистической обработки данных использовали параметрический t-критерий Стьюдента. Достоверным считали различия при уровне значимости $p < 0.05$. Расчет результатов осуществляли с помощью пакетов прикладных программ MS Excel 2020. В таблицах приведены данные средних арифметических значений со стандартным отклонением.

Результаты и обсуждение

Антагонистическая активность. При подборе штаммов для включения в состав пробиотических препаратов, необходимо было учитывать их антагонистическую активность к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. Чем шире спектр антагонистической активности отобранных штаммов, тем эффективнее будет действовать биологический препарат в условиях промышленного разведения аквакультур. В настоящем исследовании в качестве тест-культур использовали 10 микроорганизмов III и IV групп патогенности: *Staphylococcus aureus*, *St. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Candida albicans*, *Pseudoonas aeruginosa*, *Salmonella abony*, *S. typhimurium*, *Shigella sonnei*; Представленные микроорганизмы широко распространены в природе и являются частыми возбудителями заболеваний у животных, в том числе у водных. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2

Характер воздействия исследуемых штаммов микроорганизмов на патогенные и условно-патогенные тест-культуры

Штамм	Патогенные тест штаммы / характер роста под воздействием метаболитов штамма бациллы* / зона угнетения роста, мм									
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. abony</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. sonnei</i> 32
<i>B. pumilus</i> B-13250	1 мм лизис + 3 мм ОРШ	б/изм	б/изм	35 мм лизис + ОРВШ	б/изм	б/изм	ОРНШ	10 мм лизис + 25 мм ОРШ	ОРНШ	ОРНШ
<i>B. toyonensis</i> B-13249	2 мм лизис + 20 ОРШ	5 мм ОРНШ	б/изм	40 мм лизис ОРВШ	б/изм	б/изм	15 мм ОРШ	10 мм лизис + ОРВШ	ОРНШ	ОРНШ

*Обозначения:

ОРНШ – ослабление роста в начале штриха тест-штамма (началом штриха патогенного тест штамма считается место его контакта со штрихом штамма антагониста);

ОРШ – ослабление роста штриха тест-штамма;

НОРШ – незначительное ослабление роста штриха тест-штамма;

ОРВШ – ослабление роста всего штриха тест-штамма;

б/изм – без изменений (характер роста тест-штамма в опытном варианте не отличается от роста в контроле);

лизис – отсутствие визуально наблюдаемого роста штриха тест-штамма или следовый его рост.

По приведенным результатам исследования характер воздействия исследуемых бацилл на патогенную и условно-патогенную микрофлору можно охарактеризовать следующим образом:

1. Высокая литическая активность внеклеточных метаболитов обоих природных штаммов бацилл, использованных в опыте, относительно штамма дрожжеподобного гриба *C. albicans* 620 Y-583;

2. Грамположительные штаммы *St. aureus* 201108 B-1266 и *St. epidermidis* ATCC14990 B-1363 проявили высокую чувствительность к воздействию водорастворимых диффундирующих метаболитов штаммов обеих бацилл;

3. Грамотрицательные тест-штаммы *E. coli* 6645 ATCC 25922 В-655, *S. typhimurium* 2606 и *Sh. sonnei* 32 проявили низкую чувствительность к метаболитам исследуемых бацилл. К *E. coli* 6645 ATCC 25922 В-655 проявилось влияние метаболитов только *B. toyonensis* В-13249. Наблюдался небольшой лизис или угнетение роста *S. typhimurium* 2606 и *Sh. sonnei* 32 с обоими исследуемыми штаммами;

4. Грамотрицательный штамм *S. abony* 103/39 был чувствителен к воздействию культур бацилл *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249, заметно антибиотическое действие на данный штамм;

5. Воздействия на штаммы *Ps. aeruginosa* 6643 В-1295, *B. subtilis* 6644 ATCC 6633 В-654 и *B. cereus* 37 ATCC 10702 В-1367 обеих культур выражалось незначительно, что говорило о малой чувствительности к метаболитам исследуемых культур к тест-штаммам.

Таким образом, оба исследуемых штамма обладали высокой антагонистической активностью по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре и зарекомендовали себя как пробиотические.

Антибиотикорезистентность. Проблема антибиотикоустойчивости у бактерий в настоящее время является актуальной для всех воспроизводимых объектов сельского хозяйства, в том числе аквакультуры. Распространение резистентности бактерий к антибиотическим препаратам представляет серьезную угрозу для общественного здравоохранения во всем мире [7]. Серьезность этой проблемы усугубляется возможностью бактерий горизонтально передавать детерминанты резистентности патогенам и комменсальной кишечной микробиоте человека. Некоторые пробиотические штаммы с внутренней устойчивостью к антибиотикам призваны быть полезными для восстановления микробиоты кишечника после лечения антибиотиками [8]. Оба исследованных штамма оказались чувствительны к основным группам антибиотиков (табл. 3).

Таблица 3

Чувствительность штаммов к антибиотикам

Антибиотик	<i>B. toyonensis</i> В-13249		<i>B. pumilus</i> В-13250	
	Задержка роста (мм)	Чувствительность	Задержка роста (мм)	Чувствительность
Цефалексин	13,6 (±1,1)	Умеренная	37,9 (±0,7)	Высокая
Олеандомицин	13,2 (±1,2)	Умеренная	17,1 (±1,9)	Умеренная
Энрофлоксацин	10,7 (±0,7)	Умеренная	25,7 (±8,9)	Высокая
Бензилпенициллин	2,8 (±0,2)	Низкая	18,5 (±1,2)	Умеренная
Оксациллин	0	Отсутствует	0	Отсутствует
Мономицин	10,1 (±0,3)	Умеренная	16 (±0,6)	Умеренная

Для обоих штаммов зафиксировали чувствительность к 5 из 6 тестируемых антибиотиков. Это открывает для них перспективу их применения в качестве пробиотических при разработке биопрепаратов для аквакультур, так как они не смогут передать патогенным бактериям гены антибиотикорезистентности. С другой стороны, полученные данные делают невозможным прием препарата, содержащего исследуемые штаммы микроорганизмов, во время антибиотикотерапии исследованными антибиотиками (5 из 6). При этом, оба штамма оказались устойчивы к оксациллину, это может быть связано с тем, что штаммы группы *B. cereus* обычно устойчивы к β-лактамам в результате продукции ферментов β-лактамаз, а также большое количество видов этой группы содержат гены устойчивости к антибиотикам [9]. *B. toyonensis* В-13249 относится к этой группе микроорганизмов, вследствие чего, высока вероятность, что данный штамм также располагает генами резистентности к β-лактамам, в том числе к оксациллину, это подтверждается и низкой чувствительностью к бензилпенициллину 2,8 (±0,2) мм. Некоторые бактерии группы *B. subtilis*, к которым относится и *B. pumilus* В-13250, также обладают генами резистентности к оксациллину [10].

Таким образом, штаммы *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249 обладают высоким биотехнологическим потенциалом и могут успешно использоваться в составе пробиотика для аквакультуры.

Выводы

1. Штамм *B. pumilus* В-13250 проявил антагонизм к 6 из 10 исследуемых тест-культур, а штамм *B. toyonensis* В-13249 – к 7 из 10. При этом антагонизм по отношению к тест-культурам *Ps. aeruginosa* 6643 В-1295, *B. subtilis* 6644 ATCC 6633 В-654 и *B. cereus* 37 ATCC 10702 В-1367 у обеих бацилл выражен незначительно, а к *E. coli* 6645 ATCC 25922 В-655 антагонистический эффект проявил только *B. toyonensis* В-13249.

2. Штаммы *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249 чувствительны к 5 антибиотикам: олеандомицин, энрофлоксацин, мономицин, цефалексин, бензилпенициллин и не чувствительны к оксациллину.

Библиографический список

1. A Review on Shrimp Aquaculture in India: Historical Perspective, Constraints, Status and Future Implications for Impacts on Aquatic Ecosystem and Biodiversity / M. Salunke, A. Kalyankar, C.D. Khedkar [et al.] // Reviews in Fisheries Science & Aquaculture. – 2020. – V. 28. – №. 3. – P. 283-302.

2. Aquaculture Production and Its Environmental Sustainability in Thailand: Challenges and Potential Solutions / T. Sampantamit, L. Ho, C. Lachat [et al.] // Sustainability. – 2020. – V. 12. – №. 5. – P. 2010.

3. Effect of a new probiotic on Artemia cysts determined by a convolutional neural network / I.Yu. Evdokimov, A.V. Malkova, A.N. Irkitova [et al.] // Foods and Raw Materials. – 2024. – V. 12. – №. 1. – P. 91-100.

4. *Vibrio* spp. Control at Brine Shrimp, *Artemia*, Hatching and Enrichment / J. Interaminense, N.F. Calazans, C.V. Bruna [et al.] // Journal of the World Aquaculture society. – 2014. – V. 45. – №. 1. – P. 65-74.

5. Faridullah M. Prevalence of *Salmonella* and *Escherichia coli* contamination in shrimp (*Penaeus monodon*) farms, depots and processing plants in different areas of Bangladesh / M. Faridullah, V.C. Roy, U.J. Lithi // Asian Journal of Medical and Biological Research. – 2016. – V. 2. – №. 2. – P. 171-176.

6. Probiotics: Comprehensive Exploration of the Growth Promotion Mechanisms in Shrimps / Jo.X.H. Goh, L.T.-H. Tan, J.W.-F. Law [et al.] // Progress in Microbes and Molecular Biology. – 2023. – V. 6. – №. 1. – P. a0000324.

7. Bacterial resistance to antibacterial agents: Mechanisms, control strategies, and implications for global health / T. Li, Zh. Wang, J. Guo [et al.] // Science of The Total Environment. – 2023. – V. 860. – P. e160461.

8. Изучение антибиотикочувствительности нового ризосферного штамма *Bacillus pumilus* В-13250 для возможности использования его в составе пробиотических препаратов для животноводства / Т.Н. Орлова, А.Н. Иркитова, А.В. Гребенщикова [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2020. – Т. 183. – №. 1. – С. 111-115.

9. Antibiotics resistance and toxin profiles of *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables from German retail markets / G. Fiedler, C. Schneider, E.O. Igbinosa [et al.] // BMC Microbiology. – 2019. – V. 19. – P. 250.

10. Antibiotic resistance pattern of the allochthonous bacteria isolated from commercially available spices / Év. György, Év. Laslo, M. Antal [et al.] // Food Science Nutrition. – 2021. – V. 9. – P. 4551-4561.

УДК 547-32*67.03

БИОКОМПОЗИТНЫЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ БИОРАЗЛАГАЕМОЙ МАТРИЦЫ ИЗ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА И ВОЛОКНА ДРЕВЕСИНЫ

Н.Д. Ипатова¹, А.В. Демиденко^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

²Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН, Красноярск, Россия

Представлены результаты исследования биокompозитного материала на основе поли-3-гидроксибутирата, наполненного волокном древесины сосны полученных прессованием при 170 °С и 5000 Па. Выявлено влияние количества наполнителя, размера частиц на физико-механические свойства композитного материала и его биodeградацию в лабораторной почвенной микро-экосистеме. Установлено, что размеры частиц и содержание наполнителя, оказывают влияние на прочностные характеристики композитного материала. Лучшими физико-механическими характеристиками обладали образцы с размером частиц полимера и натурального наполнителя 20 мкм и содержанием наполнителя 70 %. В процессе естественной биodeградации произошла убыль массы образцов на 45,3 % от исходных значений за 240 суток. **Ключевые слова:** поли-3-гидроксибутират, волокно древесины, биокompозиты, свойства, биodeградация

Введение

Одной из самых актуальных проблем в сфере жизнедеятельности человека является неразрушаемость синтетических полимерных материалов в природной среде. Масштабы их применения огромны, а производство пластмасс достигает 370 миллионов тонн в год [3]. Для утилизации синтетических полимеров самыми распространенными методами являются сжигание и захоронение, лишь малый процент вторично перерабатывают.

Различные методы были предложены для решения проблем, связанных с пластиковыми отходами. Они включают переработку, рекуперацию энергии, запрет определенных продуктов и производство биоразлагаемых пластиков.

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – полиэфиры микробиологического происхождения, эндогенно синтезируются многими прокариотами в особых условиях, при избытке углеродного субстрата и дефиците минеральных элементов в среде. ПГА обладают рядом уникальных свойств: биосовместимость, термопластичность, гидрофобность и биоразрушаемость [4, 6]. Самым доступным из семейства ПГА является поли-3-гидроксибутират (ПЗГБ). Актуальность данной работы заключается в разработке композитного материала на основе биоразлагаемой матрицы из ПЗГБ и волокна древесины (ВД), в качестве альтернативы древесно-полимерным композитам (ДПК) на основе традиционных синтетических пластмасс, таких как полипропилен, полиэтилен, поливинилхлорид.

Объекты и методы

Объекты исследования

ПЗГБ был синтезирован по авторской технологии [1, 7] с использованием штамма бактерии *Cupriavidus necator* В-10646.

Сосновые опилки влажностью 85 %, были получены на лесопильном заводе ООО «Приангарский ЛПК» (Красноярский край, Россия) и подвергнуты гидродинамической обработке [5] с целью получения ВД.

Получение биокompозитного материала методом контактного горячего прессования

Размол исходных материалов проводили на ультрацентриробежной мельнице ZM 200 (Retsch, Германия). Для измельчения ПЗГБ использовали решётки на 2,0 мм со скоростью вращения ротора 18000 об/мин. Для измельчения ВД применяли решетки на 0,25 мм. Скорость составляла 12000 об/мин. С помощью просеивающей машины AS 200 control (Retsch, Германия) осуществляли разделение материалов на отдельные фракции. Навески ПЗГБ и ВД смешивали с помощью настольного миксера SpeedMixer DAC 250 SP (Hauschild, Германия). Были получены однородные порошки с различным соотношением компонентов, в которых содержание ВД составляло 50 и 70 % от общей массы. Гомогенизированные смеси засыпали в пресс-форму и прессовали с помощью гидравлического пресса Avto series Plus (Carver Inc, США). Прессование образцов проводили при температуре 170°C и давлении 5000 Па в течении 5 минут. Предварительно пресс-форму прогревали в течении 5 минут.

Характеристики композитного материала

Выбор параметров необходимых для оценки внешнего вида биокompозитов и прочностных показателей был основан на ГОСТе для ДПК [2]. В качестве контроля использовались прессованные формы исходных материалов (ПЗГБ 100 %; ВД 100 %). Физико-механические свойства биокompозитов исследовали с помощью универсальной электромеханической испытательной машины Instron 5565 (Великобритания) с использованием приспособления для трехточечного изгиба. Деградация образцов исследовалась в почвенных микрoэcosystemах. Контейнеры заполняли влажной землей, в центре которых были заложены образцы в 3-х кратной повторности (на каждую контрольную точку). Инкубировали при комнатной температуре с поддержанием влажности 50 %. Образцы извлекались каждые 2 месяца, очищались от остатков земли и после высушивания взвешивались.

Результаты

Влияние размера частиц и массового соотношения ПЗГБ и ВД на физико-механические свойства биокompозитного материала

Изготовлены биокompозитные материалы из ПЗГБ и ВД с соотношением 50/50 и 30/70, соответственно. Данный выбор соотношения основывается на литературных данных [3, 4, 6] и с точки зрения экономической целесообразности изготовления материала. Внешне образцы фракций 20, 40 и 100 мкм имеют монолитную структуру с ровными краями и блестящей поверхностью (рис. 1).

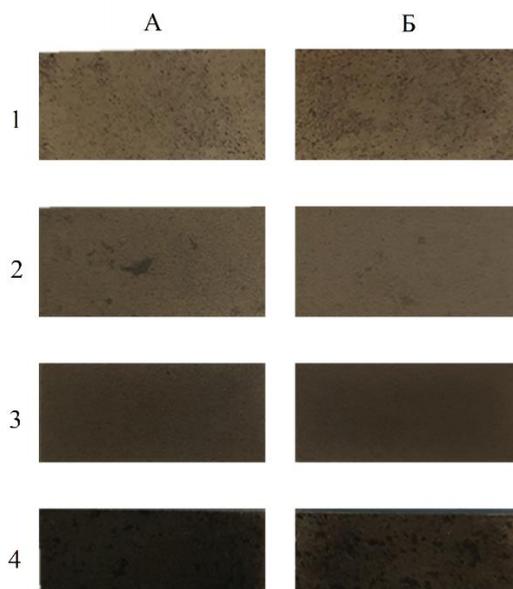


Рисунок 1. Прессованные формы биокompозитов (вид сверху).

А – П(ЗГБ)/ВД 50/50: 1 – Фракция 100; 2 - Фракция 40; 3 - Фракция 20; 4 - Фракция \leq 20;
 Б - П(ЗГБ)/ВД 30/70: 1 – Фракция 100; 2 - Фракция 40; 3 - Фракция 20; 4 - Фракция \leq 20.

Дефекты в виде вздутий, отслаиваний, растрескиваний отсутствуют. У образцов с размерным рядом частиц менее 20 мкм наблюдались не ровные края, отслаивание и растрескивание по толщине образцов. Это происходит в следствии потери армирующих свойств волокна древесины из-за не достаточной длины волокон во фракции ≤ 20 мкм. Отсюда следует, что данный размерный ряд частиц волокна древесины не подходит для изготовления биокompозитного материала методом горячего прессования.

Изготовление биокompозитного материала привело к увеличению плотности, по сравнению с контролем (рис. 2). Это объясняется тем, что волокно древесины обладает армирующими свойствами, и в сочетании с полимером образует материал с характеристиками отличными от исходных. Самую высокую плотность имеет композит П(ЗГБ)/ВД в соотношении 30/70.

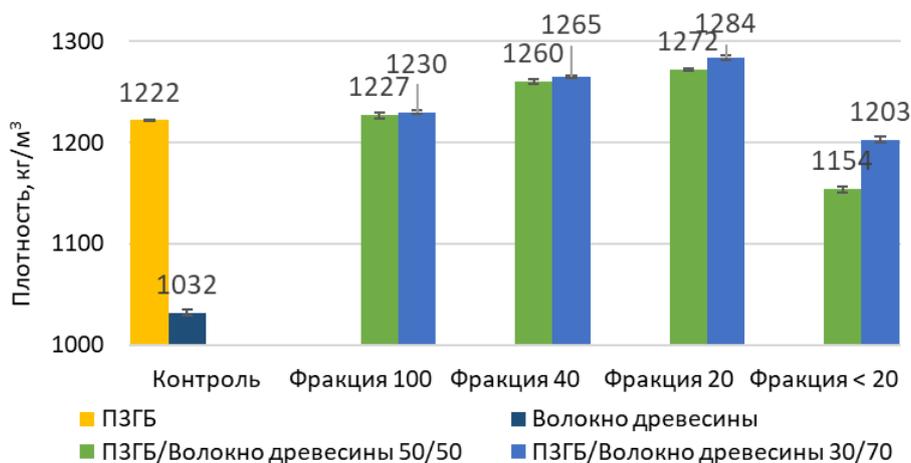


Рисунок 2. Плотность прессованных форм биокompозитов.

Физико-механические характеристики биокompозитов представлены на рис. 3, 4. Полученные результаты свидетельствуют, что уменьшение размерного ряда частиц приводит к увеличению прочности биокompозитного материала. Исключением является биокompозиты с размерным рядом частиц < 20 мкм.

Модуль Юнга (рис. 3) характеризует способность материала сопротивляться изгибу при упругой деформации.

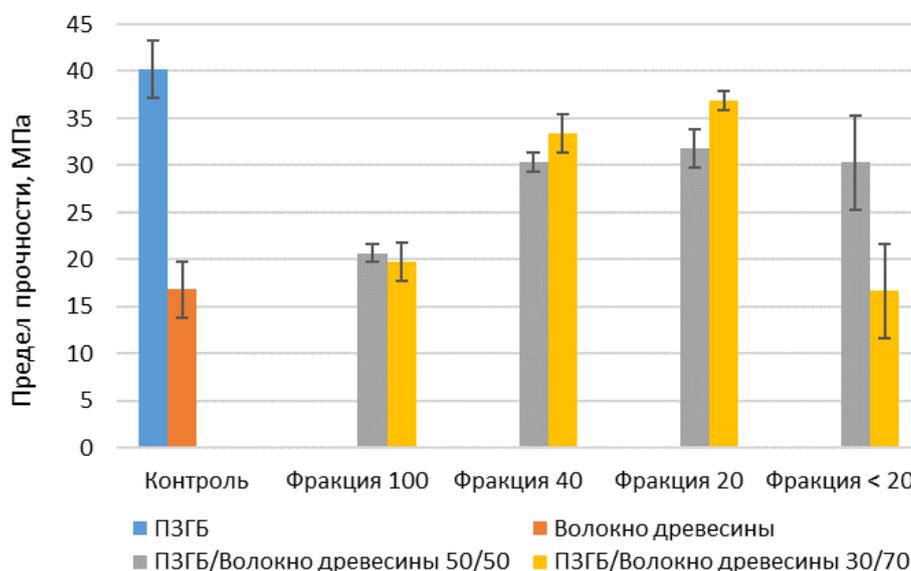


Рисунок 3. Предел прочности прессованных форм биокompозитов.

Самое большое значение модуля упругости, наблюдается у образцов биокomпозитов ПЗГБ/ВД с соотношением 30/70, соответственно, фракцией 20 мкм и составляет 3753,5 МПа. Увеличение количества ПЗГБ в биокomпозите приводит к снижению модуля Юнга. Такую же зависимость можно наблюдать по пределу прочности (рис. 4), наибольшее значение 36,9 МПа имеют биокomпозиты ПЗГБ/ВД с соотношением 30/70, соответственно и размером частиц 20 мкм. Наименьшими значениями предела прочности (16,7-20,7 МПа) обладают образцы биокomпозитов с размером частиц 100 и < 20 мкм.

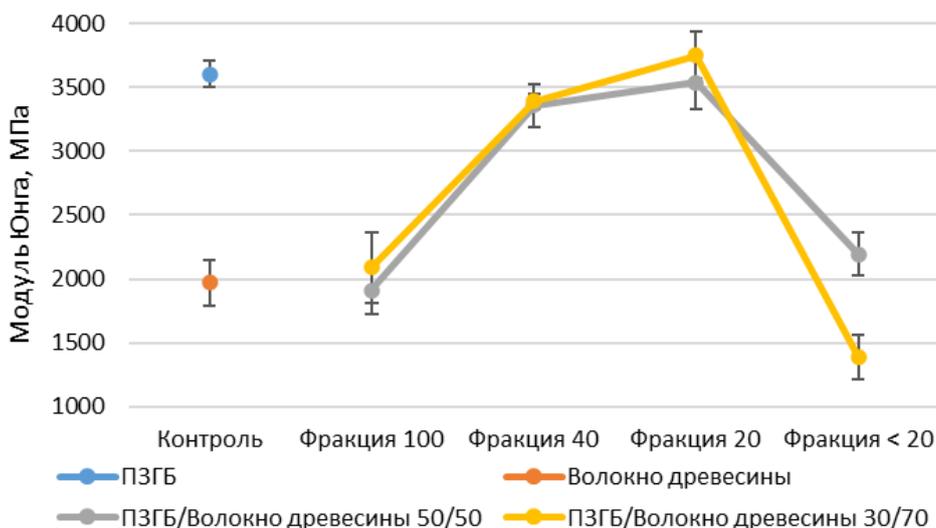


Рисунок 4. Модуль Юнга прессованных форм биокomпозитов.

Деградация биокomпозитов в почвенных микрoэкоcистемах

В почву заложили образцы биокomпозитов с соотношением ПЗГБ/ВД 30/70 и 50/50 фракцией 20 мкм. Для увеличения площади контакта и большей доступности биокomпозитов почвенным микрoорганизмам деструкторам рекомендуется предварительное измельчение изделий. Поэтому образцы были распилены на бруски размером 6*6*4 мм. В процессе биodeградации биокomпозиты подверглись разрушению, менялась их первоначальная структура. На начальном этапе происходит потемнение поверхности образцов, затем появляются неровности, поры и глубинные повреждения (рис. 5).

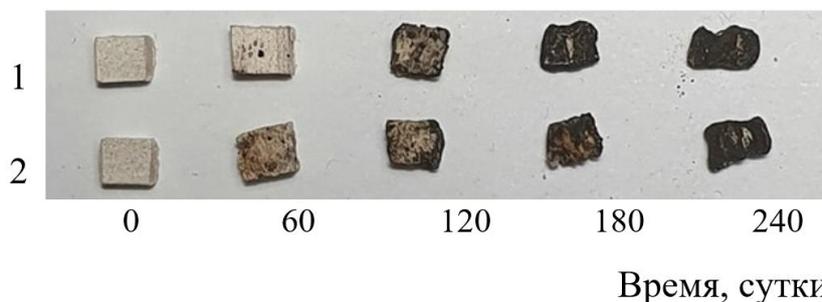


Рисунок 5. Фото образцов ПЗГБ/Волокно древесины в ходе разрушения при экспозиции в полевой почве: 1 – 50 % наполнителя; 2 – 70 % наполнителя.

Изменение массы образцов при экспонировании в почве в процессе деградации представлены на рис. 3. На 240 суток экспозиции в почвенной микрoэкоcистеме, мы наблюдаем значительные изменения по убыли массы образцов (рис. 6). Так, процент остаточной массы, для

образцов с содержанием наполнителя 50 и 70 % составил 54,7 и 56,6 %, соответственно. За период наблюдения убыль массы прессованных образцов составила от 45,3 до 43,4 %. Остаточная масса контрольных образцов составила 54,9 % для ПЗГБ и 54,8 % для волокна древесины. На основании эксперимента ожидаемое полное разложение образцов составит 1,5 года.

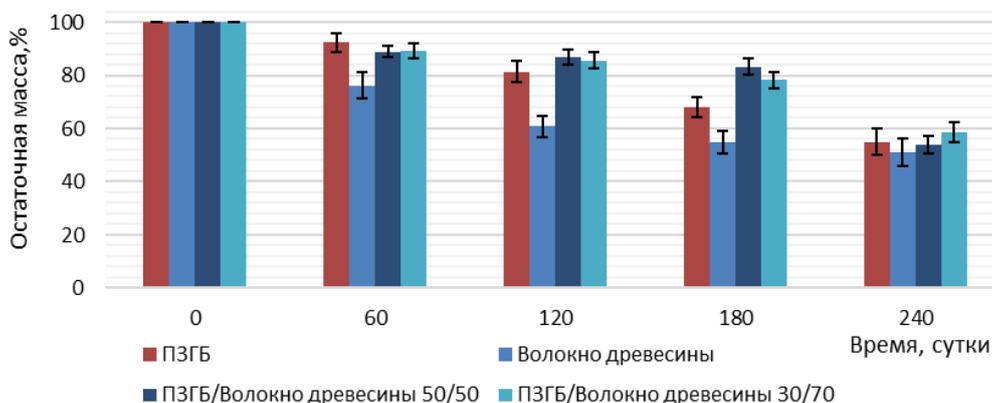


Рисунок 6. Изменение массы образцов при экспонировании в почве в ходе деградации.

Заключение

Исследовано влияние размера частиц, а также количество волокна древесины (50 и 70 % вес.) в биокомпозитных материалах на физико-механические свойства и биодegradацию в почве. Требованиям ГОСТ Р 59555-2021 по пределу прочности соответствуют биокомпозиты с размером частиц 20 и 40 мкм и содержанием древесного волокна 50 и 70%. Плотность всех представленных в работе биокомпозитов отвечает требованиям ГОСТ Р 59555-2021. В процессе естественной биодеструкции произошла убыль массы образцов от 43,4 до 45,3 % от исходных значений за 240 суток. Биоразлагаемые полигидроксиалканоаты перспективны в качестве замены традиционных пластиков для создания древесно-полимерных композитов, как с точки зрения экологической безопасности, так и с точки зрения рационального природопользования из-за использования возобновляемых ресурсов.

Библиографический список

1. Волова, Т. Г., Шишацкая Е. И. Штамм бактерий *Cupriaviduseutrophus* VKPM В-10646 – продуцент полигидроксиалканоатов и способ их получения. – 2012. Патент РФ 2439143.
2. ГОСТ Р 59555-2021. Изделия профильные из древесно-полимерного композита. Разработан "научно-инновационный центр древесно-полимерные композиты". Внесен техническим комитетом по стандартизации ТК 144 "строительные материалы и изделия". Дата введения 2021-12-01.
3. Bátori, V. Anaerobic degradation of bioplastics: A review / V. Bátori, D. Åkesson, A. Zamani, M. J. Taherzadeh // Waste Management. – 2018. Vol. 80. – P. 406–413.
4. Chan, C. M. Wood-PHA Composites: Mapping Opportunities / C. M. Chan, L. J. Vandi, S. Pratt, D. Richardson, A. Werker, B. Laycock // Polymers. – 2018. Vol. 10. – P. 1 – 15.
5. Ermolin, V. N. Structure formation of lowdensity boards from hydrodynamically activated soft wood waste / V.N. Ermolin, M. A. Bayandin, S N. Kazitsin, A. V. Namyatov // Forest J. – 2019. Vol. 371 – P. 148-157.
6. Volova, T. Degradable Polyhydroxyalkanoates of Microbial Origin as a Technical Analog of Non-Degradable Polyolefines / Journal of Siberian Federal University. Biology. – 2015. - P. 131-151.
7. Volova, T. Properties of degradable polyhydroxyalkanoates with different monomer compositions / T. Volova, E. Kiselev, I. Nemtsev et al. // Int. J. Biol. Macromol. – 2021. Vol. 182. – P. 98–114.

УДК 664, 579

ХРАНИМОСПОСОБНОСТЬ ЗЕРНОВОГО ХЛЕБА ИЗ ПОЛБЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ ЗАКВАСОК

Д.Р. Камартдинова, С.В. Китаевская, О.А. Решетник

*ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»,
Казань, Россия*

darya.kamartdinova@mail.ru

Целью настоящей работы является изучение хранимоспособности зернового хлеба из полбы, выработанного с применением штаммов молочнокислых бактерий. В работе проведена оценка антагонистической активности 8 штаммов молочнокислых бактерий *p. Lactobacillus*, выявлены наиболее перспективные штаммы для производства хлебобулочных изделий, а также изучено влияние их применения на продолжительность хранения зернового хлеба из полбы. Установлено, что введение штаммов молочнокислых бактерий в технологию зернового хлеба из полбы позволяет увеличить сроки хранения готовых изделий.

Ключевые слова: зерновой хлеб, молочнокислые бактерии, *Lactobacillus*, антагонистическая активность, продолжительность хранения.

STORABILITY OF SPELT GRAIN BREAD WITH THE USE OF SOURDOUGH STARTER

D.R. Kamartdinova, S.V. Kitaevskaya, O.A. Reshetnik

Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia

darya.kamartdinova@mail.ru

The purpose of this work is to study the storability of spelt grain bread made with the use of lactic acid bacteria strains. The antagonistic activity of 8 strains of lactic acid bacteria *Lactobacillus*, identified the most promising strains for the production of bakery products, and studied the effect of their use on the shelf life of spelt grain bread. It was found that the introduction of lactic acid bacteria strains into the technology of grain spelt bread allows to increase the shelf life of finished products.

Keywords: grain bread, lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, antagonistic activity, storage time.

В настоящее время актуальным направлением в области обеспечения здорового питания населения является разработка и производство продуктов питания, обладающих повышенной пищевой ценностью, а также способных обеспечивать потребность организма в питательных веществах. Особое внимание уделяется злаковым продуктам, которые являются основным источником углеводов, а также обогащают рацион питания растительными белками, жирами, витаминами и минеральными веществами [1,2,3].

Важную роль в питании населения имеет хлеб, так как является основным продуктом ежедневного рациона человека на протяжении всей жизни. В настоящее время перспективным направлением производства хлебобулочных изделий является выработка хлеба из целого зерна, содержащего ценные минеральные вещества [4,5].

Продолжительность хранения хлеба является одним из важных критериев качества хлебобулочных изделий. Срок годности хлеба недолгий и объясняется заражением изделий плесневыми грибами. В связи с этим целью настоящей работы является исследование влияния штаммов молочнокислых бактерий на продолжительность хранения зернового хлеба их полбы.

На первом этапе экспериментальной работы проводили оценку антагонистической активности 8 штаммов молочнокислых бактерий *p. Lactobacillus* в отношении патогенных и условно-патогенных штаммов бактерий, грибов и дрожжей: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium oxysporum*, *Candida guilliermondii*.

Антагонистическую активность штаммов молочнокислых бактерий *p. Lactobacillus* определяли измерением зон подавления роста тест-культур патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [6].

Результаты исследования антибактериального и фунгицидного действия штаммов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Антагонистическая активность штаммов молочнокислых бактерий

Штамм	Диаметр зоны ингибирования роста, мм								
	Антибактериальный спектр					Фунгицидное действие			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
<i>L. fermentum 10</i>	28±2	14±1	2±1	2±1	21±1	12±1	15±1	16±1	10±1
<i>L. acidophilus 9</i>	16±1	0	0	8±1	18±2	0	0	0	0
<i>L. casei 16</i>	20±2	12±1	0	9±1	18±2	6±1	0	8±1	0
<i>L. casei 32</i>	27±2	12±1	8±1	10±1	25±2	14±1	12±1	10±1	17±1
<i>L. casei МДП-1</i>	19±2	10±1	2±1	9±1	22±2	6±1	6±1	10±1	7±1
<i>L. plantarum 24</i>	22±1	8±1	3±1	4±1	24±2	8±1	10±1	8±1	10±1
<i>L. plantarum 71</i>	14±2	6±2	0	3±1	16±1	2±1	2±1	0±1	0±1
<i>L. plantarum 131</i>	15±2	2±2	0	5±1	19±2	6±1	6±1	4±1	2±1

В результате исследования выявлено, что все штаммы обладают антагонистической активностью в отношении *B. subtilis* и *E. coli*, а наибольшую антагонистическую активность проявляют штаммы *L. fermentum 10*, *L. casei 32*, *L. plantarum 24*, величина зоны ингибирования тест культуры которых составляет 21-25 мм и 22-28 мм соответственно. Также отмечается, что штаммы *L. fermentum 10*, *L. casei 16* и *L. casei 32* обладают антибактериальным действием в отношении *Staphylococcus aureus*.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что кроме *L. acidophilus 9*, все исследуемые штаммы обладают фунгицидным действием в отношении плесневых грибов и дрожжей. Наибольшую активность проявляют штаммы *L. fermentum 10*, *L. casei 32*, *L. plantarum 24*.

Таким образом установлено, что наибольшую антагонистическую активность в отношении нежелательных, патогенных и условно-патогенных бактерий, грибов и дрожжей проявляют штаммы *L. fermentum 10*, *L. casei 32*, *L. plantarum 24*. Следовательно данные штаммы являются перспективными для применения в технологии зернового хлеба с целью повышения микробиологической чистоты и увеличения продолжительности хранения готовых изделий.

На следующем этапе штаммы *L. fermentum* 10, *L. casei* 32, *L. plantarum* 24 вносили в рецептуру зернового хлеба из полбы и изучали продолжительность хранения готовых изделий. Готовые хлебобулочные изделия хранили упакованными в полиэтиленовые пакеты при комнатной температуре. Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов определяли в соответствии с ГОСТ 10444.15, содержание дрожжей и плесневых грибов по ГОСТ 10444.12. Результаты проведенных исследований приведены в табл. 2.

Таблица 2

Изменение микробиологических показателей зернового хлеба в процессе хранения через 72 часа хранения

Образцы	КМАФАнМ, КОЕ/г	Плесени, КОЕ/г	Дрожжи, КОЕ/г
Контроль	$6,7 \times 10^2$	менее 10	менее 10
Образец 1 (<i>L. fermentum</i> 10)	$3,9 \times 10^2$	не обнаружено	менее 10
Образец 2 (<i>L. casei</i> 32)	$3,2 \times 10^2$	не обнаружено	менее 10
Образец 3 (<i>L. plantarum</i> 24)	$4,2 \times 10^2$	не обнаружено	менее 10

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что в процессе хранения количество мезофильно аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в образцах выработанных с применением штаммов молочнокислых бактерий ниже по сравнению с контрольным образцом. Также на протяжении всего срока хранения плесневые грибы не были обнаружены.

Также в результате проведенных исследований было выявлено, что у контрольного образца признаки плесневения наблюдаются уже через 72 часа от начала хранения, тогда как у образцов, выработанных с применением штаммов молочнокислых бактерий, только спустя 120 часов. Данные представлены в таблице 3.

Таблица 3

Признаки плесневения у зернового хлеба в процессе хранения

Образец	Признаки плесневения						
	Продолжительность хранения, ч						
	0	24	48	72	98	120	144
Контроль	-	-	-	±	+	+	+
Образец 1 (<i>L. fermentum</i> 10)	-	-	-	-	-	±	+
Образец 2 (<i>L. casei</i> 32)	-	-	-	-	-	±	+
Образец 3 (<i>L. plantarum</i> 24)	-	-	-	-	-	±	+

Таким образом, установлено, что применение при производстве зернового хлеба штаммов молочнокислых бактерий, обладающих антагонистической активностью, способствует замедлению роста и развития неблагоприятной микрофлоры. В результате готовые изделия обладают более низкой микробиологической обсемененностью, а продолжительность их хранения увеличивается на 2 суток.

Библиографический список

1. Комарова, О.Н. Продукты на зерновой основе в питании взрослого и ребенка: что нового? / О.Н. Комарова, А.И. Хавкин // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2017. – № 6. – С. 133–140.
2. Jones, J. A. Grain-based foods and health / J.A. Jones // Cereal Foods World. – 2006. – № 51. – P. 108–113.

3. Larsson, S. C. Whole grain consumption and risk of colorectal cancer: A population-based cohort of 60000 women / S. C. Larsson, E. Giovannucci, L. Bergkvist, A. Wolk // *British Journal of Cancer*. – 2005. – № 92. – P. 1803–1807.
4. Пономарева, Е.И. Хлеб из биоактивированного зерна пшеницы повышенной пищевой ценности / Е.И. Пономарева, Н.Н. Алехина, И.А. Бакаева // *Вопросы питания*. – 2016. – Т. 85. – № 2. – 116–121.
5. Пащенко, Л.П., Жаркова И.М. Технология хлебопекарного производства: Учебник. – СПб.: Издательство «Лань». – 2014. – 672 с.
6. Яруллина, Д.Р. Бактерии рода *Lactobacillus*: общая характеристика и методы работы с ними: Учеб.-метод.пособие / Д.Р. Яруллина, Р.Ф. Фахруллин. – Казань: Казанский университет. – 2014. – 51 с.

УДК 579.64

ПРОДУКЦИЯ ИНДОЛИЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ ЭНДОФИТНЫМ ШТАММОМ *BACILLUS WIEDMANNII* EJ1

Н.С. Карамова¹, А.А. Туама^{1,2}, З.Р. Сабирова¹, Ю.М. Залилова¹, З. Сташевски³

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Университет Диялы, Ирак

³ТамНИИСХ – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

Эндофитные микроорганизмы являются перспективной основой биоудобрений и биопрепаратов для повышения урожайности культурных растений вследствие их способности синтезировать множество биологически активных веществ, играющих ключевую роль в регуляции жизненно важных процессов в организме своих хозяев. В настоящей работе проведена оценка способности эндофитного штамма *Bacillus wiedmannii* EJ1, выделенного из листьев картофеля сорта Регги, продуцировать фитогормон индолил-3-уксусную кислоту (ИУК). Установлено, что исследуемый штамм синтезирует ИУК, причем добавление триптофана в среду культивирования приводит к повышению темпов накопления фитогормона в культуральной жидкости. Максимальная концентрация ИУК (14.6 мкг/мл) обнаружена на пятый день культивирования штамма *B. wiedmannii* EJ1 в среде М9 с добавлением триптофана.

Ключевые слова: фитогормоны, индолил-3-уксусная кислота, стимуляция роста растений, эндофитные бактерии, картофель

Введение. Растениеводство представляет собой важнейшую отрасль сельского хозяйства, которая играет существенную роль в обеспечении продовольственной безопасности населения и является источником сырья для многих промышленных производств. Масштабное применение химических удобрений и средств защиты является общепринятым подходом для контроля многочисленных вредителей, фитопатогенов и стимуляции роста культурных растений во всем мире. Однако серьезный ущерб, наносимый окружающей среде, а также ухудшение качества продуктов сельскохозяйственной продукции вследствие ее химизации, диктует необходимость глобального изменения вектора развития растениеводства [10, 11].

Современные тенденции в развитии сельского хозяйства направлены на использование природных механизмов и новых биотехнологий для повышения урожайности культурных растений. Огромным потенциалом стимулирования роста, защиты от биотического и абиотического стресса и повышения урожайности растений обладают эндофитные микроорганизмы. Эндофиты, признанные как важнейшая, полезная часть микробиоты растений, играют существенную роль в обеспечении своих хозяев питательными веществами, синтезе фитогормонов, а также различных биологически активных соединений, способствующих защите растений от многочисленных возбудителей инфекционных заболеваний [1, 2]. Фитогормоны, в частности ауксины, относятся к числу наиболее важных регуляторов жизнедеятельности растений. Например, индолил-3-уксусная кислота (ИУК) участвует в регуляции процессов роста и деления клеток, дифференцировки тканей, фотосинтеза и реакции на свет и гравитацию [4, 13].

Целью данного исследования явилась оценка способности эндофитного штамма *Bacillus wiedmannii* EJ1 к продукции фитогормона индолил-3-уксусной кислоты.

Материалы и методы. В работе использован эндофитный штамм *Bacillus wiedmannii* EJ1, выделенный из листьев картофеля сорта Регги [8].

Для получения инокулята культуру бактерий инкубировали 18 ч среде LB при температуре 30°C. При проведении эксперимента использовали: 1) среду M9 с добавлением 0.4% глюкозы в качестве источника углерода; 2) среда M9 добавлением 0.4% глюкозы в качестве источника углерода и триптофана (225 мкг/мл). В среды культивирования вносили инокулят (1% от общего объема среды) и инкубировали при 30°C с аэрацией в течение 7 суток. Каждые 24 часа отбирались пробы для определения ИУК в культуральной жидкости. Для осаждения клеток бактериальную суспензию центрифугированием при 8000 об/мин. Концентрацию ИУК в культуральной жидкости определяли по методу Сальковского [5]. К 100 мкл супернатанта добавляли 400 мкл реагента Сальковского и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Далее измеряли оптическую плотность реакционной смеси на спектрофотометре (BioRad, США) при $\lambda=530$ нм. Калибровочная кривая была построена с использованием растворов ИУК разных концентраций (5–40 мкг/мл). Количественное содержание индолпроизводных, включая ИУК, в культуральной жидкости определяли по калибровочному графику, построенного на основе измерения оптической плотности стандартных растворов с разной концентрацией ИУК ($y = 0.028x + 0.036$, $R^2 = 0.9716$). Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартных математических методов в программе Microsoft Excel. Приведенные в работе данные представляют собой среднее значение трех независимых экспериментов $\pm \sigma$ (среднеквадратичное отклонение).

Результаты и обсуждение. Многие виды ризосферных и эндофитных бактерий способны продуцировать фитогормон ИУК, используя в качестве предшественника аминокислоту L- триптофан. В то же время, для некоторых микроорганизмов известен триптофан-независимый механизм синтеза ИУК из индола, антралиловой кислоты, индолил-3-глицерофосфата [7]. Из результатов, представленных в табл. 1 видно, что при росте эндофитного штамма *B. wiedmannii* EJ1 в среде M9 с триптофаном происходит сравнительно быстрое накопление ИУК в культуральной жидкости. Максимум содержания ИУК приходится на 5 день и составляет 14.6 мкг/мл. При культивировании *B. wiedmannii* EJ1 в среде без триптофана темпы синтеза ИУК были ниже, максимальная продукция данного фитогормона обнаруживалась на 7 день и составила 12.4 мкг/мл.

Таблица 1

Концентрация ИУК, продуцируемой эндофитным штаммом *Bacillus wiedmannii* EJ1

Варианты	Содержание ИУК, мкг/мл						
	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч	120 ч	144 ч	168ч
Без триптофана	0.4±0.02	0.8±0.06	0.9±0.05	3.1±0.1	5.2±0.2	8.1±0.7	12.4±1.2
С триптофаном	0.7±0.05	2.1±0.1	3.7±0.2	9.9±0.7	14.6±0.9	12.5±1.1	11.2±0.8

Очевидно, что добавление триптофана в среду культивирования, стимулирует синтез ИУК бактериями. Сравнение временных параметров и максимальных значений продукции ИУК в обоих вариантах эксперимента позволяет предположить, что при росте в среде без триптофана бактериям необходимо время для синтеза самой аминокислоты как предшественника ИУК. В то же время, мы не исключаем возможность наличия у нашего штамма альтернативного пути синтеза ИУК в условиях отсутствия экзогенного триптофана в среде.

Способность к продукции ИУК показана для многих видов бактерий и микромицетов, в особенности для ризосферных и эндофитных микроорганизмов. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о значительной роли ауксина в регуляции взаимоотношений микробиоты с растениями-хозяевами. Кроме того, на сегодняшний день имеется немало сведений, доказывающих участие ИУК не только в стимуляции роста

растений, но также в механизмах предотвращения неблагоприятных последствий воздействия разных видов стресса [3, 12]. В научной литературе представлено несколько работ, посвященных оценке способности продуцировать ИУК эндофитами растений картофеля. В работе Гросси с соавторами показано, что эндофитный штамм *Methylobacterium* sp 2A, выделенный из корней картофеля, синтезировал ИУК, что стимулировало развитию корневой системы растений [6]. Также Кумар с соавторами [9] продемонстрировали ростостимулирующий эффект эндофитных бактерий на растения картофеля сорта Kufri bahar, ассоциированный со способностью к синтезу ИУК.

Заключение. Создание биопрепаратов на основе эндофитных микроорганизмов является перспективным направлением сельскохозяйственной биотехнологии, способствующим как совершенствованию устойчивого ведения сельского хозяйства, так и сохранению природного баланса в агробиоценозах. В настоящей работе установлено, что эндофитный штамм *Bacillus wiedmannii* EJ1, ранее выделенный нами из листьев картофеля сорта Регги, способен продуцировать один из важнейших фитогормонов индолил-3-уксусную кислоту. Дальнейшее изучение регуляции биосинтеза, а также вовлеченности бактериального ауксина в процессы, определяющие устойчивость растений картофеля к стрессовым факторам, внесет вклад в создание передовых, экологически чистых способов возделывания данной экономически важной культуры.

Благодарности. Статья подготовлена в рамках реализации программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (Приоритет-2030), при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по госзаданию ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН.

Библиографический список

1. Васильева Е.Н., Ахтемова Г.А., Жуков В.А., Тихонович И.А. Эндофитные микроорганизмы в фундаментальных исследованиях и сельском хозяйстве // Экологическая Генетика. – 2019. – Т. 17, №. 1. – С. 19-32.
2. Ali A., Tabbasum I., Azeem H., Ölmez F., Devenci G., Khalid B. and Mehtab M. Bacterial endophytes, a resilient way toward sustainable agriculture: provide plant growth promotion and biocontrol of plant pathogens // Journal of Global Innovations in Agricultural Sciences. – 2023. – V.11. – P. 153-174.
3. Egamberdieva D., Eshboev F., Shukurov O., Alaylar B., Arora N.K. Bacterial Bioprotectants: Biocontrol Traits and Induced Resistance to Phytopathogens // Microbiol. Res. – 2023. – V. 14. –P. 689-703.
4. Fadji A.E., Babalola O.O. Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects // Front Bioeng Biotechnol. – 2020. –V. 8. –P. 467-487.
5. Gordon S.A., Weber R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic // Plant Physiol. – 1951. –V. 26. – P. 192-195.
6. Grossi C.E.M., Fantino E., Serral F., Zawoznik M.S., Fernandez Do, Porto D.A., Ulloa R.M. (2020) *Methylobacterium* sp. 2A is a plant growth-promoting rhizobacteria that has the potential to improve potato crop yield under adverse conditions // Front Plant Sci – V. 11 – e71.
7. Jahn L., Hofmann U., & Ludwig-Müller J. (2021). Indole-3-acetic acid is synthesized by the endophyte cyanodermella asteris via a tryptophan-dependent and-independent way and mediates the interaction with a non-host plant //International Journal of Molecular Sciences – 2021. – V. 22(5). – P. 1-19.
8. Karamova N.S., Tuama A., Minnullina L.F., Pudova D.S., Shagimardanova E.I., Mardanova A.M. and Stasevski Z. *Bacillus wiedmannii* strain EJ1, whole genome shotgun sequencing project. – 2022. – https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NZ_JANDGI000000000.1.

9. Kumar S., Chaudhary D., Rashmi, Jangra R., Kumari A., Kumar R. Exploring phyllosphere bacteria for growth promotion and yield of potato (*Solanum tuberosum* L.) // Int J Curr Microbiol Appl Sci. – 2018. – V. 7. – P. 1065-1071.
10. Tabbasum I., Amjad A., Urwa, S., Imam B., Bareerah K., Nadia I., and Naseer M. U. Role of endophytic fungal species in plant growth promotion and in sustainable agricultural productions: A review //The Journal of Microbiology and Molecular Genetics. – 2022. – V.1. – P. 1-21.
11. Velten S., Leventon J., Jager N, and Newig J. What Is Sustainable Agriculture? A Systematic Review. // Sustainability – 2015. – V. 7 – P. 7833-7865.
12. Xavier M.L., Bosch A.R., Karp S.G., Soccol C.R. Endophytic bacteria: a possible path towards a sustainable agriculture // Biotechnology Research and Innovation. – 2021. – V. 5. – e. 2021008.
13. Zhao Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development // Annu. Rev. Plant Biol. – 2010. –V. 61. – P. 49-64.

УДК 579.66

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ IN SILICO ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОМЫШЛЕННЫХ БАКТЕРИЙ *XANTHOMONAS CAMPESTRIS*, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ БИОСИНТЕЗА КСАНТАНА

А.М.Киреева¹, А.Е.Барашков¹, И.А.Николаев¹, Н.Т.Жилинская^{1,2}

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,

²Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н.Петрова
Санкт-Петербург, Россия

Внеклеточный гетерополисахарид ксантан, синтезируемый бактериями рода *Xanthomonas*, широко используется в качестве загустителя и стабилизатора в пищевой, косметической и фармацевтической отраслях, в нефтяной промышленности. Изучение in silico бактериальных ферментов, принимающих участие в производстве целевого биотехнологического продукта, актуальным направлением исследований. Решением данной задачи является использование специализированных компьютерных программ в сети интернет, таких как база данных последовательностей белков UniProt, комплексная информационная система по ферментам BRENDA. Анализ баз данных показал, что фермент УДФ-глюкоза:ундекапренил-фосфат глюкозо-1-фосфаттрансфераза инициирует биосинтез ксантана бактериями *Xanthomonas campestris*. Подобраны условия культивирования в биореакторе Biosan бактерий *Xanthomonas campestris*, предоставленных из Ведомственной коллекции культур полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии. Можно предположить, что возрастание активности фермента инициации биосинтеза ксантана бактериями *Xanthomonas campestris* начнется после 65 часов с момента начала культивирования бактерий на дрожжевой питательной среде, при температуре 30°C, после перехода кривой роста микроорганизмов в стационарную фазу.

Ключевые слова: ксантан, *Xanthomonas campestris*, фермент УДФ-глюкоза:ундекапренил-фосфат глюкозо-1-фосфаттрансфераза, культивирование

Введение

В настоящее время в промышленности широко используются культурные штаммы микроорганизмы. Это объясняется тем, что благодаря большому разнообразию синтезируемых ферментов микроорганизмы более эффективны и экономичны, чем химические реагенты. Из разнообразия культурных штаммов микроорганизмов выделяют микроорганизмы, синтезирующие целевые полисахариды. Полисахариды микробного происхождения обладают нетоксичными, биосовместимыми, биоразлагаемыми и биоадгезивными свойствами [6, с.27103].

Внеклеточный гетерополисахарид ксантан синтезируется бактериями рода *Xanthomonas*. Бактерии рода *Xanthomonas* относятся к семейству *Pseudomonaceae*, типу *Proteobacteria*, классу *Alphaproteobacteria*. Род *Xanthomonas* включает такие виды, как *X. campestris*, *X. arboricola*, *X. axonopodis*, *X. fragaria*, *X. gummisudans*, *X. juglandis*, *X. phaseoli*, *X. vasculorum* et al. В промышленном производстве используется бактерия *Xanthomonas campestris*.

Благодаря способности сгущать водные растворы, служить в качестве диспергирующего агента, стабилизировать эмульсии и суспензии ксантан нашел применение в производстве фармацевтических, косметических и пищевых продуктов, а также текстильных и керамических изделий. Ксантановая камедь была одобрена FDA (Управление по контролю за продуктами и лекарствами) для применения в пищевых продуктах и фармацевтической продукции в 1968 году [5, с.95]. С тех пор интерес к этому биополимеру только растет, поскольку его характеристики очень привлекательны для промышленности по сравнению с другими

материалами, представленными на рынке. Также ксантан может быть использован в качестве эмульгирующего и стабилизирующего агента в таких продуктах, как лосьоны, шампуни, дезодоранты, кремы для лица, тела, увлажнители для лица и т.д. [4, с.2]. Ксантан также может использоваться как заменитель агара в средах для культур тканей растений и культур микроорганизмов, в фармацевтической промышленности для получения лекарственных форм препаратов, вакцин. Проводятся исследования по применению микросфер и гидрогелей на основе ксантановой камеди, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты омега-3, в таргетной терапии при онкологических заболеваниях, в частности, для их целенаправленного высвобождения в колоректальный канал при раке толстой кишки [7, с.432].

С целью расширения спектра использования ксантан подвергают модификации. Модифицированный продукт может найти широкое применение для очистки сточных вод от металлов (особенно тяжелых). Он может быть использован для адсорбции органических красителей и тяжелых металлов [3, с.1134]. Также на данный момент ксантановая камедь используется в производстве безглютенового хлеба для придания воздушной текстуры.

В настоящее время в Российской Федерации ксантановая камедь в промышленных масштабах не производится. Были неоднократные попытки создания производств в разных регионах страны [1, с.95]. Основной проблемой, которая возникает при промышленном синтезе ксантана, является то, что продуцент имеет повышенную требовательность к составу питательных сред, в связи с чем повышается стоимость итогового продукта.

Большую роль в процессе биосинтеза ксантана играют соотношение углерода и азота в питательной среде, а также сам источник азота [2, с.105]. В состав питательной среды для производства ксантана обязательно должны входить источники углерода, азота, фосфора, микроэлементы и биологически активные соединения. Среды для культивирования бактерий *Xanthomonas campestris*, удовлетворяющие этим требованиям, отличаются друг от друга происхождением и сочетанием компонентов, входящих в их состав. В качестве источника углерода могут быть использованы: глюкоза, фруктоза, мальтоза, сахароза, галактоза, сахар-сырец, крахмал, меласса [2, с.107]. Для получения ксантана чаще всего используются среды сложного состава, включающие, в основном, 2–4 % глюкозы и сахарозы, 0,05–0,1 % источников азота, таких как дрожжевой экстракт, пептон, нитрат аммония, имеющие достаточно высокую стоимость.

Бактерии рода *Xanthomonas* не растут на средах, содержащих сорбит, инозитол, целлобиозу, адинитол, глицерин, дульцитол и маннит. Оптимальная температура для роста 30 °С. Исследования показали, что питательные среды, содержащие сахарозу, показывали максимальный прирост биомассы. Следующими по эффективности являются мальтоза, лактоза, декстроза и фруктоза (в порядке убывания). Изучение *in silico* бактериальных ферментов, принимающих участие в производстве целевого биотехнологического продукта, является актуальным направлением исследований. Решением данной задачи является использование баз данных и программ в сети интернет. Комплексная информационная система по ферментам BRENDA позволяет получить информацию об организме, из которого был выделен фермент, его номенклатуре, катализируемых реакциях, его каталитической активности, активаторах и ингибиторах. База данных последовательностей белков UniProt содержит информацию о нуклеотидной последовательности белка, его 3D-структуре, массе, местоположении и роли важных доменов и сайтов. Эти программы взаимосвязаны и имеют перекрестные ссылки.

Цель исследования - изучение *in silico* ферментного состава бактерий *Xanthomonas campestris*, инициирующих биосинтеза ксантана, оценка влияния времени и температуры культивирования на активность роста бактерий.

Материалы и методы исследований

Для анализа состава белков и ферментативной активности *Xanthomonas campestris* использовались следующие on-line программы: информационная система по ферментам Brenda, база данных последовательностей белков UniProt.

Для культивирования бактерий *Xanthomonas campestris* приготовили дрожжевую питательную среду следующего состава: сахароза - 10 г/л; дрожжевой экстракт - 2 г/л; CaCO₃ - 3 г/л. В исследовании использован штамм бактерии *Xanthomonas campestris* из Ведомственной коллекции культур полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения Россельхозакадемии (ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, г.Пушкин, Санкт-Петербург).

Культивирование бактерий *Xanthomonas campestris* проводили в персональном биореакторе Biosan RTS-1. Принцип работы биореактора основан на неинвазивном, механически управляемом перемешивании, во время которого клеточная суспензия смешивается вращением биореактора вокруг своей оси с изменением направления вращения, что приводит к перемешиванию и оксигенации для аэробного культивирования. В сочетании с ближней ИК оптической системой можно регистрировать кинетику роста клеток неинвазивно в реальном времени. Процесс культивирования осуществляли на дрожжевой среде глубинным способом при температуре 30 °С и скорости перемешивания 60 об/мин. Накопление биомассы культуры фиксировали по приросту оптической плотности культуральной среды с интервалом в каждые 30 мин при длине волны 850 нм.

Результаты исследований и их обсуждение

Изучение базы данных Uni Prot показало, что в белковый состав клеток *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* входит, наряду с другими ферментами, фермент УДФ-глюкоза:ундекапренил-фосфат глюкозо-1-фосфаттрансфераза (UDP-glucose:undecaprenyl-phosphate glucose-1-phosphate transferase), который является иницирующим ферментом синтеза экзополисахарида ксантан (рис.1). Этот фермент проявляет каталитическую активность к следующим субстратам: ди-транс, окта-цис-ундекапренилфосфат; УДФ- α -D-глюкоза; α -D-глюкозилди-транс, окта-цис-ундекапренилдифосфат; УМФ. Фермент расположен на внутренней клеточной мембране бактерии. Номенклатурный номер (ЕС) 2.7.8.31.

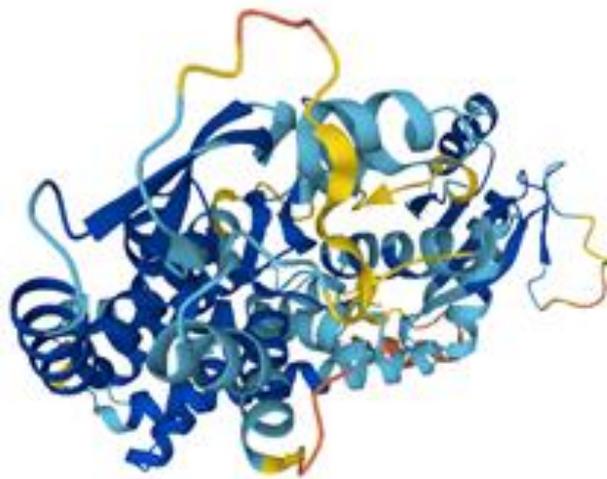


Рисунок 1 — Структура УДФ-глюкоза:ундекапренил-фосфат глюкозо-1-фосфаттрансферазы [Uni Prot, 2024]

Механизм инициации синтеза ксантана состоит в следующих этапах. Фермент УДФ-глюкоза:ундекапренил-фосфат глюкозо-1-фосфаттрансфераза (2.7.8.31) является иницирующим ферментом для синтеза экзополисахарида ксантана (рисунок 2). Катализирует перенос молекулы глюкозо-1-фосфат из UDP-Glc на липид-носитель ундекапренилфосфат (C55-P) с образованием фосфоангидридной связи, приводящей к глюкозил-пирофосфорил-ундекапренолу (Glc-PP-C55). Схема биосинтеза ксантана представлена на рисунке 2:

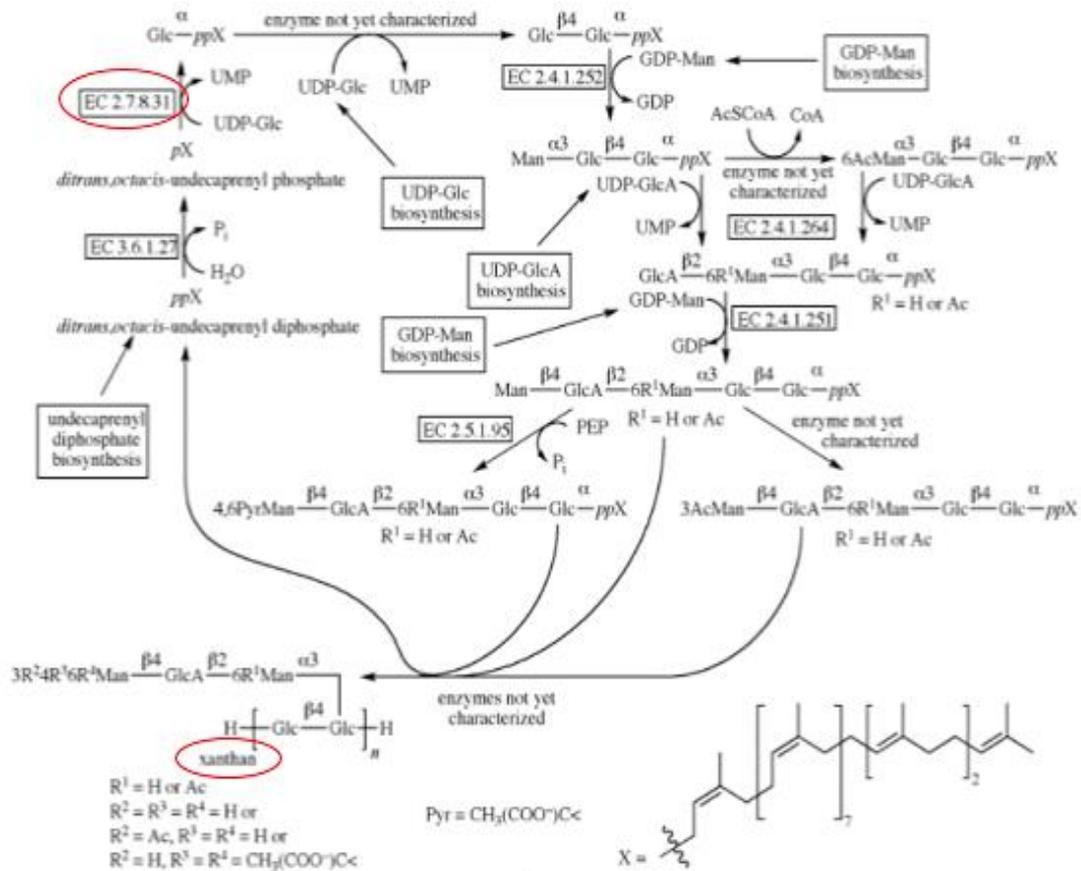


Рисунок 2. Схема биосинтеза ксантана [Brenda, 2024]. EC 2.7.8.31 - номенклатурный номер фермента, УДФ-глюкоза:ундекапренил-фосфат глюкозо-1-фосфаттрансфераза; xanthan – ксантан

Для прогнозирования условий активирования ферментативной активности бактерий *Xanthomonas campestris* проведено культивирование штамма на дрожжевой среде, при температуре 30°C, в биореакторе Biosan RTS-1 (рис. 3). Увеличение оптической плотности суспензии бактерий показало, что стационарная фаза в ходе культивирования *Xanthomonas campestris* на дрожжевой среде наступает на 65 час культивирования.

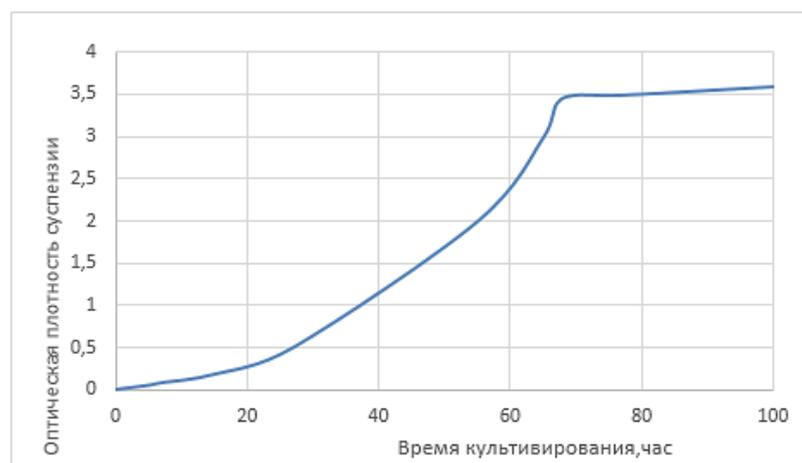


Рисунок 3. Кривая роста бактерий *Xanthomonas campestris*

Заключение

Изучение компьютерных баз данных Brenda и Uni Prot показало, что для инициации биосинтеза ксантана бактерии *Xanthomonas campestris* используют мембранный фермент УДФ-глюкоза:ундекапренил-фосфат глюкозо-1-фосфаттрансферазу. Можно предположить, что возрастание активности фермента инициации биосинтеза ксантана бактериями *Xanthomonas campestris* начнется после 65 часов с момента начала культивирования бактерий на дрожжевой питательной среде, используемой в данном эксперименте, при температуре 30°C, после перехода кривой роста микроорганизмов в стационарную фазу.

Библиографический список

1. Осоковская И.И. Синтез и свойства модифицированной ксантановой камеди / И.И. Осоковская, А.М. Бородина, А.В. Курзин [и др.] // Химия растительного сырья. – 2021. – № 4. – С. 95-104.
2. Хисаметдинов М.Р. Влияние состава питательной среды на рост культуры *Xanthomonas campestris* и синтез экзополисахарида ксантана / М.Р. Хисаметдинов, В.С. Гамаюрова, Р.Р. Сагдеева [и др.] // Вестник Казанского технологического университета. – 2009. – № 2. – С. 104-110.
3. Alharthi F.A., Alshammari R.H., Hasan I. Synthesis of Xanthan Gum Anchored α -Fe₂O₃ Bionanocomposite Material for Remediation of Pb (II) Contaminated Aquatic System // Polymers. – 2023. – Vol. 15. – № 5. – P. 1134.
4. Furtado I.F. Xanthan gum: applications, challenges, and advantages of this asset of biotechnological origin / I.F. Furtado, E.B. Sydney, S.A. Rodrigues et al. // Biotechnology Research and Innovation Journal. – 2022. – Vol. 6, № 1. – P. 1-10.
5. Jindal N., Khattar J.S. Microbial polysaccharides in food industry // Biopolymers for food design. – Academic Press, 2018. – P. 95-123.
6. Patel J. Xanthan gum derivatives: Review of synthesis, properties and diverse applications / J. Patel, B. Maji, N.S.H.N. Moorthy et al. // RSC advances. – 2020. – Vol. 10, № 45. – P. 27103-27136.
7. Trombino Sonia, Serinib Simona, Cassano Roberta, Calviello Gabriella. Xanthan gum-based materials for omega-3 PUFA delivery: Preparation, characterization and antineoplastic activity evaluation // Carbohydrate Polymers, Volume 208, 2019, Pages 431-440.

УДК 633.63:631.52

ИНТЕГРАЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС *BETA VULGARIS L.*

*Е.О. Колесникова**, *Е.И. Донских*, *Р.В. Бердников*
Селекционно-генетический центр ООО «СоюзСемСвекла»
пос. ВНИИСС, Рамонский район, Воронежская область, Россия

INTEGRATION OF BIOTECHNOLOGY INTO THE BREEDING PROCESS OF *BETA VULGARIS L.*

E.O. Kolesnikova, *E.I. Donskikh*, *R.V. Berdnikov*
Breeding and Genetic Center “UnionSeedsBeet”, Ltd.,
VNISS, Ramonsky district, Voronezh region, Russia

В современных реалиях обновленная Стратегия научно-технологического развития Российской Федерации предполагает формирование и реализацию собственного пути развития, который направлен на обеспечение суверенитета страны. Перед сельскохозяйственным производством существует необходимость перестроения деятельности с целью ее интенсификации, так как от возможности обеспечения населения в том числе и продуктами питания зависит стабильность развития государства. На помощь традиционным методам селекции пришли биотехнологии, которые имеют своей целью повышение продуктивности растений, определение и улучшение ценных характеристик, создание новых и сохранение имеющихся генетических ресурсов, размножение идентичного родительским формам ценного исходного материала, диагностику заболеваний. Ученые-биотехнологи так же занимаются получением растений, устойчивых к неблагоприятным факторам среды, болезням и вредителям, созданием трансгенных и генетически отредактированных растений, обладающих новыми ценными признаками. Именно поэтому на сегодняшний день использование биотехнологических приемов является особенно актуальным.

Для снижения зависимости страны от импорта семян такой важной сельскохозяйственной культуры как сахарная свекла, в 2017 году в Воронежской области был создан Селекционно-генетический центр «СоюзСемСвекла», основной задачей которого стало создание полного цикла производства отечественных семян, получение качественно новых, высокопродуктивных, устойчивых к заболеваниям, обладающих выравненностью по основным биологическим и морфологическим признакам гибридов. Сочетание биотехнологических достижений и традиционных методов селекции является ключом к достижению поставленных целей по достижению полной независимости страны в области сельского хозяйства.

Beta vulgaris L. - перекрестноопыляемая культура с двухлетним циклом развития. Поэтому в целях ускорения селекционного процесса крайне важно использование биотехнологических методов, которые позволяют увеличить количество и качество получаемого селекционного материала. Данные методы также позволяют проводить работы в течение всего года, что может значительно сократить сроки производства чистых линий, новых гибридов и семян.

Основными направлениями биотехнологических работ в ООО «СоюзСемСвекла» являются:

- анализ ploидности растений методом проточной цитометрии;
- молекулярно-генетическое изучение образцов для выявления определенных признаков на генетическом уровне;

- цитологический анализ качества пыльцевых зерен;
- получение гаплоидных, гомозиготных форм - выравненных чистых линий;
- микрклональное размножение растений в культуре тканей, массовое получение выравненных линий и сохранение ценных генотипов *in vitro* (рис. 1).



Рисунок 1. Микрклоны сахарной свеклы в лаборатории ООО «СоюзСемСвекла»

Главной целью работы предприятия является создание гетерозисных гибридов сахарной свеклы F1 на основе подбора и скрещивания ценных родительских линий. В ходе селекционно-биотехнологического процесса осуществляется строгий контроль растений по фенотипическим и генетическим признакам, которые определяют качество будущих гибридов. Для осуществления молекулярно-генетического анализа мы получаем растительную ДНК из листьев сахарной свеклы при помощи автоматизированных станций. Затем проводим полимеразную цепную реакцию с молекулярными маркерами, позволяющими определить тип ядра и цитоплазмы [1, 2]. При проведении ПЦР в режиме реального времени устанавливаем склонность растений к цветению в первый год жизни и устойчивость к основным заболеваниям, влияющим на продуктивность. При этом используются маркерные системы, созданные для выявления однонуклеотидных полиморфизмов в генах, отвечающих за проявление признаков [3]. Полученные данные позволяют отобрать ценный растительный материал, который используется для создания генетической коллекции в дальнейшем селекционном процессе.

В лаборатории так же используются микроскопические методы для диагностики качества пыльцевых зерен у растений сахарной свеклы. Данный анализ проводится в целях выявления наиболее перспективных фертильных образцов или подтверждения стерильности. Для получения микропрепарата производится окрашивание пыльников изолированных бутонов ацетокарминовым методом. Цитоплазма фертильных пыльцевых зерен при окрашивании имеет ярко-розовый цвет. У стерильных образцов наблюдается полное отсутствие пыльцевых зерен, либо незначительное количество пыльцевых зерен с прозрачной цитоплазмой, слабо окрашенных или деформированных (рис. 2).

Ускорение селекции происходит также за счет сокращения времени получения чистых линий на основе гаплоидов *in vitro*. Создание таким образом полностью гомозиготного материала происходит в течение 2–4 лет. В то время, как классические методы при селекции на гетерозис у перекрестноопыляющихся культур позволяют достичь гомозиготности после 6–7 лет инбридинга. Поскольку сахарная свекла имеет 2-летний цикл развития, то данный процесс длится в среднем 12 лет. [4].

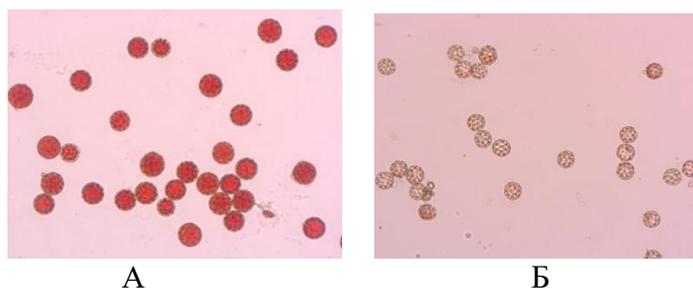


Рисунок 2. Препараты пыльцы с фертильными (А) и стерильными пыльцевыми зёрнами (Б) растений сахарной свёклы

При создании гомозиготных линий через получение гаплоидов *in vitro*, а также при культивировании растений *in vitro* и *in situ* особо важен анализ количества ДНК в ядрах клеток, который дает информацию о ploидности организма и представляет большую ценность для потенциального увеличения урожайности. Определение набора хромосом проводится методом проточной цитометрии, позволяющей сравнивать растения с разным размером генома и определять абсолютное содержание ядерной ДНК (рис. 3).



Рисунок 3. Цитометрический анализ ploидности растений *Beta vulgaris*

Созданию гомозиготных форм и чистых линий *in vitro* предшествует получение растений с одинарным набором хромосом. Сахарная свекла трудно культивируется в искусственных условиях и не способна к андрогенезу – развитию из пыльников или микроспор. Поэтому гиногенез - получение гаплоидных форм путем культивирования неопыленных семязачатков на искусственной питательной среде, является единственным возможным способом развития гаплоидных растений данной культуры [5]. Данный метод активно используется в отделе биотехнологии в целях получения гаплоидов сахарной свеклы [4]. Растительные гормоны, содержащиеся в питательной среде, индуцируют гиногенез в клетках зародышевых мешков. Выход гаплоидов в культуре *in vitro* зависит от положения цветка на цветоносном побеге, условий культивирования эксплантов, генотипа донорских растений и других условий [6]. Для стимуляции гиногенеза производят отбор частей генеративных побегов перспективных растений сахарной свеклы, произрастающих в естественных условиях среды. В стерильных условиях извлекают неоплодотворенные семязачатки из закрытых бутонов и размещают их на питательной среде в культуральных сосудах. Регенерации появляются начиная с четвертой недели культивирования *in vitro* и могут иметь вид полноценных проростков, морфогенных и неморфогенных структур, каллуса (рисунок 4: А, Б, В).

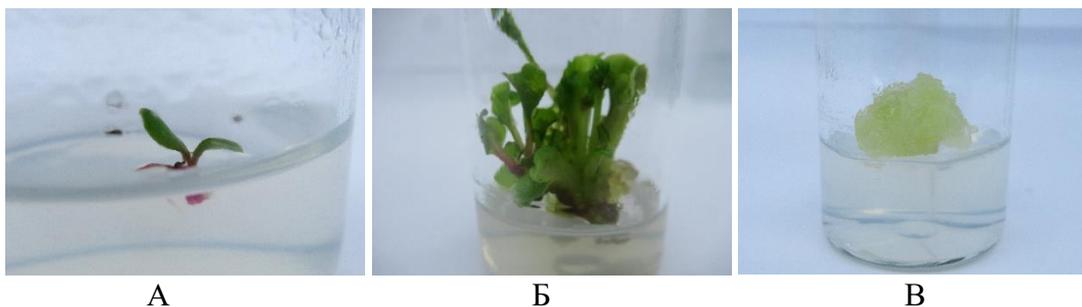


Рисунок 4. Структуры, развившиеся из неоплодотворенных семязачатков: А) развитый проросток, Б) морфогенная структура, В) неморфогенная каллусная структура

У развитых регенеранты определяют ploидность. Выявленные гаплоидные формы размножаются и подвергаются воздействию антимитотических веществ для нарушения процесса митоза и образования удвоенных гаплоидов. Диплоидизация хромосомного набора гаплоидных форм может сопровождаться гибелью некоторых растений в связи с токсичностью используемых веществ. Полученные диплоидные формы укореняются *in vitro*, высаживаются в условия закрытого грунта для получения штеклингов и включения в дальнейший селекционный процесс.

Для получения в условиях *in vitro* микроклонов и *ex vitro* штеклингов перспективных компонентов гибридов сахарной свёклы в культуре тканей используются апикальные меристемы размером 2-4 см (рисунок 5: А, Б, В). Стерилизация осуществляется по разработанной и запатентованной методике (патент 2 796 463(13) С1). Из тканей введенного экспланта развивается регенерант, а со временем и нормально развитый микроклон, способный к росту и дальнейшему культивированию *in vitro*.

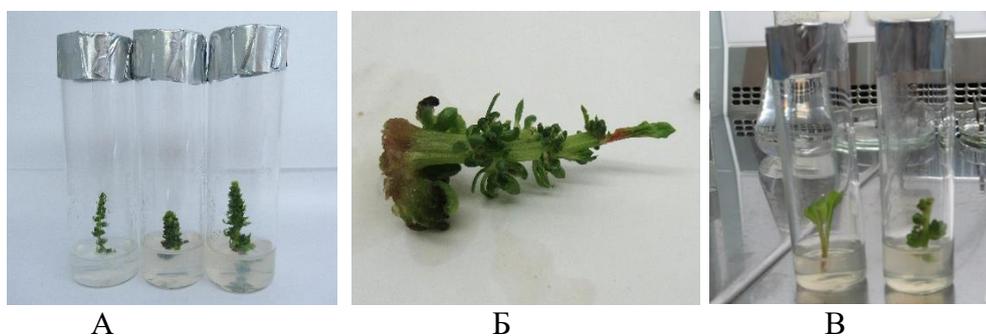


Рисунок 5. А) апикальные меристемы *in vitro*, Б) апикальная меристема с регенерацией в виде микропобега, В) пересаженные на свежие питательные среды микроклон и апикальная меристема

Размноженные и укорененные *in vitro* микроклоны выравненных линий компонентов гибридов сахарной свёклы с ценными селекционными признаками высаживаются в подготовленный субстрат в условиях тепличного комплекса ООО «СоюзСемСвекла» (рисунок 6: А, Б, В, Г). Контролируемый климат (свет, влажность, температура) позволяет ускорить процессы развития растений-регенерантов и за короткий промежуток времени получить корнеплоды компонентов гибридов сахарной свёклы, которые затем используются в селекционном процессе создания качественных гибридов.

С применением биотехнологических методов происходит ускорение селекционного процесса по получению высокопродуктивных гибридов при сокращении времени отбора, производства чистых линий, затрат на многолетнее культивирование и самоопыление растений. Работы, проводимые в селекционно-генетическом центре, позволяют создавать и совершенствовать технологии селекции, активно и продуктивно применять методику

микрклонального размножения в условиях *in vitro*, использовать методы молекулярной биологии в целях контроля качества растительного материала, разрабатывать и внедрять прогрессивные технологии семеноводства сахарной свеклы.

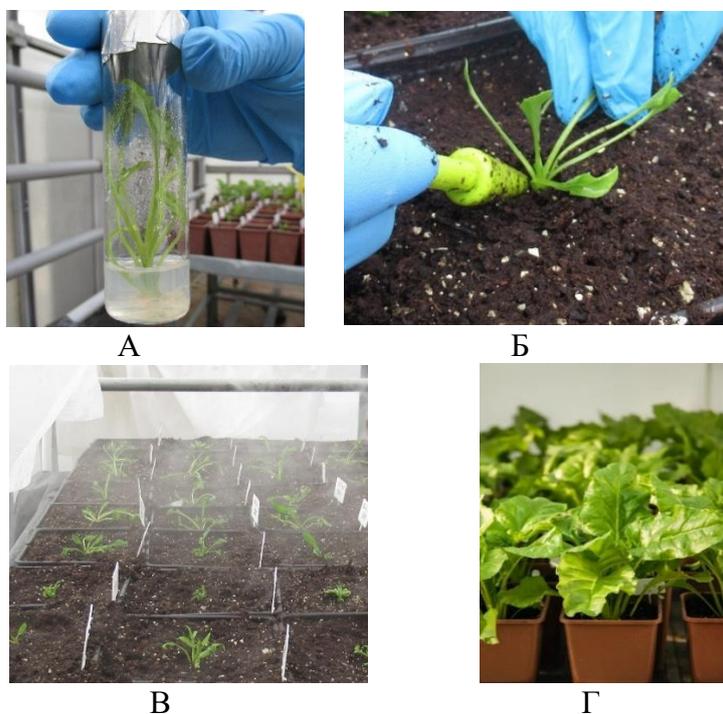


Рисунок 6. Растения сахарной свеклы в условиях закрытого грунта. А) – укорененный *in vitro* микрклон перед высадкой, Б) процесс помещения микрклона в закрытый грунт, В) адаптация в условиях повышенной влажности, Г) развитые растения

Библиографический список

1. Nishizawa S., Kubo T., Mikami T. Variable number of tandem repeat loci in the mitochondrial genomes of beets //Current Genetics. – 2000. – Т. 37. – Р. 34-38.
2. Moritani M. et al. Identification of the predominant nonrestoring allele for Owen-type cytoplasmic male sterility in sugar beet (*Beta vulgaris* L.): development of molecular markers for the maintainer genotype //Molecular Breeding. – 2013. – Т. 32. – Р. 91-100.
3. Pin P. A. et al. The role of a pseudo-response regulator gene in life cycle adaptation and domestication of beet //Current Biology. – 2012. – Т. 22. – №. 12. – Р. 1095–110.
4. Колесникова Е.О., Донских Е.И., Бердников Р.В. Биотехнологии гаплоидов как инструмент создания селекционного материала сахарной свеклы//Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2021. – Т. 25. № 8. – с. – 812–821.
5. Gurel, S., Pazuki, A., Aflaki, F., Gurel, E. Production of Doubled Haploid Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Plants Through Gynogenesis. In: Segui-Simarro, J.M. (eds) Doubled Haploid Technology. Methods in Molecular Biology. Humana, New York. –V 2289.–2021. – Р. 313–323.
6. Е. И. Малецкая, С. С. Юданова, С. И. Малецкий / Гаплоидия в апозиготических семенных потомствах сахарной свеклы *Beta vulgaris* L.//Доклады академии наук. – 2009. – Т. 426. № 5, – с. 710–713.

УДК 579.258

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *ALKB* И *MMOAA* В КЛЕТКАХ *RHODOCOCCLUS* SPP. В ПРИСУТСТВИИ *n*-АЛКАНОВ C₃–C₁₆

Л.П. Комарова, А.В. Криворучко, И.Б. Ившина

ФГАОУ ВО “Пермский государственный национальный исследовательский университет”, г. Пермь, Россия

“Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН” – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

В присутствии *n*-алканов C₃–C₄ и C₉–C₁₆ в клетках коллекционных штаммов *Rhodococcus* в 30000–3000000 раз увеличивается уровень экспрессии генов *alkB*, кодирующих синтез алкан-1-монооксигеназ. В клетках *R. ruber* в присутствии *n*-алканов C₃–C₄ в 26000–52000 раз также увеличивается уровень экспрессии гена *mmoAa*, кодирующего синтез α-субъединицы пропанмонооксигеназы. В присутствии *n*-алканов C₅–C₈ экспрессия данных генов не изменяется по сравнению с контролем (среда LB).

Ключевые слова: актиномицеты рода *Rhodococcus*, *n*-алканы, биодegradация, экспрессия генов, алкан-1-монооксигеназы *AlkB*, пропанмонооксигеназа *MmoA*.

EXPRESSION OF THE *ALKB* AND *MMOAA* GENES IN *RHODOCOCCLUS* CELLS IN THE PRESENCE OF C₃–C₁₆ *N*-ALKANES

L.P. Komarova, A.V. Krivoruchko, I.B. Ivshina

Perm State University, Perm, Russia

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Centre, Perm, Russia

In the presence of *n*-alkanes C₃–C₄ and C₉–C₁₆ in collection strains of *Rhodococcus* cells, the expression level of *alkB* genes encoding the synthesis of alkan-1-monooxygenases increases in 30000–3000000 times. Additionally in *R. ruber* cells in the presence of *n*-alkanes C₃–C₄, the expression level of *mmoAa* gene encoding the synthesis of α-subunit of propanmonooxygenase increases in 26000–52000 times. In the presence of toxic *n*-alkanes C₅–C₈, the expression of *alkB* and *mmoAa* genes does not change compared to the control (LB medium).

Keywords: actinomycetes of the genus *Rhodococcus*, *n*-alkanes, biodegradation, gene expression, alkane-1-monooxygenases *AlkB*, propane monooxygenase *MmoA*.

Введение. Актиномицеты рода *Rhodococcus* способны к биодegradации широкого спектра углеводородных соединений, в том числе линейных и разветвленных алканов с длиной цепи от 2 до ≥31 атома углерода, бензола и его гомологов, полициклических ароматических углеводородов, а также производных углеводородов и гетероатомных компонентов нефти. В связи с этим перспективно использование родококков в качестве нефтедеструкторов, продуцентов биосурфактантов, а также биоиндикаторов при нефтегазопроисловых

исследованиях [2,3,5]. Подбор наиболее подходящих для биотехнологии штаммов и получение генно-модифицированных клонов с улучшенными функциональными характеристиками связаны с определением путей метаболизма углеводов и идентификацией генов и ферментов, участвующих в деградации данных соединений. Родококки обладают способностью экспрессировать более одной ферментной системы, участвующих в окислении углеводов, включая метан/пропан монооксигеназы MmoABC, алкан-1-монооксигеназы AlkB, цитохром-P450-зависимые монооксигеназы, диоксигеназы, лакказы, пероксидазы, дегидрогеназы [2,3,5,6]. Субстратная специфичность этих ферментов и их роль в окислении определённых соединений недостаточно исследованы [4]. Одним из методов изучения функций ферментов является определение уровней экспрессии кодирующих их генов [1,4].

Цель настоящей работы – определение уровней экспрессии генов *alkB* и *mmoAa*, кодирующих алкан-1-монооксигеназы и α -субъединицу гидроксилазы А в составе пропанмонооксигеназного комплекса MmoABC соответственно, у родококков в присутствии *n*-алканов C₃–C₁₆.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, УНУ/ЦКП 73559/480868, #285 WFCC, <http://www.iegmc.ru/>) с известными полногеномными последовательностями: *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231, ИЭГМ 1156, *Rhodococcus* sp. ИЭГМ 1354, ИЭГМ 1372, ИЭГМ 1379, ИЭГМ 1381 и ИЭГМ 1404.

Геномные последовательности этих штаммов депонированы в открытых базах данных DDBJ/ENA/GenBank под номерами CCSD01000001–CCSD01000115, JASHLE010000001–JASHLE010000075, JASHKT010000001–JASHKT010000118, JASHKS01000000–JASHKS010000104, JASHKR010000001–JASHKR010000230, JASHKQ010000001–JASHKQ010000043 и JASHKP010000001–JASHKP010000055 соответственно.

Бактерии выращивали в среде LB (Sigma-Aldrich, США), в жидкой или на агаризованной минеральной среде “*Rhodococcus-surfactant*” (RS) в присутствии 0,1 вес. % *n*-пентана, *n*-гексана, *n*-гептана, *n*-октана, *n*-нонана, *n*-декана, *n*-ундекана, *n*-додекана, *n*-тридекана, *n*-тетрадекана, *n*-пентадекана или *n*-гексадекана, а также в атмосфере газо-воздушной смеси воздух: пропан или *n*-бутан 4:1 (все реактивы хч, Sigma-Aldrich, США). Состав среды RS, г/л: KH₂PO₄ – 2,0, K₂HPO₄ – 2,0, NaCl – 1,0, KNO₃ – 1,0, MgSO₄ × 7H₂O – 0,2, CaCl₂ – 0,02, FeCl₃ × 7·H₂O – 0,01, (NH₄)₂·SO₄ – 2,0 [<http://www.iegmc.ru/medium/med11.html>, 15.07.2024].

Бактерии выращивали при перемешивании (160 об/мин) или стационарно, при температуре 28°C в течение 24–48 ч.

Клетки разрушали с помощью 40 мг/мл лизоцима (Helicon, Москва) при температуре 37°C в течение 1 ч и далее порционно добавляли 10% додецилсульфата натрия либо путем перемешивания с металлическими шариками диаметром 1 мм (Китай), 10 шт/мл, с помощью гомогенизатора FastPrep-24 5G MP (Biomedicals, США) в течение 2 мин. Для выделения РНК использовали набор RNA Solo с ДНКазой в составе (Евроген, Москва).

Далее проводили ПЦР с обратной транскрипцией для получения кДНК на матрице РНК с использованием набора реактивов с ревертазой MMLV или Mint (Евроген, Москва) согласно инструкциям производителя. Для постановки ПЦР использовали праймеры, последовательности которых приведены в табл. 1.

Условия проведения ПЦР: 95°C – 3 мин, далее 35 циклов с чередованием температур 95°C – 30 с, 60°C/70°C – 30 с, 72°C – 30 с, в последнем цикле 72°C – 10 мин. Исходную концентрацию РНК и кДНК контролировали при помощи флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США). Уровни экспрессии генов определяли по количеству полученных транскриптов, при этом определяли относительные уровни экспрессии в клетках, выращенных в присутствии *n*-алканов C₃–C₁₆ по сравнению с контролем (среда LB). Все эксперименты проводили в 3-кратной повторности.

Таблица 1

Праймеры, использованные в работе

Таргетная последовательность	Название	Последовательность 5' → 3'	Ссылка
<i>alkB1</i> RHRU231v1_860124	P1-330015-F P2-330015-R	GGAATTAATTCGGATCCGGTGGGGGA CGGTG AGTGCGGCCGCAAGCTTGCTGTGCCG GGCG	Разработаны авторами
<i>alkB2</i> RHRU231v1_330015	P3-860124-F P4-860124-R	GGAATTAATTCGGATCCGACGACGTC GGACATCG TCGAGCTGCGAATAACTCTC	
<i>mmoAa</i> RHRU231v1_30049	mmoA1-F mmoA2-R	TTCATGGAGATCATGAAGCC GACGACCTGCAAATTC AATG	
<i>alkB</i> консервативный домен	<i>alkB</i> Forward <i>alkB</i> Reverse	TACTACCGGTACTGCACCTAC CTGGAAGTGATACAGGAAGAT	[6]

Результаты и обсуждение. По нашим данным, гены *alkB* и *mmoAa* экспрессируются в клетках *R. ruber* и *Rhodococcus* sp. в присутствии *n*-алканов C₃–C₁₆. Уровень экспрессии генов *alkB* у *R. ruber* зависит от длины цепи алкана. Количество транскриптов, образующихся на матрице *alkB1* или *alkB2* (у *R. ruber* 2 алкан-1-монооксигеназы), увеличивается в 30000–3000000 раз в присутствии *n*-алканов C₃–C₄ и C₉–C₁₆ по сравнению с контролем (среда LB). Исключение составляют *n*-тридекан и *n*-пентадекан, добавление которых в среду культивирования родококков приводит к незначительному (в 8 и 10 раз соответственно) увеличению относительного уровня экспрессии генов *alkB*, что может быть связано с особенностями их усвоения и включения в метаболизм бактериальных клеток.

Нами зарегистрировано усиление экспрессии обоих генов *alkB* *R. ruber*, однако уровни их экспрессии между собой значительно отличаются, обычно, один из двух генов экспрессируется сильнее. В отдельных случаях (например, при использовании *n*-нонана, *n*-тридекана, *n*-пентадекана или *n*-гексадекана) увеличивается экспрессия только одного гена, тогда как уровень экспрессии второго гена не изменяется по сравнению с контролем (рис.1). Это свидетельствует о достаточно сложной регуляции первичных этапов окисления алканов родококками, позволяющей им рационально использовать клеточные ресурсы. В то же время наличие двух генов *alkB* гарантированно обеспечивает вовлечение алканмонооксигеназ в процесс метаболизации *n*-алканов и использование данных соединений в качестве ростовых субстратов. В присутствии *n*-пентана, *n*-гексана, *n*-гептана и *n*-октана (C₅–C₈) увеличения экспрессии генов *alkB* в клетках *R. ruber* не наблюдается (рис.1).

Известно, что эти соединения являются летучими и высокотоксичными субстратами [<https://www.iloencyclopaedia.org/ru/part-xviii-10978/guide-to-chemicals/item/1049-hydrocarbons-saturated-and-alicyclic>, 15.07.2024]. В этом случае рост бактериальных клеток в их присутствии, по-видимому, связан с участием других оксидоредуктаз, не относящихся к алканмонооксигеназам и экспрессирующихся в условиях ответа клеток на стресс.

Экспрессируемая в клетках *R. ruber* пропанмонооксигеназа *MmoAa* более специфична в отношении *n*-алканов по сравнению с алкан-1-монооксигеназами *AlkB*. Установлены предпочтения этого фермента в отношении газообразных алканов – пропана и *n*-бутана. В присутствии данных углеводородов отмечается высокое, в 26000–52000 раз, увеличение уровня экспрессии гена *mmoAa*, тогда как в присутствии *n*-алканов с длиной цепи ≥C₅ экспрессия данного гена не изменяется либо увеличивается не более чем в 134 раза.

Эти результаты соответствуют современным представлениям о субстратной специфичности пропан/бутан монооксигеназ в отношении короткоцепочечных алканов [4]. В клетках *Rhodococcus* sp., растущих в присутствии пропана, отмечено также увеличение в 80–600000 раз уровня экспрессии генов *alkB*.

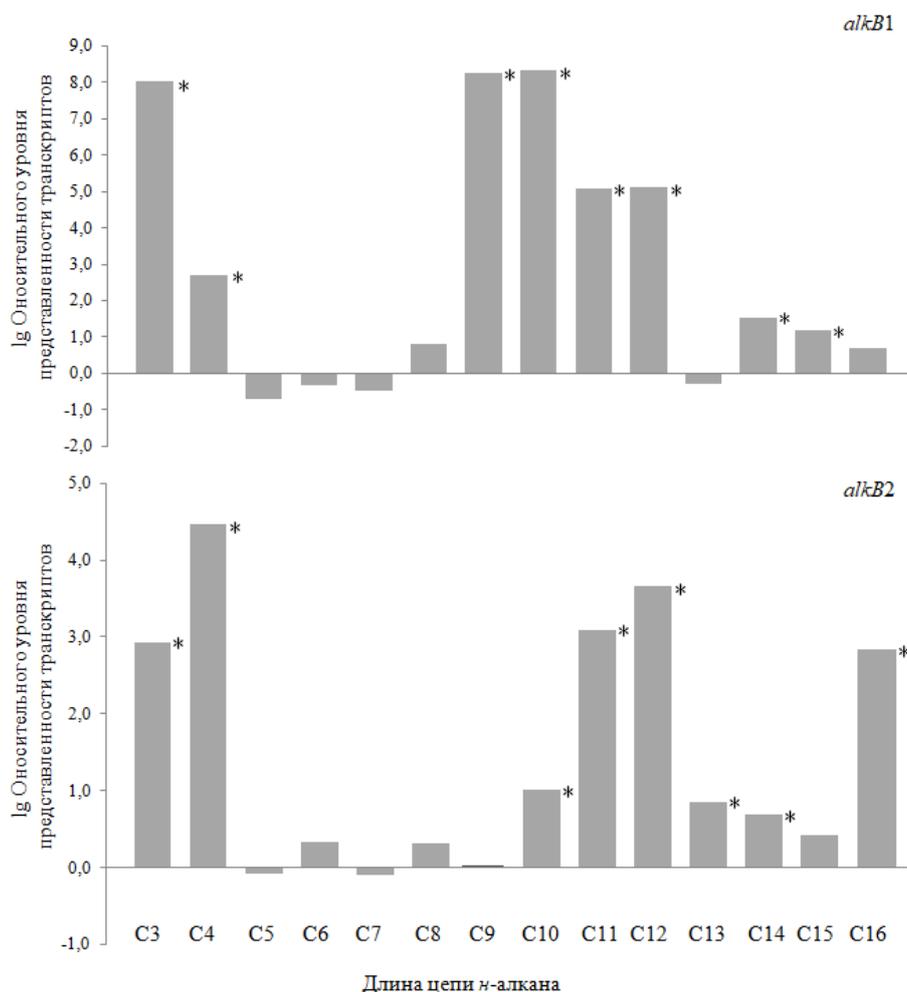


Рис.1. Изменения уровней экспрессии генов *alkB1* и *alkB2* в клетках *R. ruber* ИЭГМ 231 в присутствии *n*-алканов C₃–C₁₆. * Статистически достоверно от контроля (LB) при $p < 0,05$

Заключение. Таким образом, в процессах окисления *n*-алканов у родококков участвуют, по крайней мере, два типа ферментов – алкан-1-монооксигеназы AlkB и пропанмонооксигеназы MmoAa. Алкан-1-монооксигеназы AlkB обладают широкой субстратной специфичностью и участвуют в окислении *n*-алканов C₃–C₄ и C₉–C₁₆.

Пропанмонооксигеназа MmoAa более специфична: уровень ее экспрессии в клетках *R. ruber* значительно повышается в присутствии газообразных *n*-алканов – пропана и *n*-бутана. Рост родококков в присутствии жидких *n*-алканов C₅–C₈, по-видимому, связан с участием других типов ферментов, не относящихся к AlkB и MmoAa: экспрессия кодирующих их генов в присутствии данных соединений в клетках *Rhodococcus* spp. не увеличивается.

Благодарности. Исследование выполнено в рамках госзаданий 122031400671-1, 124020500028-4 и проведено с использованием оборудования ЦКП “Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов” и “Исследование материалов и веществ” Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук. ПФИЦ УрО РАН.

Библиографический список

1. Патрушев Л.И. Экспрессия генов. Москва. 2000. 526 с.
2. Fernandes P.J., Powell J.A.C., Archer J.A.C. Construction of *Rhodococcus* random mutagenesis libraries using Tn5 transposition complexes // Microbiology Society. 2001. V. 147. No. 9. P. 2529–2536.
3. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V. Hydrocarbonoxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation. In: Microbial Resources: From Functional Existence in Nature to Industrial Applications // Ed. Kurtböke I. Elsevier, Amsterdam. 2017. P. 121–148.
4. Koch D.J., Chen M.M., van Beilen J.B., Arnold F.H. *In vivo* evolution of butane oxidation by terminal alkane hydroxylases AlkB and CYP153A6 // Applied and Environmental Microbiology. 2009. V. 75. No. 2. P. 337–344.
5. Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Production of trehalolipid biosurfactants by *Rhodococcus*. Biology of *Rhodococcus*, 2nd edition // Ed. H. Alvarez. Springer Nature. 2019. P. 271–298.
6. Táncsics A., Benedek T., Szoboszlai S., Veres P.G., Farkas M., Mathe I., Marialigeti K., Kukolya J., Lanyi S., Kriszt B. The detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monooxygenase gene of members of the genus *Rhodococcus* // Systematic and Applied Microbiology. 2015. V. 38. P. 1–7.

УДК 612.82. 612.13

СОДЕРЖАНИЕ ЭКСТРАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЭКСТРАКТЕ РОЗ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РАЗЛИЧНЫХ ЭКСТРАГЕНТОВ

О.М. Конюхова, М.С. Губина, А.В. Горева

*Поволжский государственный технологический университет
Йошкар-Ола, Россия*

В статье представлены результаты исследования содержания экстрактивных веществ в исследуемом растительном сырье. Для этого использовались стандартные методики экстракции различными концентрациями экстрагента с последующим высушиванием и взвешиванием экстрактивных компонентов.

Ключевые слова: экстракт, конкрет, абсолют, экстрактивные вещества

Введение. Ценным продуктом, получаемым из цветков розы при переработке их методом экстракции, является конкрет [1, 2]. Конкреты или экстракты имеют пастообразную консистенцию желтого или оранжево – коричневого цвета с приятным запахом, свойственным данному виду сырья. Конкрет, в свою очередь, используют для получения ряда ценной продукции, прежде всего, розового масла – абсолюта [1,2]. В связи с ценностью розового конкрета в последнее десятилетие селекционные исследования были направлены на создание эффективных сортов, обеспечивающих высокий выход данного продукта [3]. На содержание эфирного масла, конкрета и абсолюта, а также на их выход и состав влияют несколько факторов, таких как сорт, хемотип, условия выращивания, а также метод экстракции и сушки [4].

Конкрет и абсолют являются основными продуктами экстракции эфирномасличной розы растворителем. Конкрет в натуральном виде широко не используется в парфюмерии и косметике, но его обычно превращают в спирторастворимую ароматическую жидкость, известную как абсолют. Для получения конкрета цветы перемешивают в экстракторе с неполярным растворителем, таким как н – гексан, который также выделяет ароматические соединения, как и другие растворимые вещества, такие как воск и пигменты. Экстракт подвергается вакуумной обработке, в результате которой удаляется растворитель для повторного использования. Оставшаяся воскообразная масса известна как конкрет. Конкрет перемешивают с этиловым спиртом при температуре от – 15 до – 20 °С для растворения ароматических компонентов, оставляя после себя воск и другие парафинистые вещества. Спиртовая фракция выпаривается под низким давлением, в результате чего получается готовый абсолют.

Методы и методики исследования Определение содержания экстрактивных веществ проводили согласно Государственной фармакопее Российской Федерации XIII издания ОФС.1.5.3.0006.15 [5].

Содержимое колбы было тщательно перемешано и профильтровано через сухой бумажный фильтр в сухую колбу объемом 150 – 200 мл, а 25,0 мл полученного фильтрата с помощью пипетки были перенесены в предварительно высушенную при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы фарфоровую чашку, и затем выпарены досуха на водяной бане.

Чашка с сухим остатком была высушена при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы, затем охлаждена в течение 30 минут в эксикаторе, на дне которого находился безводный хлорид кальция, и немедленно взвешена. Масса сухого остатка была зафиксирована и использована для дальнейших расчетов согласно методике. Процесс высушивания и взвешивания проводился с высокой точностью, чтобы обеспечить достоверность получаемых результатов. Все стеклянная посуда и приборы, задействованные в эксперименте, тщательно отмывались и высушивались, чтобы исключить возможные ошибки и загрязнения.

Результаты и их обсуждение. В ходе эксперимента было проведено определение содержания экстрактивных веществ в исследуемом растительном сырье. Для этого использовались стандартные методики экстракции различными растворителями и последующего высушивания, и взвешивания экстрактивных компонентов.

На основе полученных данных был построен график зависимости содержания экстрактивных веществ от экстрагента (рис. 1).

Из графика видно, содержание экстрактивных веществ в различных экстрактах

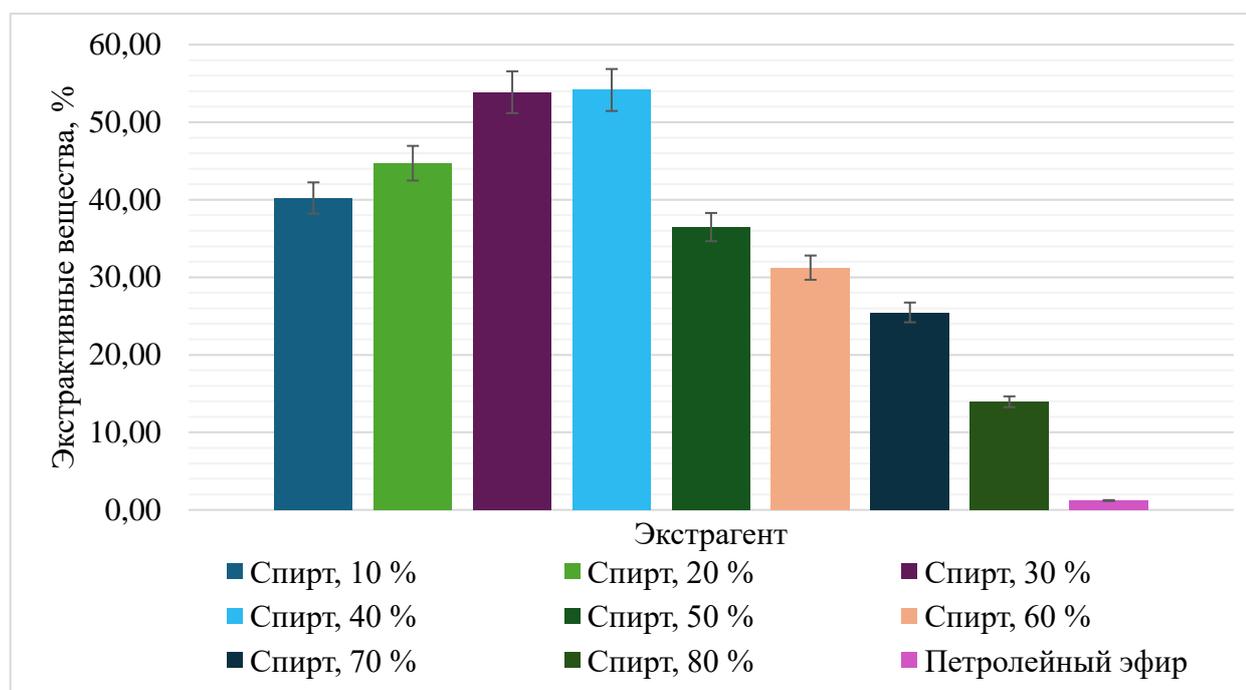


Рисунок 1. Количественное содержание экстрактивных веществ в зависимости от экстрагента

растительного сырья сильно зависит от концентрации спирта, используемого для экстрагирования. Наибольшее содержание экстрактивных веществ наблюдается в экстрактах с концентрацией спирта 30 – 40%. Кроме того, следует отметить, что экстрагент на основе петролейного эфира также демонстрирует незначительное извлечение экстрактивных компонентов.

Для полученных данных был проведен однофакторный дисперсионный анализ, результаты которого представлены в табл. 1.

Таблица 1

Однофакторный дисперсионный анализ содержания экстрактивных веществ

Источник вариации	SS	df	MS	Фрасч.	Р – Значение	F крит.	НСР _{0,5}	Доля влияния фактора, %
Между группами	12580,23	8	1572,53	2770,38	7,96673E – 48	2,21	0,97	99,84
Внутри групп	20,434	36	0,568	–	–	–	–	–
Итого	12600,66	44	–	–	–	–	–	–

Значение $F_{расч.}$ (2770,38) значительно превышает табличное значение $F_{крит.}$ (2,21), что указывает на высокую статистическую значимость различий между группами. Это свидетельствует о том, что различия между группами являются достоверными и не могут быть объяснены только случайными факторами.

Доля влияния экстрагента на содержание экстрактивных веществ, составляет 99,84%, что свидетельствует о его определяющей роли в формировании наблюдаемых различий.

Наименьшая существенная разность ($НСР_{0,5}$) равна 0,97, что позволяет выявить статистически значимые различия между средними значениями групп. Это означает, что различия между средними значениями групп, превышающие 0,97, могут быть интерпретированы как достоверные.

Таким образом, проведенный дисперсионный анализ свидетельствует о высокой статистической значимости различий между группами, определяющей роли рассматриваемого фактора в формировании этих различий, а также возможности выявления достоверных различий между средними значениями групп.

Библиографический список

1. Kurkcuoglu, M. Studies on Turkish rose concrete, absolute and hydrosol / M. Kukcuoglu, K. H. C. Baser // *Chem. Nat. Compd*, 2003. – № 39 (5). – P. 457-464.
2. Pashtetskiy, V. S. Essential oil industry in the Crimea / V. S. Pashtetskiy, N. V. Nevkrytaya, A. V. Mishnev, L. G. Nazarenko // *Yesterday, today, tomorrow. Simferopol: Arial*, 2018. – 317 p.
3. Золотилов, В. А. Итоги селекции розы эфиромасличной на высокий выход конкрета / В. А. Золотилов, Н. В. Невкрытая, О. М. Золотилова, О. Б. Скипор // *Таврический вестник аграрной науки*. – 2020. – № 3(23). – С. 93-104.
4. Milenkovic, L. New technology in basil production with high essential oil yield and quality / L. Milenkovic, J. Stanojevic, D. Cvetkovic, et al. // *Industrial Crops and Products*, 2019. – Vol. 140. – P. 111-118.
5. Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах ОФС.1.5.3.0006.15 // XIV Государственная фармакопея Российской Федерации. – Москва, 2018. – 7 с.

УДК 631.8+574.64

БИОТЕСТИРОВАНИЕ В ОЦЕНКЕ ГУМИНОВЫХ ПРЕПАРАТОВ*Л.Ю. Кошкина, А.А. Кузнецова, Н.А. Снадина**ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», Казань, Россия*

В работе исследовалось влияние гуминовых препаратов (товарное наименование: Гуми Оми и Гумат+7 йод) на тест-объекты (представитель флоры – ячмень, представитель фауны – пресноводная инфузория). На первом этапе изучалось влияние гуминовых препаратов на растения-биоиндикаторы (тест на всхожесть); второй этап – изучение влияния гуминовых препаратов на рост растений-биоиндикаторов, изменение длины и массы побегов. Согласно проведенному эксперименту с инфузориями и гуминового препарата Гуми-Оми показана умеренная степень токсичности.

Ключевые слова: биотестирование, гуминовые препараты, гуминовые кислоты, рост и развитие растений, ресурсосберегающие технологии

BIOTESTING IN THE EVALUATION OF HUMIC PREPARATIONS*L.Y. Koshkina, A.A. Kuznetsova, N.A. Snadina**Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia.*

The article investigated the effect of humic fertilizers (trade name: Gumi Omi and Gumat + 7 iodine) on the tested objects (representative of flora - barley, representative of fauna - *Paramecium caudatum*). At the first stage, the effect of humic drugs on bioindicator plants was studied (germination test); the second stage is the study of the effect of humic drugs on the growth of bioindicator plants, changes in the length and mass of shoots. According to the experiment, with ciliates and humic drug Gumi-Omi, a moderate degree of toxicity was shown.

Keywords: biotesting, humic fertilizers, humic acids, plant growth and development, resource-saving technologies

Ресурсосберегающие технологии в культивировании сельскохозяйственных растений означают использование эффективных методов, которые позволяют увеличить урожайность, сохранить биологическое разнообразие и уменьшить использование ресурсов во время возделывания растений [1].

Одной из таких технологий является внесение в почву гуминовых препаратов, представляющих собой комплексы, в состав которых могут входить гуминовые кислоты, фульвовые кислоты. Гуминовые препараты усиливают рост корней, листьев и побегов, стимулируют прорастание различных видов сельскохозяйственных культур. Положительные эффекты объясняются взаимодействием гуминовых препаратов с физиологическими и метаболическими процессами, происходящими в растениях. Внесение гуминовых препаратов стимулирует поглощение питательных веществ, проницаемость клеток, регулирует механизмы, участвующие в стимуляции роста растений [2, 3].

Биотестирование – метод, позволяющий оценить воздействие химических соединений, факторов на биологический тест-объект, который может быть представителем флоры, фауны. Преимущество использования данной группы методов, помимо экономичности, в том, что они позволяют оценить синергизм воздействия комплекса веществ, тогда как аналитические физико-химические методы оценивают концентрации отдельных веществ [4, 5].

С целью оценки воздействия гуминовых препаратов на растения в представленной работе поставлены следующие задачи:

- выбор гуминовых препаратов, растений для проведения биотестирования;
- проведение теста на всхожесть растений согласно ГОСТ 33061-2014 [6];
- проведение биотестирования с пресноводными инфузориями *Paramecium caudatum* согласно ГОСТ Р 57166-2016 [7];
- оценка степени влияния гуминовых препаратов на выбранные тест-объекты.

Для эксперимента были выбраны два гуминовых препарата.

Гумат+7 Йод – удобрение на основе гуминовых кислот с микроэлементами для предпосевной обработки и подкормки растений, улучшающий структуру и повышающий плодородие почвы.

Состав (%) «Гумат+7 йод»: гуминовые кислоты – 37; азот – 1,5; калий – 5; бор – 0,2; железо – 0,4; кобальт – 0,02; марганец – 0,17; медь – 0,2; молибден – 0,018; цинк – 0,2; йод – 0,005. Класс опасности – IV (малоопасное вещество).

Гуми-Оми – мягкое органоминеральное удобрение (порошково-гранулированное) на основе ферментированного куриного помета, сбалансированное по органическим, минеральным, гумусным веществам и микроэлементам.

Состав (%) «Гуми-Оми»: азот – 3,0%, фосфор – 7,0%, калий – 6,0%; микроэлементы: бор – 100-300 мг/кг, медь – 100-300 мг/кг; эликсир плодородия Гуми – 0,6%, ферментированная органика – 20%. Класс опасности – IV (малоопасное вещество).

Выбор растений для биотестирования осуществляется с учетом местных условий и характеристик окружающей среды. Критерии выбора: чувствительность к определенным соединениям, распространенность в области исследования, высокая устойчивость к изменению окружающей среды, продолжительный жизненный цикл, возможность легкодоступной количественной оценки степени концентрации определенного вещества.

В эксперименте для биотестирования выбран ячмень яровой Вереск (*Hordeum vulgare L.*). Это один из видов ячменя, который отличается своей способностью расти на бедных почвах и в условиях низких температур. Ячмень яровой Вереск имеет высокую устойчивость к заболеваниям и вредителям, требует хорошего полива и обработки посадочного материала перед посадкой.

Для проведения эксперимента по ГОСТ 33061-2014 семена растений высевают в вегетационные сосуды, причем количество семян на каждый сосуд зависит от размеров и продолжительности эксперимента, а также от конкретного вида растения. Необходимо следить за условиями окружающей среды, включая ежедневное измерение температуры воздуха, уровня влажности, концентрации углекислого газа и освещенности (интенсивность света и длина светового дня), а также за количеством фотосинтетически активной радиации, что должно быть подтверждено состоянием растений контрольной группы [6].

На первом этапе исследования была применена традиционная методика физиологической биоиндикации, включающая выращивание растений-биоиндикаторов в чашках с растворами гуминовых препаратов, проведен тест на всхожесть семян. В качестве контроля использовалась обычная вода.

Для определения pH растворов был использован pH-метр, который позволяет измерять уровень кислотности/щелочности широкого диапазона. Для раствора Гуми-Оми среднее значение pH равно 7,68; для Гумат+7 йод – 8,94; контроль (вода) – 5,5.

1 этап – тест на всхожесть растения-биоиндикатора под воздействием гуминовых препаратов.

Посев семян производился по 20 семян в каждом сосуде между смоченной водным раствором марле, в трёх повторностях для каждого случая.

1 – Контроль: вода и 20 семян растений.

2 – Гуми-Оми (1 г/л) в водном растворе и 20 семян растений.

3 – Гумат+7 йод (1 г/л) в водном растворе и 20 семян растений.

Данные по всхожести семян ячменя представлены на рис.1. По полученным результатам видно, что на третьи сутки прорастание семян отмечено на всех позициях, на четвертые сутки отмечено максимальное количество проросших семян. Так как семена были накрыты слоем марли, результаты, полученные под воздействием Гумат+7 Йод предположительно связаны с недостатком доступа света к семенам из-за темного окрашивания йодом. Далее проведено исследование влияния гуминовых препаратов на рост растений, в частности, на изменение длины и массы побегов. Наибольший прирост биомассы тестового растения отмечен под воздействием Гуми-Оми (0,2 г) в сравнении с Гумат+7 йод (0,1 г).

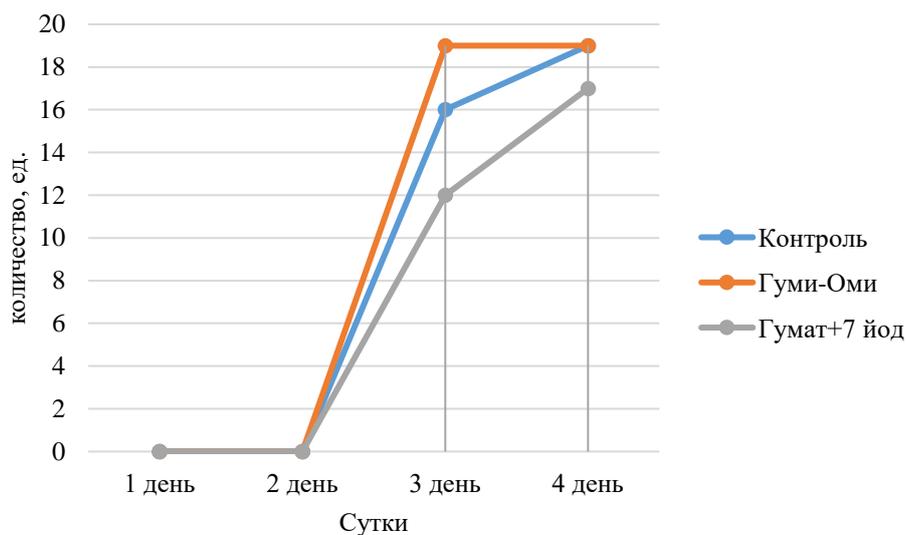


Рис. 1. Динамика всхожести семян ячменя

Наилучший результат контрольного образца по длине ростка у ячменя под воздействием Гуми-Оми, а корневого ростка – под воздействием Гумат+7 йод (рис. 2).

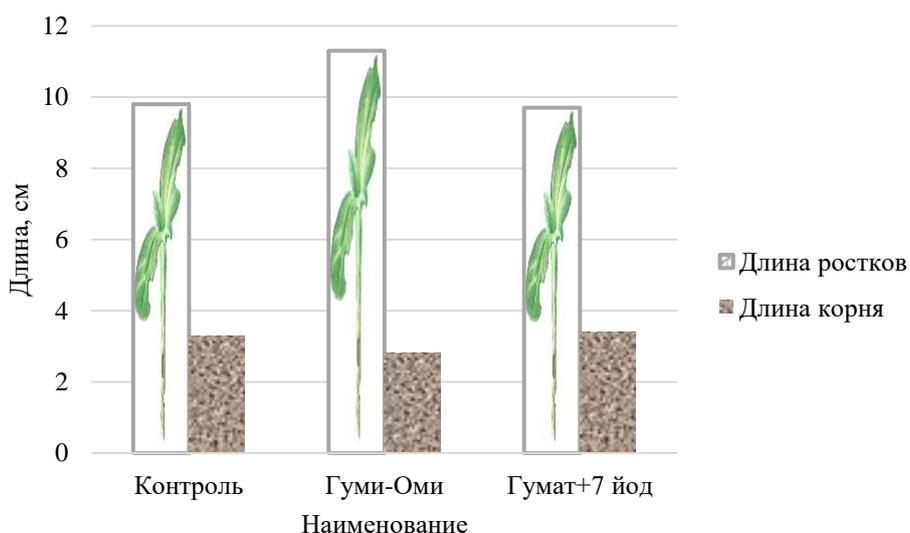


Рис. 2. Длина стебля и корня проростков растений

Следующим этапом было проведение биотестирования по ГОСТ Р 57166-2016 Определение токсичности по выживаемости пресноводных инфузорий *Paramecium caudatum* [7] с препаратом Гуми-Оми, показавшим результаты более лучшие в предыдущих экспериментах.

Эксперимент выполнялся на микроскопе стереоскопический Микромед МС-1 вар. 2С Digital. Наблюдение может производиться как при искусственном, так и при естественном освещении в отраженном и проходящем свете. Конструкция визуальной насадки микроскопа позволяет выводить изображение в режиме реального времени на экран персонального компьютера с помощью встроенной камеры.

Результаты теста гуминового препарата Гуми-Оми на живой организм *Paramecium caudatum* следующие: количество инфузорий до начала 11, через час – 8, (токсичность равна 28 %), что соответствует умеренной степени токсичности.

Выводы:

- отмечена различная динамика всхожести у растения-биоиндикатора ячменя под воздействием двух гуминовых препаратов: Гуми-Оми и Гумат+7 йод. Под воздействием Гуми-Оми отмечено 90 % всхожести;
- результаты исследования влияния гуминовых препаратов на рост тестовых растений показали изменение длины и массы побегов, наибольший прирост биомассы ячменя выявлен при использовании препарата Гуми-Оми;
- биотестирование с представителем фауны *Paramecium caudatum* показал умеренную степень токсичности препарата Гуми-Оми.

Результаты проведенных исследований показывают целесообразность проведения биотестирования на различных тест-объектах, к тому же данный способ даёт возможность сигнализировать о каких-либо нежелательных изменениях еще до их видимых проявлений.

Библиографический список

1. Ториков, В. Е. Ресурсосбережение в сфере сельского хозяйства / В. Е. Ториков, В. А. Погонишев, Д. А. Погонишева // Аграрный вестник Верхневолжья. – 2021. – № 1(34). – С. 24-32.
2. Якименко О. С., Терехова В.А. Гуминовые препараты и оценка их биологической активности для целей сертификации / О.С. Якименко, В.А. Терехова // Почвоведение. – 2011. – №11. – С. 1334-1343.
3. Поволоцкая, Ю. С. Краткий обзор гуминовых препаратов / Ю. С. Поволоцкая // Международный журнал гуманитарных и естественных наук. – 2019. – № 5-1. – С. 37-40.
4. Ляшенко, О.А. Биоиндикация и биотестирование в охране окружающей среды: учебное пособие / СПб., 2012. – 67 с.
5. Кошкина Л.Ю., Козлова Е.А. Биотестирование в рациональном и ресурсосберегающем выборе противогололедных реагентов. / Л.Ю. Кошкина, Е.А. Козлова // В сборнике: Региональная экология: актуальные вопросы теории и практики. Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Чебоксары, 2022. – С. 55-58.
6. ГОСТ 33061-2014 Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Наземные растения: тест на всхожесть семян и развитие проростков. Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200115879> (дата обращения 10.07.2024).
7. ГОСТ Р 57166-2016 Вода. Определение токсичности по выживаемости пресноводных инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg. Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200140393> (дата обращения 10.07.2024).

УДК 664.286

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ЦИТРАТОВ КРАХМАЛА НА ИХ РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Е.В. Курочкина, Г.А. Гавриленко, А.В. Протопопов

Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, г. Барнаул, Россия

В данной статье рассматривается модифицированный крахмал, при разном соотношении лимонной кислоты к крахмалу, а также при разной протяженности синтеза. Полученные сложные эфиры крахмала были исследованы на растворимость в воде при разных температурах.

Ключевые слова: ацилирование, крахмал, лимонная кислота, модифицированный крахмал, цитраты крахмала, сложные эфиры крахмала.

STUDY OF THE INFLUENCE OF THE CONDITIONS FOR OBTAINING STARCH CITRATES ON THEIR RHEOLOGICAL PROPERTIES

E.V. Kurochkina, G.A. Gavrilenko, A.V. Protopopov

Polzunov Altai State Technical University, Barnaul, Russia

This article discusses modified starch, with different ratios of citric acid to starch, as well as with different lengths of synthesis. The resulting starch esters were tested for solubility in water at different temperatures.

Key words: acylation, starch, citric acid, modified starch, starch citrates, starch esters.

Крахмал — это природный, возобновляемый, биоразлагаемый полимер, богатый ресурсами, которые широко встречаются в различных растениях. Многие его уникальные физико-химические свойства широко применяются в пищевой и других отраслях промышленности [1 с.1937], однако большая часть самого нативного крахмала не может быть использована напрямую [2 с.398]. После модификации свойства крахмала улучшаются и могут соответствовать требованиям многоуровневой переработки. Этерификация является одним из эффективных способов денатурации, а крахмал можно модифицировать физическими, химическими или ферментативными методами, которые эффективно применяются в пищевой, текстильной, бумажной, нефтехимической и фармацевтической промышленности в зависимости от его различных свойств. Применение эфира крахмала в зарубежных странах было раньше, и были достигнуты крупные промышленные производства [3 с.143].

Некоторые сложные эфиры крахмала для пищевого применения в основном включают ацетат крахмала, ацетилованный дикрахмалдипат, октенилсукцинат натрия, монокрахмалфосфат, дикрахмалфосфат, фосфатированный дикрахмалфосфат, ацетилованный дикрахмалфосфат, гидроксипропилдикрахмалфосфат и гидроксипропилкрахмал в США и странах ЕС [4 с.369]. Хотя исследования в Китае проводятся сравнительно поздно, исследования и разработки сложных эфиров крахмала постепенно развивались за последние два десятилетия. В настоящее время в Китае сложные эфиры крахмала в качестве пищевых добавок в основном включают фосфат-дикрахмал, ацетат-крахмал, натрий-фосфат крахмала, ацетилованный дикрахмал-адипат, фосфорилированный дикрахмал-фосфат, ацетилованный дикрахмал-фосфат и гидроксипропилдикрахмал-фосфат [5 с.92]. Поскольку процесс получения уже исследован многими учеными, технология синтеза в основном ориентирована на повышение степени замещения (СЗ), что и определило направления применения этерифицированного крахмала [6 с.283].

Нами был модифицирован крахмал в двух растворителях: вода и четыреххлористый углерод, при разных соотношениях крахмала к растворителю и при различных температурах синтеза. В табл. 1 приведены степени замещения в полученном модифицированном крахмале.

В первую очередь на степень замещения оказывает влияние температура. С увеличением температуры степень замещения в среде четыреххлористого углерода уменьшается. В водной среде при соотношении 1:0,25 степень замещения остается постоянной при разных температурах, так как при 25°C достигается максимальная степень замещения и после этого повышение температура мало влияет на нее. При соотношении 1:0,5 наблюдается возрастание степени замещения. При более высокой температуре реакция проходит продуктивнее, деструкция не протекает.

Также на основе полученных данных можно сделать вывод о том, что на степень замещения влияет среда, в которой проходит реакция. В среде воды реакция проходит эффективнее, чем в четыреххлористом углероде. Это происходит из-за большей ионной силы и высокой диссоциации.

Таблица 1

Степень замещения в полученном модифицированном крахмале

Условия получения продукта	Температура синтеза	
	25°C	45°C
CCl ₄ (3 часа)	0,126	0,15
CCl ₄ (4 часа)	0,393	0,323
H ₂ O ((1:0,25) 4 часа)	0,37	0,37
H ₂ O ((1:0,5) 4 часа)	0,54	0,6

Полученные продукты исследовались методом ИК-спектроскопии (рис. 1). Анализ показал образование связей в области 1740 см⁻¹, характерных для колебаний сложноэфирной группы, что также свидетельствует о протекающем взаимодействии.

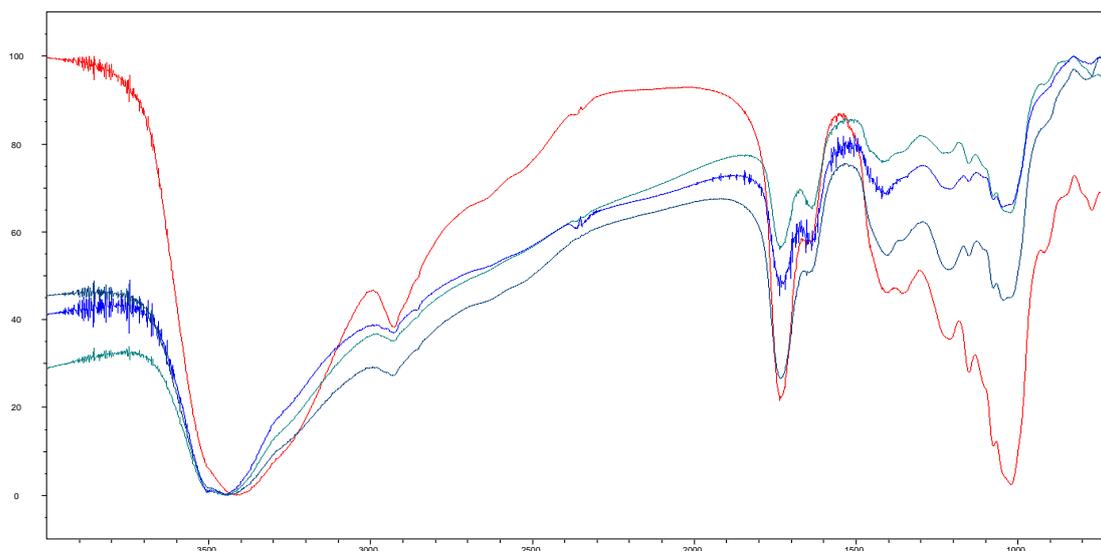


Рис. 1 – ИК-спектр продукта ацилирования крахмала

В ходе изучения полученных модификаций крахмала, также были проведены исследования их растворимости. При протяженности синтеза 4 часа и температуре 25 °C с соотношением растворителя к крахмалу 1:0,25, продукт растворился в воде при 30 °C. При тех же условиях, но с температурой синтеза 45 °C, продукт растворился при 30 °C. Тот же самый продукт, но с

соотношением 1:0,5, а также при гашении содой, растворился при 30 °С, как в условиях синтеза 25 °С, так и в условиях 45 °С. При протяженности синтеза 3 часа и температуре 30 °С с использованием хлорида кальция, продукт растворился при 30 °С. Данные по значениям вязкости полученных цитратов крахмала приведены в табл. 2.

Таблица 2

Вязкость полученных цитратов крахмала

Название продукта	30°С	45°С	65°С	90°С
КЛВ 1:0,25 4/25	1.08	1.10	1.03	1.03
КЛВ 1:0,25 4/45	1.05	1.12	1.02	1.05
КЛВ 1:0,5 4/25 (в соде)	1.00	1.01	0.99	1.32
КЛВ 1:0,5 4/45 (в соде)	1.04	1.04	0.95	1.08
КЛ CaCl ₂ 3/30	1.05	1.02	0.95	0.9

Полученные данные показывают, что модифицированный лимонной кислотой крахмал, при указанных условиях синтеза, не оказывает влияния на вязкость растворов. Однако у полученных продуктов крахмала наблюдается значительное снижение температуры растворимости. Также благодаря наличию свободных групп связанной лимонной кислоты в крахмале полученный продукт представляет интерес в качестве регулятора кислотности и вязкости.

Библиографический список

1. Yu-Bin Su, Jiawei Zhang, Kaijiao Huang, Nengzhong Xie, Small molecular sugars effect on the pasting and retrogradation of Mesona chinensis polysaccharide/starch complexes. *International Journal of Food Science & Technology*, 10.1111/ijfs.16950, 59, 3, (1935-1944), (2024).
2. Honghong Zhang, Haoran Fan, Xueming Xu, Dan Xu, Deterioration mechanisms and quality improvement methods in frozen dough: An updated review. *Trends in Food Science & Technology*, 10.1016/j.tifs.2023.104251, 143, (104251), (2024).
3. Yu Xie, Wanzhong Yin, Jin Yao, Xueming Yin, Jiayi Liu, Feijia Xue, Daolai Tian, Flotation behavior and surface adsorption mechanism of a novel selective inhibitor HDP in the separation of chalcopyrite and talc flotation. *Journal of Molecular Liquids*, 10.1016/j.molliq.2024.124206, 398, (124206), (2024).
4. Juanjuan Li, Jie Sun, Fanmin Meng, Yanhong Chen, Huitao Liu, Yuan Gao, Preparation of high internal phase pickering emulsions using micron-sized esterified maize starch as the sole effective stabilizer. *Journal of Food Engineering*, 10.1016/j.jfoodeng.2023.111932, 369, (111932), (2024).
5. Ruobing Li, Haiteng Tao, Congping Tan, Fang Yuan, Li Guo, Bo Cui, Yu Zhu, Feixue Zou, Pengfei Liu, Lu Lu, The structural and functional properties of a novel enzyme-modified starch as an alternative to hydroxypropyl starch ether. *Food Hydrocolloids*, 10.1016/j.foodhyd.2023.109448, 148, (109448), (2024).
6. Ranjan Kaushik, Ankit Kumar, Rekha Phogat, Rakesh Gehlot, Neha Rani., Chemically Modified Starch, Standardized Procedures and Protocols for Starch, 10.1007/978-1-0716-3866-8_10, (281-334), (2024).

УДК 579.64+663.18

РАЗРАБОТКА УНИВЕРСАЛЬНОГО БИОПРЕПАРАТА-ИНСЕКТИЦИДА ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ КОНСОРЦИУМА ШТАММОВ *BACILLUS THURINGIENSIS*

К.Д. Левитская^{1,2}, Ю.А. Франк^{1,2}, Д.А. Ивасенко^{1,2}

¹*Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия*

²*ООО «Дарвин», Томск, Россия*

В статье отражены результаты экспериментов по разработке биопрепарата-инсектицида для защиты растений от насекомых и их личинок на основе штаммов бактерии *Bacillus thuringiensis*. На основе теоретико-экспериментальных данных отобраны четыре паспортизованных штамма *B. thuringiensis* разных подвидов, подобраны питательные среды для промышленного культивирования каждого из штаммов и длительность культивирования для достижения не менее 10^8 КОЕ/мл в биопрепарате. Протестированы условия хранения препарата, выбраны оптимальные температуры и способы консервации.

Ключевые слова: защита растений, биоинсектициды, *Bacillus thuringiensis*, CRY токсин, биопрепараты

DEVELOPMENT OF A UNIVERSAL INSECTICIDE BIOLOGICAL PREPARATION FOR PLANT PROTECTION CONSISTING OF SEVERAL *BACILLUS THURINGIENSIS* STRAINS

K.D. Levitskaya^{1,2}, Y.A. Frank^{1,2}, D.A. Ivashenko^{1,2}

¹*National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia*

²*Darwin LLC, Tomsk, Russia*

The article reflects the results of experiments on the development of an insecticidal biological product for plant protection against insects and their larvae based on strains of the bacterium *Bacillus thuringiensis*. On the basis of theoretical and experimental data, four certified strains of *B. thuringiensis* of different subspecies were selected, growth media for the industrial cultivation of each strain and the duration of cultivation to achieve at least 10^8 CFU/ml in the biological product were chosen. The storage conditions of the preparation were tested and optimal temperatures and preservation methods were selected.

Keywords: plant protection, bioinsecticides, *Bacillus thuringiensis*, CRY toxin, biological preparation

Введение. Насекомые и другие вредители наносят существенный урон сельскому хозяйству, снижая продуктивность растений и угрожая здоровью животных. Для борьбы с вредителями растений широко используются биопрепараты микробного происхождения. Биологические пестициды, в отличие от химических, действуют многоступенчато, вызывая явления заболеваемости-смертности, и являются безопасными для нецелевых организмов, включая человека [1].

Известно около 1500 энтомоцидных микроорганизмов с разнообразной энтомолого-экологической спецификой [3]. Токсинообразующие бактерии *Bacillus thuringiensis* (Bt) наиболее часто входят в состав биопрепаратов, они представляют собой высокоспецифичный, безопасный и эффективный агент для борьбы с насекомыми-вредителями сельского хозяйства. Продукты Bt активны в отношении личинок насекомых, они убивают насекомое путем разрушения эпителиальных клеток кишечника с последующей септициемией. Основными действующими токсинами являются кристаллические белковые δ -эндотоксины (Cry и Cyt). С точки зрения практического применения наиболее значимы Cry токсины – они активны против

разных групп насекомых: чешуекрылых (Lepidoptera), жесткокрылых (Coleoptera), перепончатокрылых (Hymenoptera) и двукрылых (Diptera) [5].

Цель данного исследования – разработка биопрепарата-инсектицида на основе бактериальных штаммов *Bacillus thuringiensis* с разной специфичностью для защиты растений от насекомых-вредителей и их личинок.

Материалы и методы. Поскольку сгу токсины имеют специфичность воздействия на разные группы насекомых [4], для включения в состав биопрепарата были отобраны четыре потенциальных паспортизированных штаммов Bt, таким образом, чтобы охватить широкий спектр патогенных насекомых:

1. *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* (штамм ВТ) – эффективен против чешуекрылых и других насекомых. Штамм из производственной коллекции ООО «Дарвин», депонирован в ВКМ по процедуре Национального патентного депонирования под номером В-3465D;

2. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (штамм В-6066) – эффективен против чешуекрылых, двукрылых и других насекомых. Заказан из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ);

3. *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (штамм В-2972) – эффективен против двукрылых и других насекомых. Заказан из ВКПМ;

4. *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (штамм В-5081) – имеет выраженное действие на жесткокрылых. Заказан из ВКПМ.

Подбор методов промышленного культивирования выбранных штаммов. Технология производства штамма ВТ была разработана ранее, оптимальный выход клеток штамма получают на жидком аналоге агара для количественного учета гетеротрофных бактерий (РСА) в течение 48 ч при температуре 26–28 °С с барботированием.

С целью подбора условий промышленного культивирования остальных штаммов, отобранных для включения в биопрепарат, изучали их рост в жидкой культуре на четырех вариантах питательной среды: (1) питательная среда на основе гидролизата рыбной муки (ГРМ); (2) ½ ГРМ; (3) РСА; (4) ½ РСА. Данные среды выбраны исходя из доступности их ингредиентов и удобства приготовления в промышленных масштабах.

Каждый штамм высевали на соответствующую жидкую питательную среду в объеме 15 мл, добавляя инокулят из расчета 5 % (v/v), инкубировали при 28 °С на шейкере (120 об./мин). Эксперименты провели в пяти биологических повторностях. Число клеток учитывали в каждой повторности каждого варианта эксперимента, используя камеру Горяева для вычисления численности клеток на 1 мл. Клетки учитывали через 24, 48 и 72 ч культивирования.

Подбор консерванта для сохранения и продления жизнеспособности бактерий в составе биопрепарата. Для определения эффективности применения консервантов и выбора температурных условий хранения биопрепарата вырастили жидкие культуры каждого штамма в оптимальных условиях в объеме 600 мл. Далее жидкие культуры смешали в стерильных сывороточных флаконах в пропорции 1:1:1:1 (по 25 мл культуры каждого штамма). Таким образом, подготовили 24 флакона со смесью клеток четырех штаммов Вт (прототип биопрепарата).

В качестве консервантов, основываясь на литературных источниках [2, 6], для тестирования выбрали NaCl 5 % (w/v), сорбат К 0.3 % (w/v), бензоат Na 0.5 % (w/v). Сухие соли добавляли во флаконы. Также закладывали контрольный вариант эксперимента – без добавления консерванта. В каждом флаконе был проведен учет исходной численности клеток (0 суток) с помощью камеры Горяева. Хранение биопрепарата испытывали при температурах 10 °С, 23 °С и 36 °С. Итого тестировали 12 комбинаций в двух параллельных повторностях. Учет клеток проводили также с помощью камеры Горяева через 7, 14, 30 и 60 суток.

Результаты и обсуждение. **Подбор методов промышленного культивирования выбранных штаммов.** Результаты учета клеток штаммов В-6066, В-2972 и В-5081 показаны на

рис. 1 в виде среднего арифметического, рассчитанного по пяти параллельным повторностям посева каждого штамма на каждой из четырех тестируемых сред (\pm стандартная ошибка среднего). При принятии решения о выборе той или иной среды руководствовались следующими критериями: (1) достижение кондиционной численности клеток Вt не менее 10^8 кл/мл; (2) минимальная стоимость питательной среды; (3) минимальные затраты на электроснабжение и минимальная занятость ферментеров.

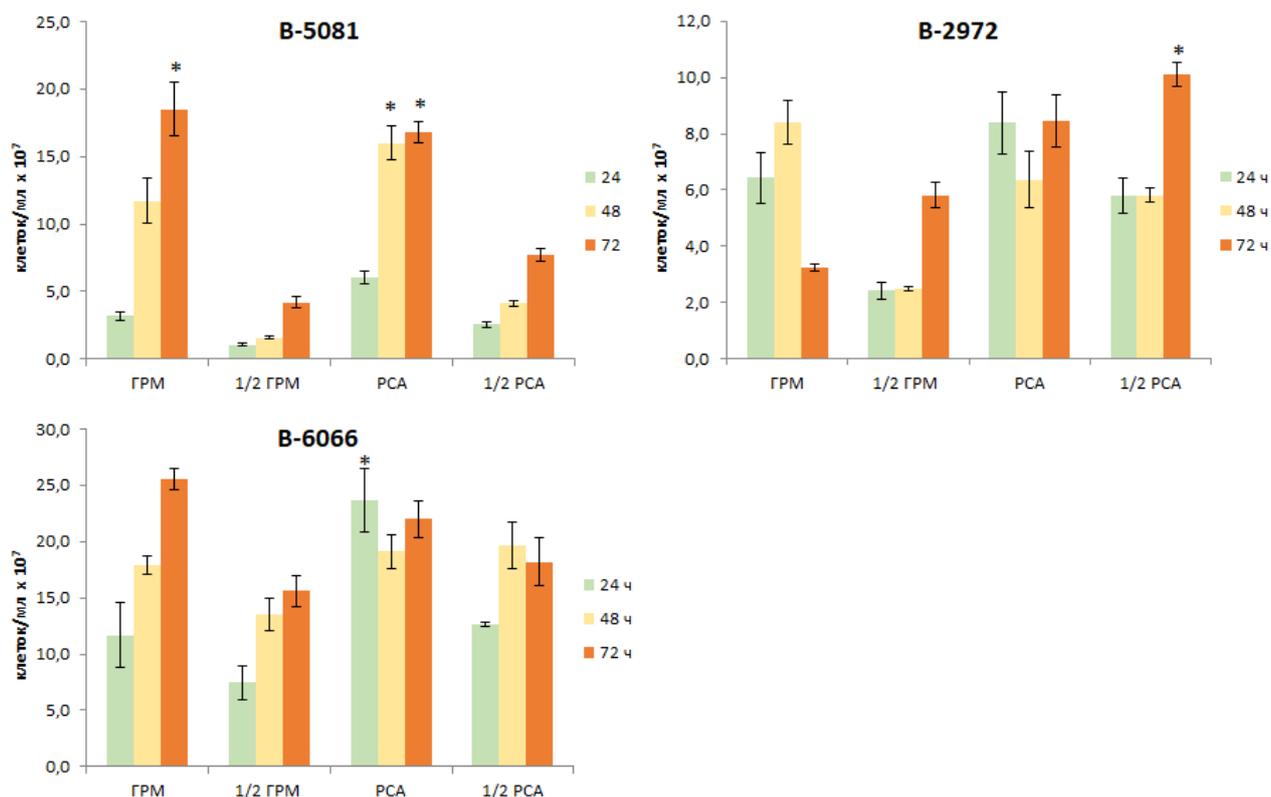


Рис. 1. Число клеток штаммов *Bacillus thuringiensis* В-5081, В-2972 и В-6066 в 1 мл жидкой культуры при культивировании на разных питательных средах. Знаком * отмечены варианты с максимальной численностью клеток

Максимальная средняя численность клеток штамма В-6066 отмечена на среде ГРМ через 72 ч и составила 2.55×10^8 кл/мл. Однако на среде РСА через 24 ч культивирования достигнуто 2.36×10^8 кл/мл и статистически значимых различий между этими вариантами при оценке U-критерием Манна-Уитни не выявлено ($p > 0.05$). Так как культивирование на среде РСА в течение 24 ч значительно дешевле, чем на ГРМ в течение 72 ч, выбран первый вариант сочетания питательной среды и времени культивирования.

В случае эксперимента со штаммом В-2972 кондиционная численность клеток достигнута только на питательной среде $\frac{1}{2}$ РСА через 72 ч культивирования.

Для штамма В-5081 максимальная средняя численность клеток (1.85×10^8 кл/мл) отмечена на ГРМ через 72 ч, на среде РСА через 72 ч получено в среднем по пяти параллельным повторностям 1.68×10^8 кл/мл, а через 48 ч – 1.60×10^8 кл/мл. Между значениями численности клеток штамма В-5081 во всех трех перечисленных вариантах культивирования статистически значимых различий не выявлено (U-критерий, $p > 0.05$). Исходя из критериев стоимости питательной среды и минимальных затрат на культивирование выбран вариант выращивания штамма на среде РСА в течение 48 ч.

Подбор консерванта для сохранения и продления жизнеспособности бактерий в составе биопрепарата. Вопреки ожиданиям, NaCl в концентрации 5 % (w/v) не обеспечивал

должного хранения биопрепарата (рис. 2): при температурах 23 и 36 °С через 14–30 суток отмечена контаминация.

При использовании в качестве консервантов сорбата К и бензоата Na (рис. 2) клетки Вt проявляли чувствительность к этим веществам, их численность при хранении при всех исследованных температурах была нестабильной, а прогноз сохранения численности при хранении до 180 суток даже при 10 и 23 °С – не оптимистичным.

Без добавления консерванта суспензия клеток Вt хранилась значительно лучше и даже увеличивала численность на определенном этапе (в период до 30 суток) (рис.2). Прогноз долгосрочного сохранения численности Вt благоприятный для температур 10 и 23 °С, хранение при 36 °С не обеспечивает сохранности биопрепарата.

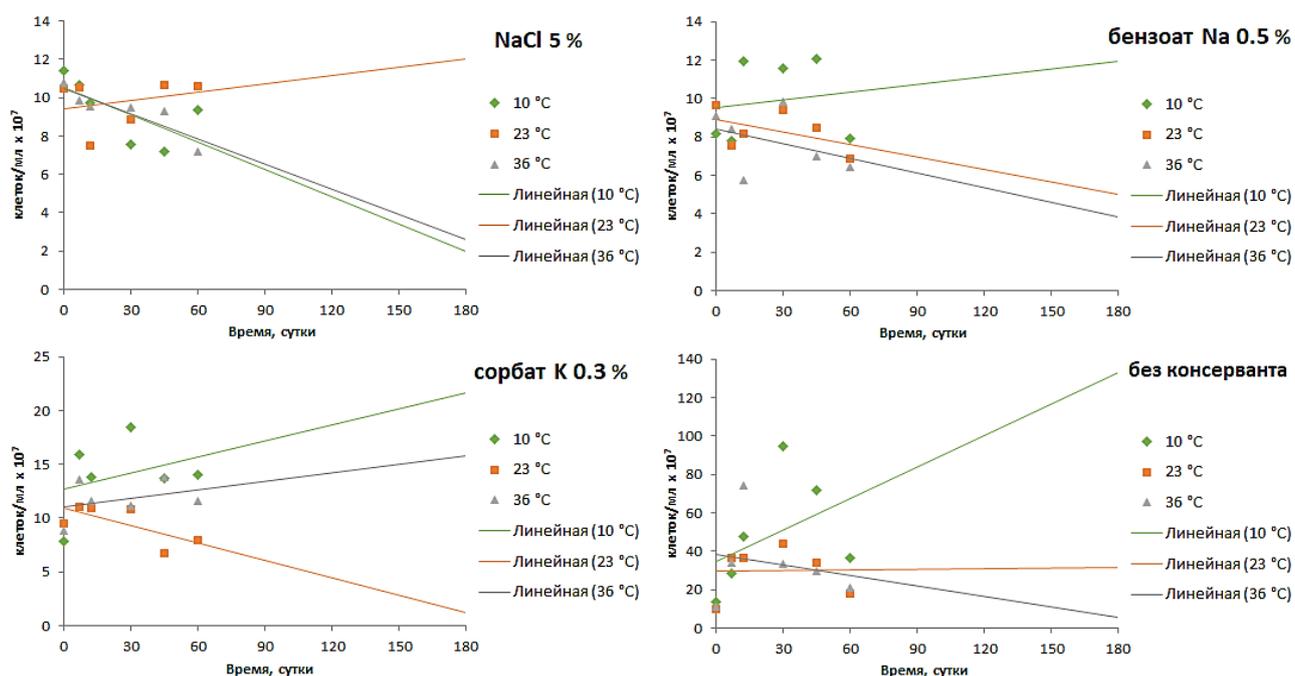


Рис. 2. Изменение численности клеток в смеси штаммов Вt при хранении при температурах 10, 26 и 36 °С через 7, 14, 30 и 60 суток и прогноз на 180 суток

Заключение. На основе теоретико-экспериментальных данных составлен консорциум бактериальных штаммов *Bacillus thuringiensis* для разработки биопрепарата-инсектицида широкого действия: *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* (штамм ВТ), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (штамм В-6066), *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (штамм В-2972) и *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (штамм В-5081). Определены оптимальные условия для промышленного культивирования каждого штамма: ВТ – питательная среда РСА, длительность культивирования – 48 ч; В-6066 – РСА, 24 ч; В-2972 – ½ РСА, 72 ч и В-5081 – РСА, 48 ч. А также определены условия хранения готового биопрепарата – без добавления консервантов при температурах 10–23 °С.

В дальнейшем планируется провести исследование длительного хранения (1.5 год) биопрепарата при разных температурах без добавления консервантов и провести испытание активности биопрепарата в отношении различных насекомых-вредителей растений.

Библиографический список

1. Гольдин Е.Б. Биологическая защита растений в свете проблем XXI века. Геополитика и экогеодинамика регионов. 2014. Т. 10. № 2. С. 99-107.
2. Ermolova V.P., Grischechkina S.D., Rakhman A.M., Antonets K.S., Belousova M.E., Yakhno V.V., Nizhnikov A.A. Insecticidal properties of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. I. The activity

spectrum of a larvicidal preparation based on industrial strain 7-1/23a. *Agricultural Biology* 2019, 54 (6). PP. 1267-1280.

3. Khachatourians G.G. Insecticides, Microbial. In: *Encyclopedia of Microbiology*, 2009. PP. 95-109.

4. Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*. 2014, 6 (12). PP. 296-325. doi: 10.3390/toxins6123296.

5. Raymond B, Johnston PR, Nielsen-Leroux C, Lereclus D, Crickmore N. (2010) *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol.* 2010, 18 (5). PP. 189–194.

6. Surekha M., Reddy S.M. Preservatives: Classification and Properties In book *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*. 2014, V.3. PP. 69-75. DOI: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00257-3.

УДК 579.66 579.266.

НАКОПЛЕНИЕ БЕЛКА В БИОМАССЕ *NANNOCHLORIS SP. NAUMANN* IPPAS C-1509 В УСЛОВИЯХ НАПРАВЛЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

О.Р. Левчук, Ю.Г. Базарнова

ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет

Петра Великого,

Высшая школа биотехнологий и пищевых производств

г. Санкт-Петербург, Россия

levchuk.or@edu.spbstu.ru

Использование биомассы фотосинтезирующих микроорганизмов — микроводорослей и цианобактерий, которые способны поглощать углекислый газ и превращать его в ценные пищевые вещества может стать альтернативой традиционным кормовым источникам. Внедрение углеродно-нейтральных биотехнологий с использованием микроводоросли *Nannochloris sp.* для перехода к технологиям с нулевым выбросом углерода и получением сырья с высоким содержанием «одноклеточного» белка, который содержит все необходимые аминокислоты и превосходит по качеству другие кормовые продукты. Цель данной работы: исследовать влияние содержания бикарбонатного углерода на накопление белка в биомассе *Nannochloris sp.* в стационарной фазе роста при культивировании. Результаты исследований влияние содержания растворенного диоксида углерода на накопление белка в биомассе *Nannochloris sp.* в стационарной фазе роста позволили выявить критическую концентрацию HCO_3^- , при которой достигается максимальное содержание белковых веществ в полученной биомассе. Полученные результаты согласуются с литературными данными и открывают перспективы использования культуры *Nannochloris sp.* для производства высокобелковых кормовых ингредиентов.

Ключевые слова: фотосинтезирующие микроорганизмы, *Nannochloris sp.*, направленное культивирование, концентрацией HCO_3^- в питательной среде, стационарная фаза роста, содержание белка в биомассе

ACCUMULATION OF PROTEIN IN THE BIOMASS OF *NANNOCHLORIS SP. NAUMANN* IPPAS C-1509 UNDER DIRECTED CULTIVATION CONDITIONS

O.R. Levchuk, Yu.G. Bazarnova

Institute of Biomedical Systems and Biotechnologies, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic

University, St. Petersburg, Russia.

levchuk.or@edu.spbstu.ru

The use of biomass of photosynthetic microorganisms - microalgae and cyanobacteria, which are capable of absorbing carbon dioxide and converting it into valuable nutrients, can become an alternative to traditional feed sources. Implementation of carbon-neutral biotechnologies using microalgae *Nannochloris sp.* to transition to technologies with zero carbon emissions and obtain raw materials with a high content of “single-cell” protein, which contains all the necessary amino acids and is superior in quality to other feed products. The purpose of this work: to study the effect of dissolved carbon dioxide on the accumulation of protein in the biomass of *Nannochloris sp.* in the stationary growth phase during cultivation. Research results: the influence of dissolved carbon dioxide content on protein accumulation in the biomass of *Nannochloris sp.* in the stationary phase of growth made it possible to identify the critical concentration of HCO_3^- at which the maximum content of protein substances in the resulting

biomass is achieved. The results obtained are consistent with the literature data and open up prospects for using the culture of *Nannochloris sp.* for the production of high-protein feed ingredients.

Keywords: photosynthetic microorganisms, *Nannochloris sp.*, targeted cultivation, HCO_3^- concentration in the nutrient medium, stationary growth phase, protein content in biomass

Введение

Перспективы развития биоэкономики связаны с внедрением технологий декарбонизации, которые включают поглощение и утилизацию CO_2 и призваны осуществлять переход к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству для повышения качества продуктивности сельского хозяйства и обеспечения продовольственной безопасности. Основными источниками выбросов CO_2 являются нефтехимические и биотехнологические промышленные производства [1]. Примерно 60% атмосферных выбросов CO_2 поглощается гидросферой, частично преобразовываясь в карбонаты и бикарбонаты. Процесс постоянного газообмена обеспечивает возврат части газообразного CO_2 из гидросферы обратно в атмосферу [1].

Именно характер продовольствия, как базовый показатель жизнедеятельности человека, выступает основным индикатором социально-экономического развития России. Проблема обеспечения населения продуктами питания в сохранения баланса с природными экосистемами требует инновационных решений [5,15]. Использование потенциала фотосинтезирующих микроорганизмов, таких как водоросли и цианобактерии, которые способны поглощать углекислый газ и превращать его в органическое вещество, позволяет быстро синтезировать ценные биопродукты и может стать альтернативой традиционным источникам кормов. Биомасса фотосинтезирующих микроорганизмов содержат большое количество белков, углеводов, липидов, витаминов и других биологически активных веществ, что делает их перспективным источником ингредиентов для кормов и кормовых добавок для сельскохозяйственных животных [5,9,20].

Дефицит белка в рационах человека и сельскохозяйственных животных является одной из глобальных проблем в современной экономике и актуальна во всем мире [2,12]. В Мордовии дефицит протеина, макроэлементов и витаминов в кормах для поросят составляет 25–90% [3]. В Беларуси дефицит сырого протеина в кормах молочного скота зимой достигает 40% [13], что приводит к потере 30–35% молока [14]. Также удлиняется сервис-период молочного скота, увеличивается возраст первого отёла. А также, если содержание белка в рационе жвачных животных составляет 20–25 %, это приводит к снижению производства продукции на 30–34 %, увеличению себестоимости продукции в 1,5 раза и повышению расхода кормов в 1,3–1,4 раза по сравнению со сбалансированным по протеину рационом [4,6,7]. Дефицит протеина в корме также влияет на нормальное функционирование органов и систем, включая механизмы естественной резистентности. Например, у кур недостаток протеина и низкая питательность рациона вызывают расклёв пальцев ног, кожи и тканей тела [11].

Решением данной проблемы может служить внедрение углеродно-нейтральных биотехнологий с использованием микроводоросли *Nannochloris sp.* для перехода к технологиям с нулевым выбросом углерода и получением сырья с высоким содержанием «одноклеточного» белка, который содержит все необходимые аминокислоты и превосходит по качеству другие кормовые продукты [21]. Урожай биомассы микроводорослей с 1 га как сырья по содержанию белка равен урожаю пшеницы с 25 га и картофелю с 10 га [2]. Питательная ценность 1 кг биомассы микроводорослей в целом равнозначна 4–5 кг сои. При добавлении 5–7 кг массы сухого вещества микроводоросли к 1 т зерна биологическая ценность последнего возрастает в 1,5 раза [16].

Цель данной работы: исследовать влияние содержания бикарбонатного углерода на накопление белка в биомассе *Nannochloris sp.* в стационарной фазе роста при культивировании.

Материалы и методы исследований.

Для выполнения поставленной цели использовали культуру одноклеточных водорослей *Nannochloris sp. Naumann* штамм IPPAS C-1509 из коллекции Балтийского федерального университета имени Иммануила Канта (г. Калининград).

Культивирование.

Культивирование микроводорослей *Nannochloris sp.* осуществляли в лабораторном фотобиореакторе (ФБР) цилиндрической формы с размерными параметрами (0.40×0.1 м) и объемом 1 л [22].

Цикл культивирования культуры составлял 10 сут; концентрация вносимой маточной культуры – 0,3-0,5 млн. клеток/мл. В качестве питательной среды использовали среду Заррука, модифицированную по микроэлементному составу и концентрации NaHCO_3 , которая варьировалась от 0,2 до 0,4 моль/л (с шагом 0.05 моль/л) (табл. 1). В качестве контроля сравнения использовали среду Заррука без добавок NaHCO_3 [1].

Таблица 1

Состав модифицированной питательной среды Заррука [17]

<i>Макроэлементы</i>			
Вещество	Количество массы вещества в питательной среде (г/л)	Молекулярная масса (г/моль)	Концентрация вещества в маточном растворе (моль/л)
NaHCO_3	0.0÷33.6	0.0÷168.00	0.0÷0.4
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1	228.23	$4.4 \cdot 10^{-3}$
NaNO_3	2.5	84.99	$2.9 \cdot 10^{-2}$
K_2SO_4	1	174.25	$5.7 \cdot 10^{-3}$
NaCl	1	58.44	$1.7 \cdot 10^{-2}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	246.48	$8.1 \cdot 10^{-4}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.04	147.01	$2.7 \cdot 10^{-4}$
<i>Микроэлементы 1</i>			
H_3BO_3	2.86	61.83	$4.6 \cdot 10^{-2}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81	197.91	$9.1 \cdot 10^{-3}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22	287.53	$7.8 \cdot 10^{-4}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.08	249.66	$3.2 \cdot 10^{-4}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1	241.96	$4.1 \cdot 10^{-4}$
<i>Микроэлементы 2</i>			
NH_4VO_3	0.023	116.98	$1.9 \cdot 10^{-4}$
$\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$	0.096	998.80	$9.6 \cdot 10^{-5}$
$\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.048	280.86	$1.7 \cdot 10^{-4}$
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.018	329.84	$5.5 \cdot 10^{-5}$
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.044	182.94	$2.4 \cdot 10^{-4}$
<i>Специальный раствор</i>			
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0249	270.21	$9.2 \cdot 10^{-5}$
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0302	372.24	$8.1 \cdot 10^{-5}$

В процессе культивирования осуществляли барботирование клеточной суспензии воздухом в непрерывном режиме со скоростью 1,5 л/мин. Температурный диапазон культивирования составлял $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$. pH среды поддерживали в диапазоне 8-10 [1].

Световой режим культивирования *Nannochloris sp. Naumann*: «день (16 ч) – ночь (8 ч)». В качестве источников освещения использовали светодиодные матрицы, состоящие из 25 ламп ТИС-15M1P с суммарным световым потоком 2300 Лм и суммарной мощностью светового потока 11 000

Лк, которую оценивали с помощью люксметра Ю116 и фотоэлемента Ф55С (ПрофКиП, Россия) [1].

Концентрирование биомассы.

Концентрирование биомассы проводили центрифугированием на аппарате ЦЛн-16 в режиме 6000 об/мин в течение 10 мин. с дальнейшим декантированием надосадочной жидкости. Биомасса промывалась дистиллированной водой для удаления остаточной питательной среды.

Определение содержания белковых веществ в биомассе.

К 10 мг лиофилизированной биомассы добавляли 10 мл дистиллированной воды. Дезинтеграцию клеток осуществляли на механическом гомогенизаторе при 5000 об/мин в течение 2 минут с охлаждением льдом. Затем проводили центрифугирование при 8000 об/мин в течение 15 минут для отделения белковых веществ. Для определения белковых веществ использовали метод [11]. Для получения калибровочной зависимости использовали яичный альбумин (ЯА) и серию разведений с концентрацией белка в субстрате от 10 до 50 мкг/мл. В 0,1 мл белкового субстрата вносили 5 мл реактива Bradford, выдерживали 10 мин при комнатной температуре для образования окрашенного комплекса и измеряли оптическую плотность при 595 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-1280. Концентрацию белка рассчитывали по калибровочному графику [10].

Полученные результаты и их обсуждение.

Полученные результаты отображены на рис. 1, который демонстрирует зависимость накопления белка от концентрации HCO_3^- в питательной среде в процессе культивирования. Максимальная концентрация белковых веществ в биомассе достигается при культивировании *Nannochloris sp.* в питательной среде с концентрацией HCO_3^- 0,35 моль/л. Установлена линейная корреляция концентрации HCO_3^- в питательной среде и содержания белковых веществ в полученной биомассе. Однако, использование концентраций HCO_3^- свыше 0,35 моль/л вызывает снижение содержания белка в биомассе. Таким образом, для получения наибольшего содержания белка в биомассе *Nannochloris sp.* наиболее эффективной концентрацией HCO_3^- в питательной среде является 0,35 моль/л.

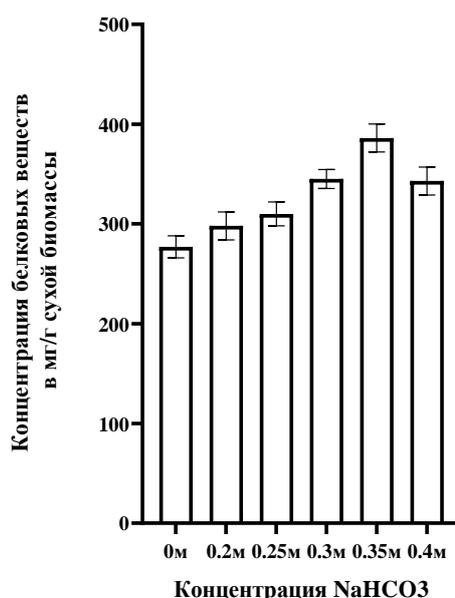


Рисунок 1. Зависимость содержания белковых веществ в биомассе *Nannochloris sp.* от концентрации HCO_3^- в питательной среде в процессе культивирования

Полученные результаты согласуются с данными, полученными ранее авторами Медведевой А.С, Синетовой М.А. и Сидоровом Р.А., которые установили, что культура *Nannochloris sp.* способна накапливать белок в количестве 400-500 мг/г (в экспоненциальной фазе роста) и 300 мг/г (в стационарной фазе) в условиях направленного культивирования на питательных средах с добавками HCO_3^- в количестве 0,2 моль/л [8].

Заключение.

Результаты исследований влияние содержания растворенного диоксида углерода на накопление белка в биомассе *Nannochloris sp.* в стационарной фазе роста позволили выявить критическую концентрацию HCO_3^- , при которой достигается максимальное содержание белковых веществ в полученной биомассе. Полученные результаты согласуются с литературными данными и открывают перспективы использования культуры *Nannochloris sp.* для производства высокобелковых кормовых ингредиентов.

Библиографический список

1. Базарнова Ю.Г., Левчук О.Р., Гинак А.И. Кинетические закономерности поглощения HCO_3^- и роста биомассы *Nannochloris sp.* Naumann IPPAS C-1509 в условиях направленного культивирования. *Бутлеровские сообщения*. 2023. Т.76. №12. С.83-92. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/23-76-12-83
2. Ганущенко О. Ф., Соболев Д. Т. Организация рационального кормления коров с использованием современных методов контроля полноценности их питания. – 2016.
3. Гурьянов, А.М. Оптимизация уровня белково–витаминно–минеральных добавок в рационах молодняка свиней / А.М. Гурьянов, В.А. Кокорев, А.В. Борин // Животноводство и ветеринарная медицина; ФГБНУ Мордовский НИИСХ. – Саранск. – 2016. – С. 29–37.
4. Кузнецова Е. А., Череповицына А. А. Утилизация углекислого газа и циркулярная экономика: мир, Россия, Арктика //Север и рынок: формирование экономического порядка. – 2021. – №. 4. – С. 42.
5. Кузьминых, А.Н. Урожайность и качество викозлаковых агроценозов в условиях дерново–подзолистой почвы Нечерноземной зоны / А.Н. Кузьминых, Г.И. Пашкова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2017. – С. 52–55.
6. Кучин, Н.Н. Проблемы дозирования сыпучих консервантов / Н.Н. Кучин., М.С. Жужин, А.Н. Смирнов // Вестник НГИЭИ. – 2016. – №6 (61). – С. 60–65.
7. Марков С. А. Использование водорослей для получения биотоплива и удаления избытка углекислого газа из атмосферы //Альтернативная энергетика и экология. – 2009. – №. 2. – С. 83-90.
8. Медведева А. С. и др. Характеристика биотехнологического потенциала штаммов цианобактерий и микроводорослей коллекции IPPAS //Биотехнология. – 2019. – Т. 35. – №. 3.
9. Музафаров, А.М. Культивирование и применение микроводорослей / А.М. Музафаров, Т.Т. Таубаев. – Ташкент: Фан УзССР. – 1984. – 136 с.
10. Невмержицкая, Ю.Ю. Практикум по физиологии и биохимии растений (белки и ферменты): Учебно-методическое пособие / Ю.Ю. Невмержицкая, О.А. Тимофеева. – К: Казанский университет, 2012. – 3 с.
11. Нуралиев, Е.Р. Производственные опыты по изучению мер борьбы и профилактики каннибализма кур в промышленном птицеводстве / Е.Р. Нуралиев, И.И. Кочиш // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2017. – №3. – С. 117–120.
12. Остякова М. Е. Болезни обмена веществ крупного рогатого скота, связанные с неполноценным кормлением //Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2015. – №. 12. – С. 195-198.

13. Райхман, А.Я. Эффективность использования злаково–бобового сена и сенажа в рационах лактирующих коров / А.Я. Райхман // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. Ч. 1. – Горки: БГСХА. – 2017. – С. 238–246.
14. Соболева, Н.В. Качество кормов из люцерны посевной и козлятника восточного / Н.В. Соболева, И.А. Бабичева, С.В. Карамаев, А.С. Карамаева // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2016. – С. 103–105.
15. Шинкевич П. С., Политаева Н. А. Применение микроводорослей в ССУ технологиях // Рациональное использование природных ресурсов и переработка техногенного сырья: фундаментальные проблемы науки, материаловедение, химия и биотехнология. – 2023. – С. 329–334.
16. Яковлева, Т.В. Применение суспензии хлореллы в кормлении свиней / Т.В. Яковлева, Л.А.Яковлев // Ученые записки УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»: науч.–практ. журнал. – Витебск. – 2013. – Т. 49, вып. 2, ч. 1. – С. 264–268.
17. C. Rajasekaran et al. Effect of modified Zarrouk’s medium on growth of different Spirulina strains. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*. 2016. Vol.13. No.1. P.67-75. DOI:10.14456/WJST.2016.7
18. Dewan, A. Growth kinetics of microalgae in microfluidic static droplet arrays / A. Dewan, J. Kim, DOI: 10.1016/ 2020.101235
19. Kent, M. Nutritional evaluation of Australian microalgae as potential human health supplements / M. Kent, H.M. Welladsen, A. Mangott, Y. Li // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, No. 2: e0118985.
20. R.H. McLean, S.A. Vanapalli, M.N. Karim // *Biotechnol. Bioeng.* – 2012. – Vol. 109, No. 12. – P. 2987–2996.
21. Suman, G. Single cell protein production: A review / G. Suman, M. Nupur, S. Anuradha, B.Pradeep // *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* – 2015. – Vol. 4. – P. 251–262.
22. Z. Wang et al. Comparison of photosynthetic carbon fixation of *Nannochloropsis oceanica* cultivated with carbon suppliers: CO₂, NaHCO₃ and CH₃OH. *Journal of CO₂ Utilization*. 2020. Vol.41. 101235.

УДК 579.222.4

ИЗВЛЕЧЕНИЕ ИОНОВ НИКЕЛЯ ИЗ МЕТАЛЛОПОРФИРИНА АКТИНОМИЦЕТАМИ РОДА *RHODOCOCCUS*

М.В. Макарова^{1,2}, *М.С. Куюкина*^{1,2}, *И.Б. Ившина*^{1,2}

¹«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Исследована способность коллекционных штаммов родококков деметаллизировать металлопорфирин никеля. Определен пик поглощения Соре при длине волны 392 нм. Наиболее эффективно извлечение ионов металла происходит в водной фазе штаммами *R. cerastii* ИЭГМ 1278 и *R. qingshengii* ИЭГМ 1359.

Ключевые слова: актиномицеты, родококки, порфирины, деметаллизация, никель.

EXTRACTION OF NICKEL IONS FROM METALLOPORPHYRIN BY ACTINOMYCETES OF THE GENUS *RHODOCOCCUS*

M.V. Makarova^{1,2}, *M.S. Kuyukina*^{1,2}, *I.B. Ivshina*^{1,2}

¹*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Perm, Russia*

²*Microbiology and Immunology Department, Perm State University, Perm, Russia*

The ability of collection strains of *Rhodococcus* to demetallize nickel metalloporphyrin was studied. The Soret absorption peak was determined at a wavelength of 392 nm. The most efficient extraction of metal ions occurs in the aqueous phase by strains *R. cerastii* IEGM 1278 and *R. qingshengii* IEGM 1359.

Keywords: actinomycetes, *Rhodococcus*, porphyrins, demetallization, nickel.

В процессе переработки сырой нефти измеримые количества металлов, которые могут присутствовать в формах солей и металлоорганических фракций, концентрируются при выпаривании легких фракций, что приводит к двум основным проблемам: (1) при утилизации нефтеотходов методом сжигания образуются золы с высокой концентрацией оксидов металлов и (2) при каталитическом крекинге металлы откладываются на катализаторах, в результате чего происходит снижение их селективности и производительности. Среди металлоорганических соединений нефти наиболее распространены ванадий и никельсодержащие комплексы. В то время как свободные соли металлов, присутствующие в нефти в виде неорганических водорастворимых форм, удаляются водной фазой, для удаления металлопорфиринов требуются дополнительные методы очистки (селективная экстракция, каталитическая гидроочистка и др.). Гидродеметаллизация металлоорганических фракций протекает при высоком давлении водорода и повышенной (400 °С) температуре. Каталитическое гидродеметаллирование металлопорфиринов селективно удаляет соединения металлов в виде отложений сульфидов на поверхности катализатора. Биодеметаллизация металлопорфиринов по сравнению с химическими методами протекает в более мягких условиях и не вызывает вторичное загрязнение окружающей среды [5-9].

Актиномицеты рода *Rhodococcus* обладают высокой устойчивостью к воздействию экотоксикантов (углеводородов нефти, фармполлютантов, солей и наночастиц металлов,

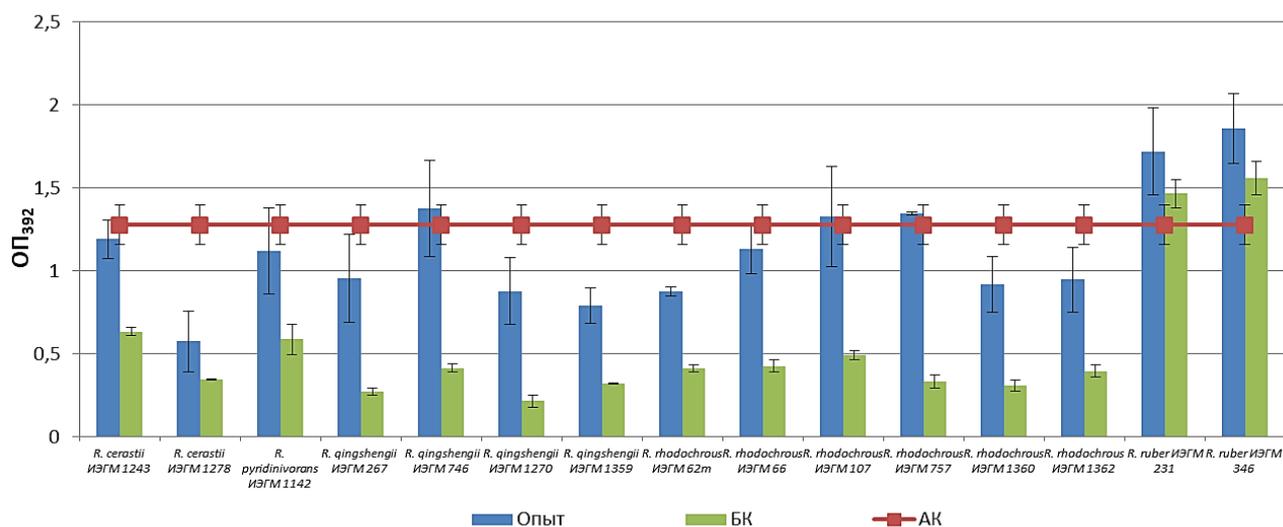
органических растворителей и пестицидов) [1,2]. Родококки обладают устойчивостью к ионам никеля (до 10.0 мМ) и способны извлекать из среды до 60-95% ионов металла [3].

На основе ранее проведенных исследований [4] для работы отобраны штаммы *R. cerastii* ИЭГМ 1243, ИЭГМ 1278; *R. pyridinivorans* ИЭГМ 1142; *R. qingshengii* ИЭГМ 267, ИЭГМ 746, ИЭГМ 1270, ИЭГМ 1359; *R. rhodochrous* ИЭГМ 62^r, ИЭГМ 66, ИЭГМ 107, ИЭГМ 757, ИЭГМ 1360, ИЭГМ 1362; *R. ruber* ИЭГМ 231, ИЭГМ 346 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, WFCC #285, ЦКП 480868, УНУ 73559, <http://www.iegmcoll.ru>). В геномах данных штаммов обнаружен ген *qcrC*, кодирующий С субъединицу убихинол-цитохром С редуктазы. Установлено, что данный белок входит в белковый комплекс, участвующий в переносе электронов в дыхательной цепи, и, возможно, он является полифункциональным – восстанавливает не только убихинол-цитохром С, но и органические соединения металлов.

Бактериальные культуры выращивали на МПА при 28°C в течение 3 сут, суспензии готовили в 3мМ КН₂РО₄ (рН3) буфере до значения оптической плотности (ОП₆₀₀), равной 0,5. Синтетический металлопорфирин 2,3,7,8,12,13,17,18-октаэтил-21Н,23Н-порфин никель(II) (NiOEP) (Macklin, Китай) растворяли в дихлорметане.

После выпаривания дихлорметана были добавлены реакционные смеси. Реакционные смеси содержали металлопорфирин (конечная концентрация 17 мкМ), смесь толуол:изопропанол:бактериальная суспензия в пропорциях 15:60:25 и Н₂О₂ (конечная концентрация 0,003%). Смеси инкубировали в течение суток при перемешивании в темноте. После образцы центрифигировали (7000 об./мин, 5 мин) для разделения эмульсии на водную и органическую фазы на центрифуге Mikro 22R (“Hettich Zentrifugen”, Германия). Для определения оптической плотности использовали спектрофотометр Lambda EZ201 (UV/Vis) (Perkin-Elmer, США). Извлечение ионов металла детектировали по изменению пика поглощения *Sore* при длинах волн 392 нм [9] и 410 нм [7] для водной и органической фаз. Снижение оптической плотности (пика *Sore*) в водной фазе свидетельствует о разрушении порфириновых колец и выходе свободного никеля [8]. Степень разложения порфирина никеля также определяли по разнице в поглощении между 557 и 540 нм, поскольку порфирин никеля подобен протогему, который характеризуется высотой пика над впадиной, лежащей между данными пиками [9].

По нашим данным (рис. 1, 2), длина волны 410 нм не попадала в пик поглощения *Sore*, при этом максимальный пик в абиотическом контроле (АК) наблюдался в органической фазе при длине волны 392 нм. Наиболее эффективно бактериальная демеетализация NiOEP происходила в водной фазе (снижение пика *Sore* при длине волны 392 нм до 55%), тогда как в органической фазе пик поглощения снижался только на 20%. Аналогичные изменения наблюдались при демеетализации порфирина ванадия с помощью клеток *Aspergillus* sp. [8].



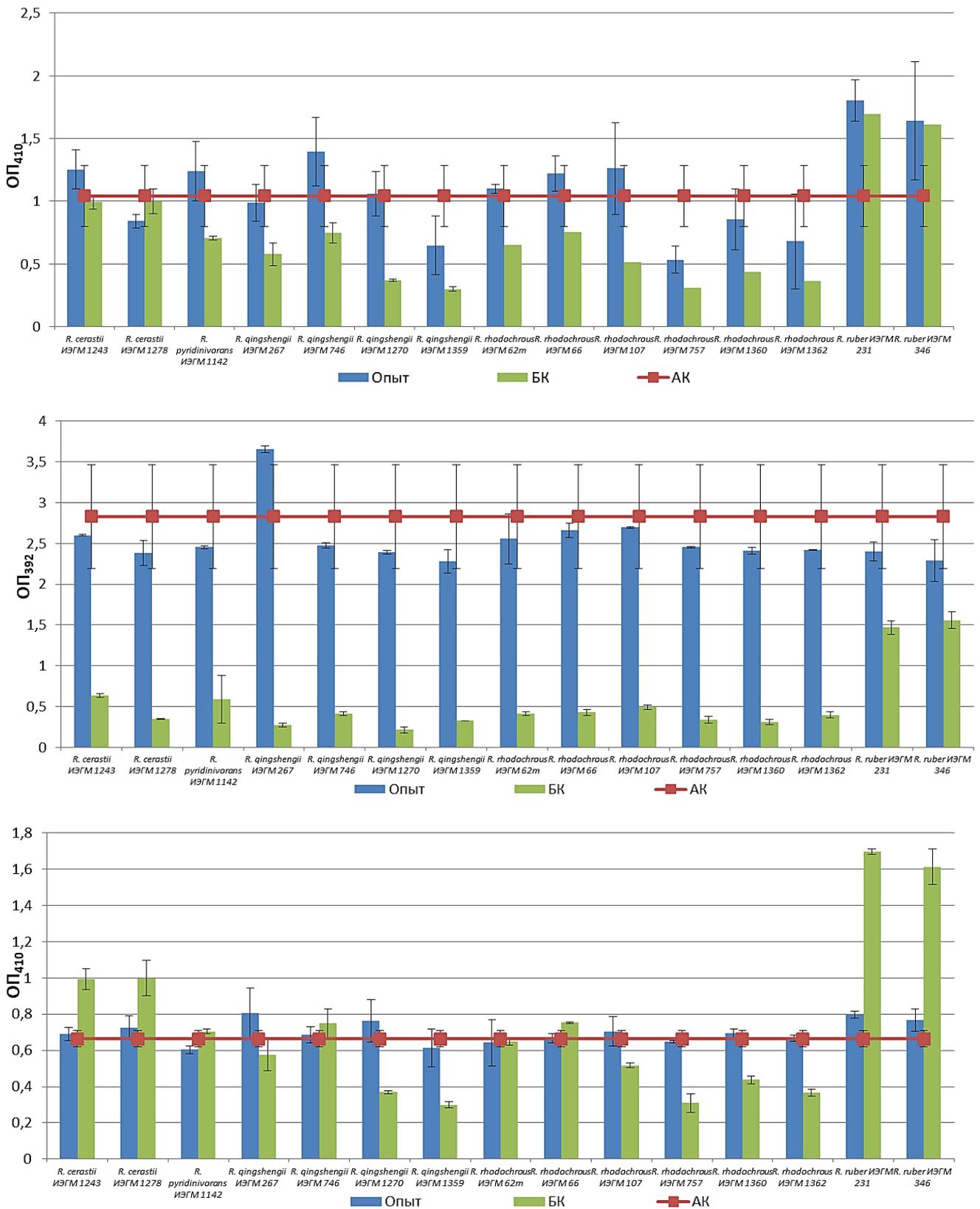


Рис. 2. Изменение ОП органической фазы

Среди исследованных родококков наибольшая эффективность процесса биодеметаллизации NiOEP отмечена для *R. cerastii* ИЭГМ 1278 и *R. qingshengii* ИЭГМ 1359,

причем степень разложения порфирина никеля в присутствии данных штаммов была выше в органической фазе, чем в водной. Культуры *R. cerastii* ИЭГМ 1278 и *R. qingshengii* ИЭГМ 267 проявляли наибольшую эффективность по разложению порфирина в водной фазе, тогда как штаммы *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 и *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 были более эффективны в органической фазе (рис. 3). Для оптимизации процесса деме­таллизации NiOEP была составлена бактериальная ассоциация *R. cerastii* ИЭГМ 1278 и *R. qingshengii* ИЭГМ 1359, однако ее эффективность оказалась ниже, чем у каждого из штаммов (рис. 4), что требует дальнейшего исследования.

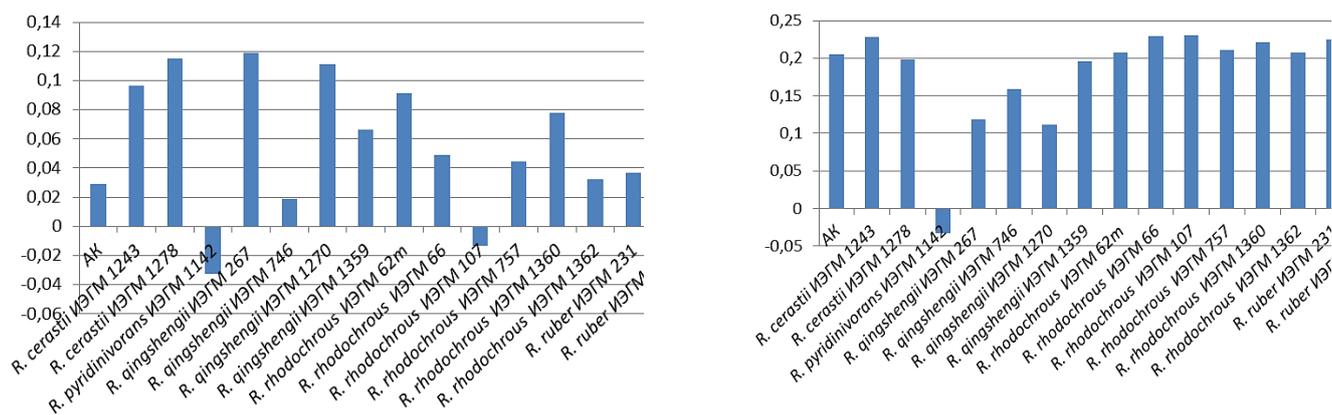


Рис. 3. Разница ОП при длинах волн 557 и 540 нм водной (слева) и органической (справа) фазы

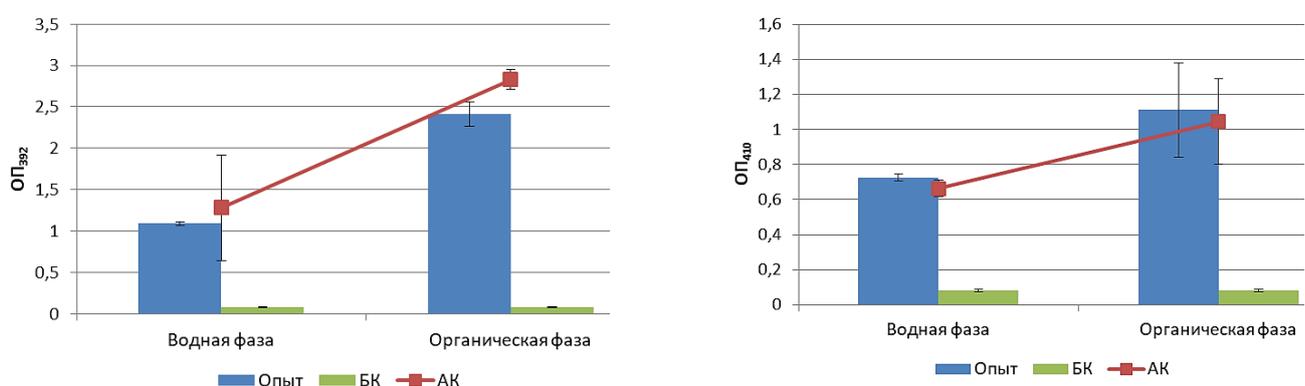


Рис. 4. Изменение ОП водной и органической фазы при длинах волн 392 нм (слева) и 410 нм (справа) при использовании ассоциации *R. cerastii* ИЭГМ 1278 и *R. qingshengii* ИЭГМ 1359

Таким образом, полученные результаты подтверждают способность родококков к извлечению ионов никеля из синтетического металлопорфирина. Отобраны штаммы *R. cerastii* ИЭГМ 1278 и *R. qingshengii* ИЭГМ 1359, пригодные для деме­таллизации органических фракций нефти.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания 124020500028-4, FSNF–2023–0004, а также при финансовой поддержке Министерства образования и науки Пермского края (Соглашение № 26/827).

Библиографический список

1. Ившина И.Б., Куюкина М.С., Каменских Т.Н., Криворучко А.В., Тюмина Е.А., Елькин А.А. Угледородокисляющие родококки: особенности биологической организации под

- воздействием экополлютантов. Атлас-монография / Под ред. И.Б. Ившиной. УрО РАН, 2021. С. 140
2. Коршунова И.О., Писцова О.Н., Куюкина М.С., Ившина И.Б. Влияние органических растворителей на жизнеспособность и морфофункциональные свойства родококков // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. №1. С. 1–9.
 3. Литвиненко Л.В. Способность актинобактерий родов *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus* аккумулировать ионы никеля // Микробиология. 2019. Т. 88. №2. Р. 207-126.
 4. Макарова М.В., Куюкина М.С., Криворучко А.В. Внутриклеточное восстановление ионов никеля и ванадия актинобактериями рода *Rhodococcus* // Фундаментальные и прикладные аспекты биологии: сборник статей Международной конференции ученых-биологов (г. Пермь, ПГНИУ 30 октября – 03 ноября 2023 г.). Пермь, 2024. С. 67-71.
 5. Мустафина Э.А., Полетаева О.Ю., Мовсумзаде Э.М. Тяжелые металлоносные нефти и их деметаллизация // НефтеГазоХимия. 2014. №4. С. 15-18.
 6. Mandal P. C., Goto M., Sasaki M. Removal of Nickel and Vanadium from Heavy Oils Using Supercritical Water // Journal of the Japan Petroleum Institute. 2014. V. 57. №1. P. 18-28.
 7. Mogollon L., Rodriguez R., Larrota W., Ortiz C., Torres R. Biocatalytic removal of nickel and vanadium from petroporphyrins and asphaltenes // Appl. Biochem. Biotechnol. 1998. V. 70-72. P. 765-777.
 8. Salehizadeh H., Mousavi M., Hatamipour S., Kermanshahi K. Microbial Demetallization of Crude Oil Using *Aspergillus* sp.: Vanadium Oxide Octaethyl Porphyrin (VOOEP) as a Model of Metallic Petroporphyrins // Iranian Journal of Biotechnology. 2007. V.5. №4. P. 226-231.
 9. Xu G.W., Mitchell K.W., Monticello D.J. Process for demetalizing a fossil fuel. USA Patent. 1996. 21 p.

УДК 579.264

ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРА АНТИФУНГАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ БАЦИЛЛЯРНОГО КОНСОРЦИУМА ИЗ НОВОГО ОПЫТНОГО БИОПРЕПАРАТА

А.В. Малкова

ИЦ «Промбиотех», Алтайский государственный университет, Барнаул, Российская Федерация

В работе представлены сведения по оценке антагонистического действия микробной композиции на основе 3-х штаммов *Bacillus pumilus* из состава нового биопрепарата для растениеводства по отношению к фитопатогенным микромицетам. Антифунгальное действие бациллярного консорциума определяли методами параллельных штрихов и колодцев. В результате проведенных исследований установили антимикотическое действие бактериальной композиции из опытного препарата по отношению к 82 % исследуемых тест-культур (9 из 11 штаммов) – *Fusarium solani*, *Pythium sp.*, *Alternaria solani*, *F. graminearum*, *A. tenuissima*, *Penicillium sp. 1*, *Botrytis sp.*, *Penicillium sp. 2* и *A. brassicae*.

Ключевые слова: антифунгальная активность, антагонизм, *Bacillus*, биопрепарат, микромицеты.

STUDY OF THE SPECTRUM OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF BACILLARY CONSORTIUM FROM A NEW EXPERIMENTAL BIOPREPARATION

A.V. Malkova

Prombiotech Engineering Center, Altai State University, Barnaul, Russian Federation

The paper presents data on the evaluation of antagonistic effect of microbial composition based on 3 strains of *Bacillus pumilus* from the composition of a new biopreparation for crop production in relation to phytopathogenic micromycetes. The antifungal effect of the bacillary consortium was determined by parallel stroke and well methods. As a result of the conducted studies, the antimycotic effect of the bacillary composition from the experimental preparation was established against 82 % of the tested test cultures (9 out of 11 strains) - *Fusarium solani*, *Pythium sp.*, *Alternaria solani*, *F. graminearum*, *A. tenuissima*, *Penicillium sp. 1*, *Botrytis sp.*, *Penicillium sp. 2* and *A. brassicae*.

Keywords: antifungal activity, antagonism, *Bacillus*, biopreparation, micromycetes.

Введение.

Инфекционные болезни растений наносят огромный ущерб агропромышленному комплексу Российской Федерации. В годы эпифитотий потери урожая от микробных заболеваний могут составлять более 50 %. Возбудители болезней растений в основном распространяются через почву и с семенным материалом. А заражение семян может произойти как при хранении, так и в ходе вегетации или уборки урожая [3, 5].

В зависимости от инфектанта болезни растений подразделяются на грибные (микозы), бактериальные (бактериозы) и вирусные (вириозы). При этом зафиксировано, что более 80 % инфекционных заболеваний растений по своей природе являются грибковыми. Основными возбудителями микозов являются грибы родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Bipolaris*, *Penicillium*, *Aspergillus* и пр. [8, 10, 11].

Для защиты растений от болезней разработан целый ряд мероприятий, который включает агротехнические, химические, карантинные и прочие меры для профилактики и борьбы с распространением инфекций. И в последние годы в сельском хозяйстве активно внедряются биологические методы защиты растений, в частности связанные с применением микробных препаратов [1, 9].

В отечественных и зарубежных исследованиях многократно подтверждены экологическая безопасность и эффективность биопрепаратов при борьбе с возбудителями инфекционных заболеваний растений. Основные механизмы действия микробных препаратов связаны с антагонистической активностью бактерий или микромицетов из их состава по отношению к фитопатогенным микроорганизмам, а также способностью увеличивать устойчивость растений к возбудителям инфекций [2, 7].

Цель работы – изучить спектр антимикотической активности бациллярного консорциума из нового опытного биопрепарата для предпосевной обработки семян.

Материалы и методы.

В качестве объекта исследования использовали опытный биопрепарат «Фитопумилин» (каталожный лист продукции № 080.007967) для предпосевной обработки семян, содержащий в своей основе микробную композицию на основе 3-х ризосферных штаммов бацилл: *B. pumilus* RCAM05516, *B. pumilus* RCAM05517 и *B. pumilus* ВКПМ В-13250 (Патент РФ № 2797825, Патент РФ № 2797699, Патент РФ № 2694522). Тест-культуры были предоставлены Всероссийским научно-исследовательским институтом сельскохозяйственной микробиологии в количестве 11 штаммов фитопатогенных микромицетов: *F. solani*, *Pythium sp.*, *A. niger*, *A. solani*, *F. graminearum*, *A. tenuissima*, *Penicillium sp. 1*, *F. sporotrichioides*, *Botrytis sp.*, *Penicillium sp. 2* и *A. brassicae*.

Антагонистическое действие бациллярного консорциума устанавливали методами параллельных штрихов [6] и колодцев [4]. Предварительно готовили 1 %-ный рабочий раствор биопрепарата из лиофилизированного концентрата бактерий с титром не менее 1×10^{11} КОЕ/г и стерильной дистиллированной воды. Оба эксперимента проводили с использованием питательной среды PDA (Potato Dextrose Agar, картофельно-декстрозный агар).

В случае с методом параллельных штрихов в центре чашки с агаризованной средой устанавливали блок с тест-культурой. Далее на расстоянии 2–3 см от центра проводили 2 вертикальных штриха бацилл из рабочего раствора биопрепарата. При постановке метода колодцев микромицеты глубинно засевали в толще среды. После застывания агара в опытных чашках при помощи микробиологического пробойника делали колодцы и вносили в них по 100 мкл рабочего раствора опытного биопрепарата. В качестве контроля использовали чашки, в которые засевали только блоки или газоны микроскопических грибов. Экспериментальные чашки культивировали в течение 10–14 суток при 25 °С с периодическим отслеживанием особенностей роста микроорганизмов в опыте и контроле.

Результаты с применением метода колодцев выражали в зонах подавления роста микромицетов (мм). В случае с методом параллельных штрихов результаты выражали через показатель подавления роста микромицетов A (%), определяемый по формуле (1):

$$A = \frac{Sk - So}{Sk} \times 100 \%, \quad (1)$$

где Sk – площадь мицелия микромицета в контроле;

So – площадь мицелия микромицета в опыте.

Результаты и обсуждение.

В связи с особенностями роста мицелия исследуемых микромицетов антагонизм бактериальной композиции из нового опытного биопрепарата методом колодцев устанавливали по отношению к штаммам *F. solani*, *Pythium sp.*, *A. niger*, *A. solani*, *F. graminearum*, *A. tenuissima*, *Penicillium sp. 1* и *F. sporotrichioides*. А методом параллельных штрихов – по отношению к штаммам *Botrytis sp.*, *Pythium sp.*, *Penicillium sp. 2*, *F. graminearum* и *A. brassicae*. Численные результаты представлены на рисунках 1 и 2.

Для опытного биопрепарата зафиксировали антимикотическую активность почти ко всем исследованным штаммам грибов (кроме *A. niger* и *F. sporotrichioides*). При этом этот эффект проявился по-разному – в виде образования зон отсутствия роста микромицетов (*F. solani*, *A. solani*, *F. graminearum*, *A. tenuissima*, *Penicillium sp. 1*), уменьшения размера их колоний (*Botrytis sp.*, *Pythium sp.*, *A. brassicae*), снижения интенсивности окраски грибов (*Penicillium sp. 2*).

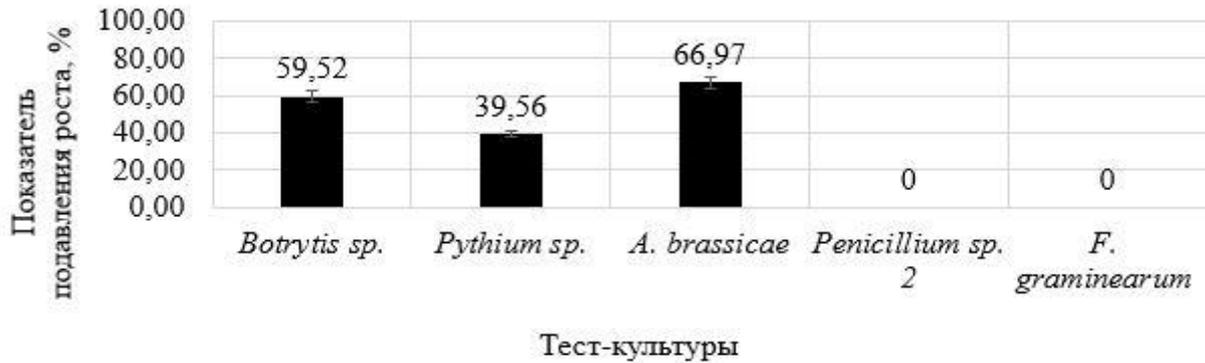


Рис. 1. Антимикотическая активность опытного биопрепарата, установленная методом параллельных штрихов

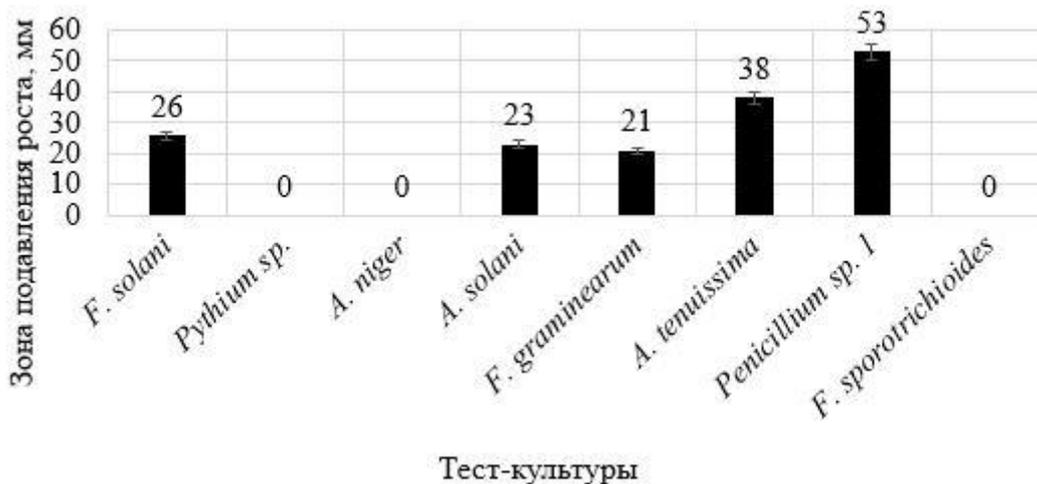


Рис. 2. Антимикотическая активность опытного биопрепарата, установленная методом колодцев

Методом колодцев для прототипа препарата зафиксировали самый сильный антагонистический эффект по отношению к *Penicillium sp. 1* (зона подавления роста микромицета – 53 мм в среднем), а методом параллельных штрихов – по отношению к *A. brassicae* (показатель подавления роста микромицета – почти 67 %).

Кроме того, в опытных чашках с *A. brassicae* отметили изменение окраски штрихов бактерий в непосредственной близости с микромицетом – с бело-кремовой на желтую (рис. 3), что вероятно связано с продукцией антифунгальных или защитных соединений.

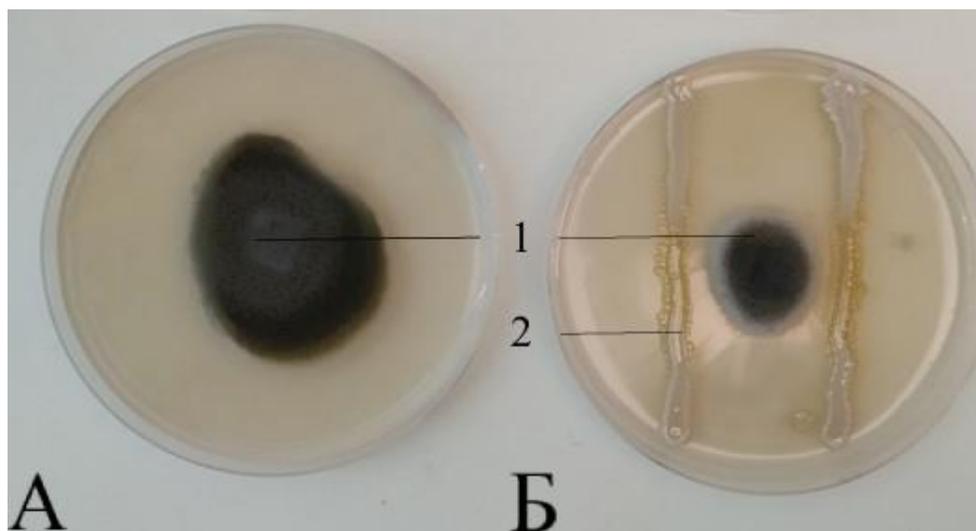


Рис. 3. Экспериментальные чашки с *A. brassicae* через 14 суток культивирования:
А – контрольная, Б – опытная: 1 – микромицет, 2 – штрих бацилл

Со штаммами *Pythium sp.* и *F. graminearum* зафиксировали антагонистическое действие бацилл из нового биопрепарата только при использовании одного метода. Что подтверждает необходимость в использовании различных техник и штаммов тест-культур при определении спектра антагонистической активности микроорганизмов.

Заключение.

Таким образом, разработанный поликомпонентный биопрепарат на основе бактерий рода *Bacillus* обладает достаточно широким спектром антагонистической активности по отношению к фитопатогенным микромицетам. В рамках данного исследования выявили антимицотическое действие бациллярного консорциума из нового опытного препарата против 82 % исследуемых тест-культур (9 из 11 штаммов) – *Penicillium spp.* (2 штамма), *Alternaria spp.* (3 штамма), *Fusarium spp.* (2 штамма), *Pythium sp.* и *Botrytis sp.* Однако для составления более полной картины о возможной эффективности исследуемого биопрепарата необходимы дальнейшие исследования.

Библиографический список

1. Дорохов А.С., Старостин И.А., Ещин А.В. Перспективы развития методов и технических средств защиты сельскохозяйственных растений // *Агроинженерия*. – 2021. – № 1 (101). – С. 26–35.
2. Минаева О.М., Акимова Е.Е., Зюбанова Т.И., Терещенко Н.Н. Биопрепараты для защиты растений: оценка качества и эффективности. – Томск: Издательство ТГУ. – 2018. – 130 с.
3. Сокирко В.П., Горьковенко В.С., Зазимко М.И. Фитопатогенные грибы (морфология и систематика). – Краснодар: Издательство КГАУ. – 2014. – 178 с.
4. Чеботарь В.К., Ерофеев С.В., Щербаков А.В., Чижевская Е.П. Патент 2551968 Российская Федерация МПК51 С 12 N 1/20, С 12 R 1/07. Штамм бактерий *Bacillus pumilus* А 1.5, в качестве средства повышения продуктивности растений и их защиты от болезней, вызываемых фитопатогенными микроорганизмами. – 2015. – Бюл. № 16. – 12 с.
5. Черткова В.В. Болезни, передающиеся семенами яровой пшеницы в зауралье // Сборник статей по материалам XIII всероссийской (национальной) научно-практической конференции молодых ученых «Развитие научной, творческой и инновационной деятельности молодежи». – Курган. – 2021. – С. 114–117.
6. Anith K.N., Nysanth N.S., Natarajan C. Novel and rapid agar plate methods for in vitro assessment of bacterial biocontrol isolates' antagonism against multiple fungal phytopathogens // *Letters in Applied Microbiology*. – 2021. – Vol. 73. – Is. 2. – P. 229–236. doi:10.1111/lam.13495

7. Caulier S., Gillis A., Colau G., Licciardi F., Liepin M., Desoignies N., Modrie P., Legreve A., Mahillon J., Bragard C. Versatile Antagonistic Activities of Soil-Borne *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. against *Phytophthora infestans* and Other Potato Pathogens // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – Ar. 143.
8. Johnston-Monje D., Gutierrez J.P., Lopez-Lavalle L.A.B. Seed-Transmitted Bacteria and Fungi Dominate Juvenile Plant Microbiomes // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – Ar. 737616.
9. Maciag T., Koziel E., Rusin P., Otulak-Koziel K., Jafra S., Czajkowski R. Microbial Consortia for Plant Protection against Diseases: More than the Sum of Its Parts // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – Is. 15. – Ar. 12227. doi: 10.3390/ijms241512227
10. Tkalec V., Mahnic A., Gselman P., Rupnik M. Analysis of seed-associated bacteria and fungi on staple crops using the cultivation and metagenomic approaches // *Folia Microbiologica*. – 2022. – Vol. 67. – P. 351–361.
11. Zhang N.A., Yang G., Pan Y., Yang X., Chen L., Zhao C. Review of Advanced Technologies and Development for Hyperspectral-Based Plant Disease Detection in the Past Three Decades // *Remote Sensing*. – 2020. – Vol. 12, N 19. – Ar. 3188.

УДК 579.222.4

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ МОНОТЕРПЕНОИДОВ АКТИНОМИЦЕТАМИ РОДА *RHODOCOCCUS*

П.Ю. Мальцева^{1,2}, Н.А. Плотницкая^{1,2}, А.А. Чудинова², И.В.Ильина³,
Н.Ф. Салахутдинов³, И.Б. Ившина^{1,2}

¹Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Пермь, Россия

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

³Новосибирский институт органической химии имени академика Н.Н. Ворожцова СО РАН,
Новосибирск, Россия

Проведена оценка способности штаммов актиномицетов рода *Rhodococcus sensu stricto* из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним ИЭГМ; УНУ/ЦКП 73559/480868, номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур, <http://www.iegmc.ru>) к биотрансформации растительных монотерпеноидов (–)-изопулегола, (–)-*транс*-карвеола, (–)-*цис*-карвеола и (–)-L-карвона. Отобран штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, обладающий наибольшей целевой каталитической активностью. Конверсия монотерпеноидов сопровождалась реакциями гидроксирования, карбоксилирования и дегидратации с образованием карвона, дигидрокарвона, 10-гидрокси- и 10-карбокси-производных (–)-изопулегола и ряда неидентифицированных соединений. *In silico* анализ полученных производных показал, что полученные метаболиты с высокой степенью вероятности могут проявлять антигельминтную, противоэксземную, ветрогонную, противоопухолевую и иммуносупрессивную активность, а также использоваться в качестве респираторных аналептиков и агентов профилактики рака мочеполовой системы. Начаты исследования, направленные на идентификацию путей трансформации монотерпеноидов и определение функциональных генов и кодируемых ими ферментов. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования родококков для трансформации монотерпеноидов с целью получения новых биологически активных соединений.

Ключевые слова: актиномицеты, биологически активные вещества, биотрансформация, растительные монотерпеноиды, (–)-изопулегол, (–)-*транс*-карвеол, (–)-*цис*-карвеол, (–)-L-карвон, *Rhodococcus*.

Введение. Поиск новых соединений с выраженной биологической активностью, а также новых катализаторов и инновационных технологий, основанных на использовании микроорганизмов, является актуальной проблемой, связанной с недостатком терапевтических средств в отдельных разделах медицины (сердечно-сосудистые, опухолевые, нейродегенеративные заболевания, заболевания иммунной системы и др.). Значительный интерес в качестве субстратов для получения производных с выраженной антимикробной, противопаразитарной, антиоксидантной, противовоспалительной и противоопухолевой активностью представляют монотерпеноиды (–)-изопулегол, (–)-*транс*-карвеол, (–)-*цис*-карвеол и (–)-L-карвон [1,4–6]. Одной из успешно разрабатываемых в биотехнологии групп микроорганизмов являются непатогенные актиномицеты рода *Rhodococcus*. Родококки способны катализировать широкий спектр стерео- и региоселективных реакций и могут быть использованы в качестве эффективных биокатализаторов процессов трансформации растительных три-, ди- и монотерпеноидов [3].

Цель настоящей работы – оценка способности коллекционных штаммов родококков к биотрансформации растительных монотерпеноидов (–)-изопулегола, (–)-*транс*-карвеола, (–)-*цис*-карвеола и (–)-L-карвона.

Материалы и методы. В работе использовали 60 штаммов актиномицетов рода *Rhodococcus* из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним ИЭГМ; УНУ/ЦКП 73559/480868, номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур, <http://www.iegmcoll.ru/strains>), обладающих выраженной каталитической активностью в отношении сложных гидрофобных субстратов.

Реакции трансформации монотерпеноидов осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 100 мл, содержащих 20 мл минеральной среды RS, г/л: K_2HPO_4 – 2,0; KH_2PO_4 – 2,0; KNO_3 – 1,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 2,0; NaCl – 1,0; $MgSO_4$ – 0,2; $CaCl_2$ – 0,02, $FeCl_3 \cdot 7H_2O$ – 0,001, в условиях периодического культивирования на орбитальном шейкере при 160 об/мин и температуре 28°C в течение 7 сут. В среду дополнительно вносили дрожжевой экстракт (0,1 г/л) и микроэлементы по Постгейту (0,1 об. %). (–)-Изопулегол, (–)-*транс*-карвеол, (–)-*цис*-карвеол и (–)-L-карвон использовали в концентрации 0,025 об. %. В отдельных экспериментах применяли специфические ингибиторы цитохром Р450-зависимых оксигеназ (метирапон, кетоконазол) в концентрации 0,1–1,0 мМ.

Для получения отдельных клеточных фракций, родококки, предварительно выращенные в течение 2 сут в МПБ, трижды отмывали и ресуспендировали в фосфатном буфере (рН 7,0). Клетки гомогенизировали с помощью ультразвукового дезинтегратора Soniprep 150 (MSE, Великобритания) при амплитуде 10 мкм в течение 45 мин в условиях охлаждения. Клеточный гомогенат центрифугировали при 6000 об/мин в течение 10 мин для получения цитоплазматических ферментов. Солюбилизацию мембраносвязанных ферментов проводили путём ресуспендирования осадка в 100 мл 1%-ого раствора Тритона X-100 (Sigma-Aldrich, США) в фосфатном буфере (рН 7,0) и перемешивания на орбитальном шейкере в течение 30 мин. Полученную смесь центрифугировали и собирали супернатант с экстрагируемыми мембраносвязанными ферментами. Осадок клеточных соникатов с ферментами, прочно связанными с мембраной, ресуспендировали в 100 мл фосфатного буфера (рН 7,0). Для качественного и количественного анализа остаточных монотерпеноидов и их метаболитов использовали методы тонкослойной хроматографии (ТСХ) и газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) соответственно. *In silico* анализ монотерпеноидов проводили с помощью онлайн-сервиса PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances, <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>) и программы ECOSAR (Ecological Structure Activity Relationship, EPA, США). Полное секвенирование генома штамма-биотрансформатора проводили с использованием секвенатора MiSeq (Illumina, США). Аннотирование и биоинформатический анализ полученных последовательностей проводили с использованием сервиса RAST.

Результаты и обсуждение. В результате проведенного скрининга отобран штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, катализирующий высокоэффективную трансформацию всех исследованных соединений (рис. 1).

При этом биоконверсия (–)-изопулегола (1) сопровождалась реакциями гидроксилирования и карбоксилирования с образованием 10-гидрокси- (2) и 10-карбокси- (3) производных. Биотрансформация (–)-*транс*- (4) и (–)-*цис*-карвеола (7) протекала иначе и включала реакции дегидрирования исходных субстратов до карвона (5) и вещества с m/z 150, предположительно представляющего собой изомерный карвону кетон, соответственно. Последующее гидрирование карвона (5) позволило получить дигидрокарвон (6) и два неидентифицированных метаболита с m/z 166 и m/z 150. У штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 выявлены обширные каталитические возможности, о чем свидетельствует разнообразие катализируемых реакций в отношении структурно схожих соединений. По результатам *in silico* анализа, полученные производные (–)-изопулегола, а также один из продуктов трансформации

(-)-*цис*-карвеола, дигидрокарвон, обладали меньшей степенью гидрофобности и экотоксичности по сравнению с исходными соединениями.

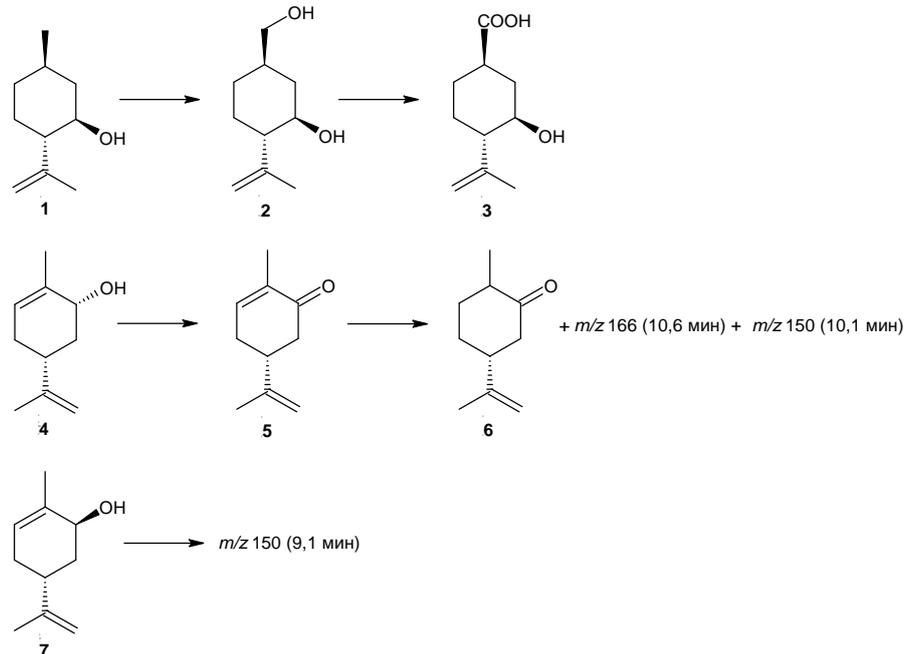


Рисунок 1. Схема биотрансформации монотерпеноидов клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362: **1** – (-)-изопулегол, **2** – 10-гидрокси(-)-изопулегол, **3** – 10-карбоксии(-)-изопулегол, **4** – (-)-*транс*-карвеол, **5** – (-)-L-карвон, **6** – дигидрокарвон, **7** – (-)-*цис*-карвеол

Все полученные производные характеризуются большим потенциалом биологической активности и с высокой степенью вероятности могут проявлять антигельминтную, ветрогонную, иммуносупрессивную, противоопухолевую, противоэксземную активность, а также выступать в роли респираторных аналептиков и агентов профилактики рака мочеполовой системы (табл. 1).

Таблица 1

Предполагаемая биологическая активность монотерпеноидов и их производных

Предполагаемая активность, P_a	(-)-изопулегол 1	10-гидрокси(-)-изопулегол 2	10-карбоксии(-)-изопулегол 3	(-)- <i>транс</i> -, (-)- <i>цис</i> -карвеол 4, 7	(-)-L-карвон 5	дигидрокарвон 6
Аналептическая	0,534	0,470	0,560	0,768	0,599	0,558
Антигельминтная (Нематоды)	0,692	0,663	0,594	0,687	0,737	0,562
Ветрогонная	0,976	0,930	0,928	0,973	0,638	0,961
Иммуносупрессивная	0,755	0,720	0,731	0,773	0,657	0,768
Ингибитор бета-глюкуронидазы	–	0,670	0,714	0,650	0,613	0,646
Отхаркивающее средство	0,484	0,425	0,446	0,789	0,654	0,423
Противоопухолевая	–	0,550	0,482	0,870	0,772	0,776
Противоэксземная	0,929	0,918	0,908	0,911	0,737	0,889
Респираторный аналептик	–	0,568	0,686	0,864	0,577	0,520

Логичным развитием исследований в области биотехнологии является определение участвующих в процессах трансформации ферментов и кодирующих их функциональных генов [2]. С использованием отдельных клеточных фракций родококков и специфических ингибиторов оксигеназ на примере (–)-изопулегола показано, что в превращениях задействованы ферменты, локализованные в цитоплазме. На основе известных литературных данных и анализа катализируемых *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 реакций биотрансформации сделан вывод о том, что в преобразовании монотерпеноидов с высокой долей вероятности участвуют ферменты семейства CYP450. В результате проведенного биоинформатического анализа результатов полного секвенирования генома штамма-биотрансформатора было выявлено 9 генов, кодирующих данные ферменты. С использованием ПЦР подобраны оптимальные условия их детекции в геноме *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362. Полученные сведения создают предпосылки для дальнейшего исследования уровней экспрессии выявленных генов с целью определения участвующих в процессах трансформации монотерпеноидов ферментов и кодирующих их функциональных генов.

Заключение. По результатам проведенного исследования отобран штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, способный к эффективной биотрансформации (–)-изопулегола, (–)-*транс*-карвеола, (–)-*цис*-карвеола и (–)-L-карвона. Установлено, что превращения данных монотерпеноидов сопровождаются образованием гидроксильированных, карбоксилированных и дегидрированных производных. По данным проведенного компьютерного прогнозирования на основе взаимосвязи “структура-активность”, полученные метаболиты менее токсичны по сравнению с исходным субстратом и могут быть использованы в качестве стимуляторов дыхания, противоопухолевых, противопаразитарных, иммуносупрессивных, ветрогонных препаратов, а также средств для лечения кожных заболеваний. Начаты исследования по идентификации полученных неизвестных продуктов трансформации и определению функциональных генов биоконверсии монотерпеноидов. Полученные данные расширяют представление о биокаталитическом потенциале *Rhodococcus* и свидетельствуют о перспективности их использования для биотрансформации растительных монотерпеноидов с целью получения новых биологически активных соединений.

Благодарности. Исследования выполнены за счет гранта Российского научного фонда № 24-14-20015.

Библиографический список

1. de Carvalho C.C.C.R., da Fonseca M.M.R. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene // *Food Chem.* 2006. V. 95. P. 413–422.
2. de Carvalho, C.C.C.R., da Fonseca, M.M.R. Biotransformations // *Compr. Biotechnol.* Second Ed. 2011. V. 2. P. 451–460.
3. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V. Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation // *In Microbial Resources*; ed. by I. Kurtboke. – Elsevier, 2017. P. 121–148.
4. Le T.M., Szakonyi Z. Enantiomeric Isopulegol as the chiral pool in the total synthesis of bioactive agents // *Chem. Rec.* 2022. V. 22. P. 1–32.
5. Serafim C.A.L., Araruna M.E.C., Alves Júnior E.B. et al. (–)-Carveol prevents gastric ulcers *via* cytoprotective, antioxidant, antisecretory and immunoregulatory mechanisms in animal models // *Front. Pharmacol.* 2021. V. 12. P. 1–17.
6. Zielińska-Błajet M., Feder-Kubis J. Monoterpenes and their derivatives—recent development in biological and medical applications // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 1–38.

УДК 633.31/.37:547.98

БОБЫ КОНСКИЕ (VICIA FABA L.) И ИХ АНТИПИТАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА**С.М. Мамедова, В.С. Попов***ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»
(ВИР), Санкт-Петербург, Россия*

Бобы (*Vicia faba* L.) – древняя культура, представленная только культивируемыми формами, способная к выращиванию в сезоны зимы и весны. Растение кормового и пищевого направления использования, содержащие в семенах 27-35%, в зеленой массе 13,8–21,5% белка, сдерживающее свое потребление наличием антипитательных веществ (АПВ). Содержание АПВ в семенах и вегетативной массе – один из ключевых признаков качества сорта. Наша работа по поиску точных, доступных и быстрых методов определения концентрации этих веществ в семенах бобов представляет большую актуальность и значимость. Аллель *zt-1* и *zt-2*, (*zero-tannin*) определяет низкое содержание полифенольных соединений – танинов (дубильных веществ), локализованных в семенной оболочке, определяют отсутствие черной пигментации на околоцветнике. Танины – известные своими свойствами связывать белки, что снижает усвояемость последних. Аллель *vc* связана со светлой окраской семенной кожуры и отсутствием окраски у рубчика семени, определяют наличие в семенах гликозидов вицина и конвицина. Вицин и конвицин – два основных гликозида с высоким содержанием синильной кислоты, может быть токсичным для лиц с генетическим дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, приводя к гемолитической анемии или фавизму. Биохимическую валидацию танинов определяли перманганатометрическим методом. Наименьшее содержание танинов в семенах белоцветковых составило 0,00 % - сорта «№7101» (Бельгия), наибольшее содержание у сорта «Исток» (Россия) с коричневой семенной кожурой и темным рубчиком – 1,26%. Биохимическую валидацию вицина и конвицина определяли методом фенольного реагента. Бобы являются факультативными самоопылителями с высоким процентом перекреста - до 30%. Так у образца к-2575 сорта «Express» (Франция) в семенах, отличающихся по размеру содержание танинов колеблется от 0,08 до 0,5%; у сорта «Blandine» (Франция) в семенах, отличающихся по размеру и наличию пигментного пятна на цветках и темного семенного рубчика содержание вицина колеблется 0,1 до 0,89%, конвицина – 0,04-0,45. Как и многие биохимические признаки данный признак также подвержен влиянию среды.

Ключевые слова: Бобы, антипитательные вещества, танин, вицин, конвицин.

Бобы (*Vicia faba* L.) — это древняя культура, представленная только культивируемыми формами. Следы растений этого вида связаны с ранним одомашниванием культур в археологических месторождения каменного, бронзового и железного веков на Ближнем Востоке и Средиземноморском бассейне [1]. Культура адаптирована к огромному ассортименту широт и высот [2]. Способна к выращиванию в сезоны зимы и весны. Высокая степень генетической изменчивости предоставляет возможность использовать для селекционных целей. Адаптированность к широкому спектру агроэкологических сред имеет сохраненные гены, определяющие сочинение устойчивости к биотическому и абиотическому стрессу. Различные морфологические сочетания признаков так же связаны с различным региональным происхождением [3].

Бобы – растение кормовое и пищевое направления использования, которое, в некоторой степени, сдерживается наличием антипитательных веществ (АПВ). Семена бобов содержат 27–35% белка и конкурируют с горохом и фасолью, зеленая масса содержит сырого белка в 1,5–2 раза больше, чем кукуруза – 13,8–21,5% [4]. Несмотря на потенциальную пользу, в семенах бобов имеются антипитательные соединения, которые могут оказывать неблагоприятное воздействие, снижая усвояемость питательных веществ и ограничивая их использование в продуктах питания и кормах для животных. Вицин (2,6-диамино-4,5-дигидрокси-пиримидин-5-β-D-глюкопиранозид) и конвицин (2,4,5, тригидрокси-6-амино-пиримидин-5-β-D-глюкопиранозид) – два основных антипитательных соединения, обнаруженных в бобах, уровни которых варьируются в зависимости от сорта, срока созревания, климата региона выращивания и свойств почвы [5]. Это гликозиды с высоким содержанием синильной кислоты, дающие два агликона – дивицин и изурамил, которые и обуславливают нарушения и расстройства в пищеварительном тракте людей и животных. Вицин и конвицин (vc) синтезируются в семенах на стадии налива семян в семенной оболочке, где они накапливаются в концентрации 6–14 г /к.

Накопление агликонов потенциально может быть токсичным для лиц с генетическим дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, приводя к гемолитической анемии или фавизму. Фавизмом страдают примерно 400 миллионов человек во всем мире [6], с наибольшей распространенностью в Азии, Средиземноморье и Африке. Содержание АПВ в семенах и вегетативной массе – один из ключевых признаков качества сорта. Поэтому наша работа по поиску точных, доступных и быстрых методов определения концентрации этих веществ в семенах бобов представляет большую актуальность и значимость. Известно, что аллель (uc) связана со светлой окраской семенной кожуры и отсутствием окраски у рубчика семени [7].

Также фактор, усложняющий использование в еду и корма бобов – конденсированные танины, локализованные в семенной оболочке. Танины – широко распространенные в растениях полифенольные соединения (флавоноиды), известные своими свойствами связывать и осаждать белки, снижая их усвояемость. Известно о значительной изменчивости содержания танинов в семенах бобов. Установлено, что низкое содержание этих полифенольных соединений у *V. faba* определяется аллелями *zt-1* и *zt-2*, (*zero-tannin*), которые обладают плейотропным эффектом, в частности, определяют отсутствие черной пигментации на околоцветнике. Данная мутация легко распознается в полевых условиях, служит морфологическим маркером низкотаниновых форм, но встречается редко, а данные о ее биохимической валидации практически отсутствуют. С низким содержанием танинов в семенах бобов могут быть связаны и другие морфологические признаки растения, такие как темное пятно на прилистниках и окраска семенной оболочки.

Было исследовано 20 белоцветковых и 3 контрольных с типичным морфотипом образцов. Биохимическую валидацию танинов определяли перманганатометрическим методом (метод Левенталья с модификацией) – метод, основанный на легкой окисляемости дубильных веществ, как веществ фенольной природы, перманганатом калия в кислой среде в присутствии индикатора и катализатора индигосульфокислоты, которая в точке эквивалентности переходит в изатин, и цвет раствора меняется от синего до золотисто-желтого. Так как перманганат калия частично окисляет и низкомолекулярные фенольные соединения, использовали способность желатина осаждать дубильные вещества из раствора. Водные извлечения из сырья осаждали 1 % раствором желатина в 10 % растворе хлорида натрия. Содержание танинов в образцах составляло 0,00–1,26. Median = 0,5. Наименьшее содержание танинов в семенах белоцветковых составило 0,00 % – сорта «№7101» (Бельгия). Содержание танинов у контрольных образцов с пигментированными цветками составило: сорта «Вировские» (Россия) со светлой семенной кожурой и темным рубчиком – 0,78%; сорта «Русские черные» (Россия) с черной семенной кожурой и темным рубчиком – 0,6%; сорта «Исток» (Россия) с коричневой семенной кожурой и темным рубчиком – 1,26%.

Биохимическую валидацию вицина и конвицина определяли методом фенольного реагента по Mohammed I [8] с модификацией, представленный спектрофотометрическим определением вицина и конвицина в бобах с помощью реактива Фолина-Чокольтеу. Метод не различает два гликозида (вицин и конвицин), но поскольку интенсивность экстинции вицина примерно в два раза больше, чем у конвицина, а последний присутствует во многих образцах в меньших количествах, можно считать, что большая часть цвета, получаемого образцом, обусловлена вицином. При сушке вицин разрушается, поэтому для исследования нужно использовать свежий, непрогретый материал.

Содержание вицина в образцах составляло 0,25-0,89. Median = 0,52. Содержание в образцах конвицина составляло 0,12- 0,42. Median = 0,26. Наименьшее содержание вицина в семенах белоцветковых составило 0,12 % - у сорта «Blandine» (Франция). Содержание вицина у контрольных образцов с пигментированными цветками составило: сорта «Вировские» (Россия) со светлой семенной кожурой и темным рубчиком - 0,45%; конвицина 0,22%; сорта «Русские черные» (Россия) с черной семенной кожурой и темным рубчиком - 0,29%; конвицина 0,14%; сорта «Исток» (Россия) с коричневой семенной кожурой и темным рубчиком – 0,31%, конвицина – 0,15%.

Цвет семенной кожуры и светлый семенной рубчик не является твердым доказательством низкого содержания танинов. К тому же бобы являются факультативными самоопылителями с высоким процентом ауткроссинга. Так у образца к-2575 сорта «Express» (Франция) в семенах, отличающихся по размеру содержание танинов колеблется от 0,08 до 0,5%; у сорта «Blandine» (Франция) в семенах, отличающихся по размеру и наличия пигментного пятна на цветках и темного семенного рубчика содержание вицина колеблется 0,25 до 0,89%. Как и многие биохимические признаки данный признак подвержен влиянию климатических и иных факторов среды.

Благодарности. Статья подготовлена в рамках Гос. задания по теме «Выявление возможностей генофонда бобовых культур для оптимизации их селекции и диверсификации использования в различных отраслях народного хозяйства» (0481-2022-0002).

Библиографический список

1. Duc G., Bao S., et al. Diversity maintenance and use of *Vicia faba* L. genetic resources. *Field Crops Research* 115, 2010. 270–278 p.
2. Мамедова С.М., Вишнякова М.А. Генетическое разнообразие коллекции бобов (*Vicia faba*) вир и его использование в селекции. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2020. Т. 181. № 3. С. 181-189
3. Li-juan, L., Zhao-hai, Y., et al. Study and utilization of faba bean germplasm resources. In: Saxena, M.C., Weigand, S., LiJuan, L. (Eds.), *Faba Bean in China: State-of-the Art Review*. ICARDA Press, (Ch. 4). 1993. 51–63 p.
4. Мамедова С.М., Попов В.С. и др. К вопросу о ранней диагностике низкого содержания танинов в семенах бобов конских (*Vicia faba* L.) *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*, Т. 184. № 1. 2023. 194-204 с.
5. Kumar, A., Nidhi, Prasad, N. et al. Nutritional and antinutritional attributes of faba bean (*Vicia faba* L.) germplasms growing in Bihar, India. *Physiol Mol Biol Plants* 21, 159–162 (2015). <https://doi.org/10.1007/s12298-014-0270-2>
6. Purves K., Krebs G. Evidence for distinct genetic and environmental influences on fear acquisition and extinction. *Psychological*, 2023.1106 -1114 p.
7. Duc G., Marget P., Esnault R., Le Guen J., Bastianelli D. Genetic variability for feeding value of faba bean seeds (*Vicia faba*): Comparative chemical composition of isogenics involving zero-tannin and zero-vicine genes. *J. Agric. Sci.* 1999. 133. 185–196.
8. Higazi MI, Read WW. A method for determination of vicine in plant material and in blood. *J Agric Food Chem.* 1974 Jul-Aug;22(4):570-1. doi: 10.1021/jf60194a016.

УДК 631.89:571.54

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ МИНЕРАЛЬНЫЕ И ОРГАНО-МИНЕРАЛЬНЫЕ УДОБРЕНИЯ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ

М.Г. Меркушева, Л.Н. Болонева

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, РФ
merkusheva48@mail.ru

Создание и использование биотехнологий с аборигенными видами фосфатмобилизирующих микроорганизмов, цеолитами, фосфоритами и окисленными бурыми углями местных месторождений, открывают широкие спектры разнообразия получения биологически активных минеральных и органо-минеральных удобрений с высокой эколого-агрохимической эффективностью для повышения плодородия почв и продукции растений при низкой экономической затратности.

Ключевые слова: фосфатмобилизирующие микроорганизмы, цеолит, фосфорит, окисленный бурый уголь, почва

BIOLOGICALLY ACTIVE MINERAL AND ORGANOMINERAL FERTILIZERS OF PROLONGED ACTION

M.G. Merkusheva, L.N. Boloneva

Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude, Russian Federation
merkusheva48@mail.ru

The creation and use of biotechnologies with native species of phosphate-mobilizing microorganisms, zeolites, phosphorites and oxidized brown coals of local deposits, open up wide ranges of diversity in the production of biologically active mineral and organo-mineral fertilizers with high ecological and agrochemical efficiency to increase soil fertility and plant products with low economic cost.

Keywords: phosphate-mobilizing microorganisms, zeolite, phosphorite, oxidized brown coal, soil.

Обеспечение продуктами питания при возрастающих потребностях в них человечества, особенно с середины XX в., во многом обязано применению фосфорных удобрений (Higgs et al., 2000). Природные ресурсы фосфора на Земле ограничены, поэтому нельзя допускать как его потерь, так и насыщения почв до чрезмерного уровня. Регулирование применения фосфорных удобрений должно создавать максимальную прибыль для производства продуктов растениеводства при минимальном загрязнении окружающей среды, особенно водоемов. Реализация всех потенциальных проблем, связанных с фосфорными удобрениями, привела к поиску экологически совместимых и экономически осуществимых альтернативных стратегий для улучшения производства культур (Zaidi et al., 2009). Использование микробных модификаторов, обладающих P-солубилизирующей активностью в аграрных почвах рассматривается как экологически чистая альтернатива дальнейшему применению химических удобрений на основе P. Многие микроорганизмы, в том числе и бактерии рода *Bacillus*, способны в определенных условиях переводить такие соединения в растворимые формы.

В Забайкалье в связи с глубоким промерзанием почв и медленным их оттаиванием, коротким и засушливым вегетационным периодом достичь увеличения продуктивности культур

невозможно без применения удобрений и орошения. Однако высокие цены на промышленные туки, бедность их ассортимента и низкая платежеспособность сельхозпроизводителей сокращают объемы применения удобрений. Поэтому, актуальной задачей является создание новых видов удобрений на основе местного минерального и органического сырья при использовании биотехнологий. Благоприятным фактором является достаточно высокая обеспеченность Забайкалья, в частности Республики Бурятия, местным минеральным и органическим сырьем. В регионе сосредоточены значительные ресурсы цеолитового сырья (1,5 млрд. т). Выявлен целый ряд месторождений и проявлений клиноптилолитовых, морденит-клиноптилолитовых, морденитовых и шабазитовых пород как вулканогенно-осадочного (*Шивыртуйское*), так и вулканогенного (*Холинское, Бадинское, Талан-Гозагорское, Мухор-Талинское*) типов.

В регионе широко распространены крупные месторождения, пелитоморфных и микрозернистых фосфоритов (Окинский и Китойский фосфоритоносные районы Восточного Саяна, которые являются северной частью обширного Окино-Хубсугульского фосфоритоносного бассейна. Однако, их широкомасштабное использование в настоящее время невозможно из-за жестких экологических ограничений на природоохранных территориях бассейна оз. Байкал.

Сырьевой базой окисленных бурых углей для агрохимических целей в Республике Бурятия являются их месторождения в различных районах: в Тункинском – Ахалинское с запасами углей – 1,1 млн. т., с содержанием гуминовых кислот (ГК) 47 %; в Селенгинском – Загустайское соответственно 1 млн. т и ГК 60-80 %; в Бичурском – Окино-Ключевское – 100 тыс. т и ГК 60 %; в Баргузинском – Бодонское – 1,5 млн. т и ГК в среднем 35 %. Наиболее обогащенными гуминовыми кислотами (63%) являются бурые окисленные угли Гусиноозерского месторождения (Лбов В. А., Лбов А. В., 2007).

Решение проблемы рационального использования цеолитов, фосфоритов и бурых окисленных углей как с экологических, так и с агрохимических позиций обуславливает необходимость поиска и реализации приемов или способов повышения коэффициента полезного действия удобрений. При этом должны соблюдаться следующие условия: 1. производство удобрений не должно усложнять технологический процесс и требовать использования дорогих и дефицитных реагентов; 2. основные составляющие компоненты удобрений должны находиться на территории (района, области, региона) потребителя, что резко снижает транспортные расходы, удешевляет их производство; 3. вновь созданные удобрения и удобрительные композиции из природного минерального и органического сырья должны соответствовать агрохимическим свойствам наиболее распространенного в регионе типа почв, используемых в земледелии.

В настоящее время имеется много разработок по созданию удобрений на основе молотых фосфоритов разных месторождений, но наличие в этих технологиях растворителей-кислот неприемлемо для использования их по двум основным причинам – отсутствию собственной химической промышленности и, самое главное, из-за жестких экологических требований к добыче и переработке фосфоритов, т. к. их месторождения входят в строго охраняемую бассейновую зону озер Хубсугул и Байкал. В этой связи наиболее подходящими способами повышения агрохимической эффективности удобрений могут быть те приемы, которые соответствуют почвенно-климатическим условиям, химическому составу компонентов и тем задачам, которые нацелены на сохранение плодородия почв, повышение продуктивности зерновых, овощей и картофеля, а также сенокосов и пастбищ. Тем не менее, оценка их удобрительной способности необходима как для повышения урожайности культур, так и обеспечения почв подвижным фосфором.

Учитывая, что на территории Забайкалья имеются большие запасы природных цеолитов с высоким качеством, нами разработан способ биологической активации цеолита с использованием аборигенных фосфатмобилизующих микроорганизмов, поровое пространство которого является их носителем. В основу наших исследований взято положение о том, что

бактериальные клетки обычно адсорбированы на поверхности почвенных частиц. Однако адсорбция – обратимый процесс: изменение температуры, почвенной реакции, влажности и других факторов приводит к десорбции бактериальных клеток. Адсорбированные микроорганизмы защищены от неблагоприятных условий, но обладают меньшей активностью, поскольку их адсорбция носит не физико-химический, а биологический характер. Микроорганизмы обычно размещены в крупных порах, хотя могут проникать в мелкие поры и капилляры. Одним из путей повышения биологической активности почв и при этом не нарушающих экологического равновесия в системе почва – растение является использование пор природных цеолитов, которые составляют 50 % объема каркаса минерала, в качестве носителей микроорганизмов. Нами выделен штамм фосфатмобилизующих бактерий (**ФМБ**) из пахотных каштановых почв. Показано, что 70–80 % клеток и спор бактерий из водной суспензии адсорбционно закрепляется в цеолите. **I способ** биологической активации: цеолит смешивают с водной суспензией ФМБ, затем выдерживают при определенной температуре и после этого подсушивают до сыпучего состояния.

На основе биологически активного цеолита было создано фосфор-цеолитовое удобрение пролонгирующего действия. Во **II способе** фосфорит смешивают с цеолитом, насыщенным ФМБ в определенном соотношении, который обладает высокими биокаталитическими и пролонгирующими свойствами: повышает многократно численность бактерий и их фосфатазную активность, увеличивает в почвах образование доступных питательных соединений фосфора, азота, и в меньшей степени калия. Но наибольшая эффективность цеолита, насыщенного микроорганизмами, достигается при совместном использовании его с фосфоритами, превосходящая действие промышленного суперфосфата.

Принципиальные основы технологии получения гуминовых кислот (ГК) из углей идентичны, но более пригодны бурые окисленные, характеризующиеся безотходностью и экологической безопасностью (Комплексные..., 2002). Установлено структурное высокое сходство ГК окисленных бурых углей Забайкалья с гуминовыми кислотами черноземов и каштановых почв. Количество ГК в бурых окисленных углях достигает 70-75 %, тогда как неокисленные угли содержат 3,6-7,7 %.

Создание биологически активного органоминерального удобрения, включающего фосфорит, природный цеолит, окисленный бурый уголь, заключалось в измельчении компонентов до размеров зерен 0,25-0,20 мм, смешивании в определенном соотношении и компостировании под воздействием фосфатмобилизующих бактерий, выделенных из почв методом селективного отбора, в течение 30-60 дней при влажности смеси на уровне 65-70% от полной влагоемкости. Содержание фосфатмобилизующих микроорганизмов определялось кинетикой образования подвижного P_2O_5 в компосте. Под действием микроорганизмов происходит увеличение подвижного фосфора до 17,0-50,4 мг/кг почвы, фосфатазной активности – в 2,8-21,8 раз за счет минерализации органических соединений фосфора.

Создание и использование биотехнологий с аборигенными видами фосфатмобилизующих микроорганизмов, выделенных из почв Забайкалья, цеолитами, фосфоритами и окисленными бурыми углями местных месторождений, открывают широкие спектры разнообразия их получения и применения с высокой эколого-агрохимической эффективностью и низкой экономической затратностью. Например, урожайность овса на зеленую массу при использовании биологически активных минеральных удобрений возрастала в первый год на 18-20 %, в последствии на второй год – на 35-40 %, на третий год – на 24-29% по сравнению с вариантом без внесения удобрений. Внесение биологически активного органоминерального удобрения пролонгированного действия позволило увеличить урожайность овса на зеленую массу в первый год на 25-32%, в последствии на второй год – 35-49%.

Техническим результатом разработанной технологии является повышение биологической активности сухих и сезонно-мерзлотных почв Забайкалья, увеличение содержания в почве подвижного фосфора до 17,0-50,4 мг/кг почвы и урожайности овощных и кормовых культур.

Таким образом, доказана перспектива использования выделенных из местных почв фосфатмобилизирующих микроорганизмов в качестве биоактиваторов удобрений из минеральных (цеолит, фосфорит) и органических агроруд (бурые окисленные угли), повышающих интенсивность биологических, биохимических и микробиологических процессов, содержание подвижных соединений азота, фосфора, калия и увеличивающих продуктивность овощных и кормовых культур. Значительный прирост корневой массы растений при внесении органоминерального удобрения имеет большое значение в повышении плодородия почвы, его стабилизации независимо от высокого уровня выноса питательных веществ в соответствии с возрастающей урожайностью растений.

Все разработки прошли государственную экспертизу и получены патенты РФ. Рекомендованы для внедрения: Министерство природных ресурсов, Министерство сельского хозяйства, крестьянские и фермерские хозяйства.

Благодарности. Работа выполнена по темам НИР (Госзадание 121030100228-4 «Эволюционно-генетические, биогеохимические и продукционные функции почв Байкальского региона как компонента биосферы, оценка их ресурсного потенциала и разработка технологий рационального использования и охраны»

Библиографический список

1. Higgs B., Johnston A. E., Salter J. L., Dawson C. J. Some aspects of achieving sustainable phosphorus use in agriculture // J. Environ. – 2000. – Qual. 29. – P. 80–87.
2. Лбов В. А., Лбов А. В. Агрехимическое сырье // Разведка и охрана недр. – 2007. – № 12. – С. 48–54.
3. Комплексные удобрения из природного и техногенного сырья Забайкалья. – Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2002. – 195 с.
4. Zaidi A, Khan MS, Ahemad M, Oves M. Plant growth promotion by phosphate solubilizingbacteria. // Acta Microbiol Immunol Hung, 2009. - Qual.56. – P. 283–284.

УДК 57.043; 631.53.027

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРЕПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН ПЛАЗМОЙ БАРЬЕРНОГО РАЗРЯДА В ВОЗДУШНОЙ СРЕДЕ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ИХ КАЧЕСТВА И ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ *OCIMUM BASILICUM*

А.С. Минич¹, И.Б. Минич¹, С.В. Кудряшов², А.Ю. Рябов², А.Н. Очередько²

¹ *Томский государственный педагогический университет, г. Томск, Россия*

² *Институт химии нефти СО РАН, г. Томск, Россия*

Представлены результаты исследования изменения посевных качеств семян *Ocimum basilicum* ‘Гвоздичный’ после их обработки плазмой барьерного разряда в воздушной среде в течение 5, 10, 15 и 20 с, роста, развития и продуктивности растений, выращиваемых из них. Установлено, что обработка плазмой приводит к улучшению посевных качеств семян от 20% до 83%. С увеличением времени обработки семян плазмой положительное влияние на энергию прорастания уменьшается, а на всхожесть увеличивается. Обработка семян плазмой в течение 5, 10 и 15 с не приводит к изменениям продуктивности растений, выращенных из них. При выращивании растений из семян, обработанных плазмой в течение 20 с, наблюдалась активация ростовых процессов, ускоренное развитие и повышение продуктивности. По сравнению с контрольными растениями они имели больше на 25% площадь поверхности листьев, на 54% число листьев, соответственно на 25% и 39% сырой и сухой биомассы растений. Увеличение ассимилирующей поверхности происходило как за счет большего числа листовых пластинок, так и за счет увеличения их размера, что не связано с изменениями содержания фотосинтетических пигментов в листьях растений. Технология обработки семян плазмой барьерного разряда в воздушной среде может применяться для улучшения посевных качеств семян и повышения продуктивности растений *Ocimum basilicum* ‘Гвоздичный’.

Ключевые слова: *Ocimum basilicum*; плазма барьерного разряда; качество семян; морфогенез; продуктивность

USING THE TECHNOLOGY OF PRE-SOWING SEED TREATMENT WITH BARRIER DISCHARGE PLASMA IN THE AIR TO IMPROVE THEIR QUALITY AND INCREASE THE PRODUCTIVITY OF *OCIMUM BASILICUM*

A.S. Minich¹, I.B. Minich¹, S.V. Kudryashov², A.Yu. Ryabov², A.N. Ocheredko²

¹ *Tomsk State Pedagogical University, Tomsk, Russia*

² *Institute of Petroleum Chemistry SB RAS, Tomsk, Russia*

The results of a study of changes in the sowing qualities of *Ocimum basilicum* ‘Gvozdichny’ seeds after their treatment with barrier discharge plasma in air for 5, 10, 15 and 20 s are presented, the growth, development, and productivity of the plants grown from them. Plasma treatment has been established to lead to an improvement in the sowing quality from 20% to 83%. With increasing time for seed treatment with plasma, the positive effect on germination energy decreases and on germination increases. Treatment of seeds with plasma for 5, 10 and 15 s does not lead to changes in the productivity of plants grown from them. When plants from seeds treated with plasma for 20 s, activation of growth processes, accelerated development, and increased productivity was observed. Compared to control plants, they had 25% more leaf surface area, 54% more number of leaves, 19% and 71% more wet and dry biomass from the upper vegetative parts of plants, and 33% and 74% more wet and dry root biomass. The increase in the assimilating surface occurred both as a result of a larger number of leaf blades and as a result of an increase in their size, which is not associated with changes in the content of photosynthetic pigments in the leaves of plants. The technology of seed treatment with barrier discharge

plasma in air can be used to improve the sowing qualities of seeds and increase the productivity of *Ocimum basilicum* ‘Gvozdichny’ plants.

Keywords: *Ocimum basilicum*; barrier discharge plasma; seed quality; morphogenesis; productivity

Введение. Для повышения всхожести семена растений подвергаются предпосевной обработке, в том числе плазмой барьерного разряда плазмой [1-3]. Показано, что при обработке такой плазмой поверхность семян становится гидрофобной, вследствие чего улучшается смачиваемость и повышается поглощение воды [4]. Это способствует проникновению активных частиц плазмы внутрь семени через семенной слой, нарушается состояние покоя и активизируется использование запасов семени за счет изменения гормональной и ферментативной активности [1-6]. При этом семена подвергаются дезинфекции, с их поверхности удаляются микотоксины и микробные слои [5]. Такое комплексное воздействие плазмы на семена может не только улучшать их посевные качества за счет повышения их всхожести и раннего прорастания, но активировать ростовые процессы и повышать продуктивность растений, выращенных из них [1-4].

Наличие эффекта изменения посевных качеств семян при обработке их плазмой и повышения продуктивности выращиваемых из них растений определяется несколькими факторами. Во-первых, параметрами плазмы (источника, мощности, вида и расхода разрядного газа и пр.), которые определяют вид и концентрацию образующихся активных частиц [1]. Во-вторых, продолжительностью обработки семян плазмой и видовой специфики растений (размера семени, толщины семенной кожуры и пр.) [1, 7-8]. В качестве разрядного газа используется воздух, аргон, гелий, кислород, азот, смеси этих газов, а для генерации плазмы – коронный разряд, диэлектрический барьерный разряд, плазменная струя атмосферного давления и др. [1, 7-8]. Вследствие разных параметров внутри плазмы протекают различные физико-химические процессы и образуется множество различных активных частиц [1, 8].

Базилик душистый является распространенной культурой, выращиваемой в светокультуре, в открытом и защищенном грунтах [9-10]. В настоящее время в литературе представлены единичные сведения об изменении продуктивности базилика душистого, выращиваемого из обработанных плазмой семян, показана возможность повышения его продуктивности [1, 10]. В качестве источника плазмы для обработки семян базилика применяется барьерный разряд, а в качестве разрядного газа используется аргон или кислород [1, 10]. Однако отсутствуют какие-либо данные о применении в качестве разрядного газа воздуха, являющегося более дешевым по сравнению с аргоном и кислородом, при обработке семян базилика плазмой барьерного разряда. Показано, что обработка семян *Raphanus sativus* плазмой барьерного разряда в среде воздуха способствует активации роста растений, не наблюдающегося при их обработке с использованием аргона в качестве разрядного газа [8].

Цель работы – изучение влияния на качество семян, изменения ростовых процессов и продуктивности базилика душистого предпосевной обработки его семян плазмой барьерного разряда в воздушной среде.

Материалы и методы. Объектом исследований являлся базилик душистый (*Ocimum basilicum* L.) ‘Гвоздичный’ (производитель семян – ООО «Агрофирма «СеДек», Россия).

Семена обрабатывались в плазмохимическом реакторе с планарным расположением электродов и одним диэлектрическим барьером из стеклотекстолита толщиной 2 мм. Площадь высоковольтного электрода составляла 48 см², величина разрядного промежутка – 2 мм, амплитуда высоковольтных импульсов напряжения – 9 кВ, частота повторения – 2 кГц. Заземленным электродом реактора служило латунное основание, а закрепленная на поверхности диэлектрика из стеклотекстолита медная фольга – высоковольтным электродом. Барьерный разряд инициировался высоковольтными импульсами напряжения, управляемыми генератором. Осциллограммы импульсов регистрировались с использованием делителя

напряжения, емкостных и токовых шунтов на двухканальном цифровом осциллографе Tektronix TDS 380 (Tektronix, США). Рассчитанная активная мощность плазмы БР при данных параметрах реактора соответствовала ~ 7 Вт. Разрядный промежуток между электродами объемом $9,6 \text{ см}^3$ служил для закладки семян. Температура реактора равнялась 25°C . Во всех экспериментах расход воздуха на входе в реактор составлял ~ 200 мл/мин. Принципиальная схема экспериментальной установки, продольное сечение реактора, осциллограммы высоковольтных импульсов напряжения и вольт-кулоновская характеристика БР представлены в работе [7].

Перед обработкой семена калибровались по массе и размеру. Семена одной фракции равномерно располагались в разрядной зоне реактора, занимая около 70% от ее площади. Выбор продолжительности (5, 10, 15 и 20 с) обработки семян плазмой барьерного разряда и воздуха в качестве газовой разрядной среды сделаны исходя из опубликованных результатов исследований. Показано, что обработка семян базилика в среде аргона данной продолжительности способствует улучшению их посевных качеств и может приводить к повышению продуктивности растений, выращиваемых из таких семян [9]. Установлено, что использование плазмы барьерного разряда в воздушной среде для обработки семян различных видов растений способствует уменьшению времени их прорастания и активации ростовых процессов [1, 10].

Оценка посевных качеств семян проводилась в соответствии с межгосударственным стандартом 12038-84 «Семена сельскохозяйственных культур (Agricultural seeds. Methods for determination of germination)». В чашки Петри помещались три слоя фильтровальной бумаги, проводилось ее увлажнение дистиллированной водой, на поверхность бумаги раскладывались семена. Чашки Петри с семенами помещались под лампы ДНАЗ-150 (ООО «Рефлекс», Россия) с интенсивностью светового потока 120 Вт/м^2 . Семена проращивались с фотопериодом 16 ч – свет, 8 ч – темнота. Температура воздуха в течение 6 ч составляла 20°C , 18 ч – 30°C .

Для выращивания растений семена базилика высевались в контейнеры с дренажными отверстиями в почвенный грунт, состоящий из чернозема, перегноя и торфа. Контейнеры помещались на 35 суток под лампы ДНАЗ-150 (ООО «Рефлекс», Россия). Использовались аналогичные фотопериод и интенсивность светового потока, что и при оценке посевных качеств семян. Температура воздуха составляла $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

У растений базилика каждые 7 суток проводились измерения морфометрических показателей и определялось содержание фотосинтетических пигментов в их листьях.

Определение сырой массы и массы сухого вещества растений проводилось взвешиванием на электронных аналитических весах Acculab ALC-210d4 (Acculab, USA). Растения выкапывались из грунта, корневая система промывалась водой, лишняя влага удалялась фильтровальной бумагой. Для определения сухой биомассы растения высушивались в сушильном шкафу при температуре 103°C до постоянного веса.

Определение площади ассимилирующей поверхности растений проводилось с использованием программы по вычислению площади сложных фигур «AreaS» (Самарская государственная сельскохозяйственная академия, Россия). Работа программы основана на сканировании фигур (исследуемых фигур и шаблона с известной площадью), и расчетом площади исследуемых фигур при сравнении с площадью шаблона (погрешность определения – не более 0,001%).

Содержание хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и каротиноидов в листьях базилика определялось на спектрофотометре UV-VIS spectrophotometer Shimadzu UV-2600 (Shimadzu Corporation, Japan) с последующим расчетом по формуле Хольма – Ветшттейна для 100% ацетоновых вытяжек [7].

В качестве контроля использовались необработанные плазмой барьерного разряда семена и растения, выращенные из них. Оценка достоверности результатов исследований проводилась при 95% уровне надежности (уровень значимости – 0,05). В таблицах приведены средние арифметические значения с двухсторонним доверительным интервалом из трех независимых экспериментов, каждый из которых проведен в трех биологических повторностях на 50

растениях. За результат анализа лабораторной всхожести и энергии прорастания принимались среднеарифметические значения данных анализа четырех проб по 100 семян в каждой при допустимом расхождении результатов, указанных в межгосударственном стандарте 12038-84.

Результаты и обсуждение. Обработка семян базилика плазмой барьерного разряда в воздушной среде в течение 5, 10, 15 и 20 с способствует улучшению их посевных качеств, причем изменение величин энергии прорастания и лабораторной всхожести имеет разнонаправленный характер (табл. 1).

Таблица 1.

Всхожесть и энергия прорастания семян *Ocimum basilicum* ‘Гвоздичный’, необработанных (контроль) и обработанных плазмой барьерного разряда в воздушной среде

Время обработки семян плазмой барьерного разряда, с	Энергия прорастания, %	Лабораторная всхожесть, %
контроль	37,5 ± 4,0	37,5 ± 4,0
5	57,1 ± 5,9	57,1 ± 4,0
10	52,1 ± 6,0	57,5 ± 4,9
15	50,0 ± 4,8	62,5 ± 5,9
20	45,0 ± 3,1	70,0 ± 3,8

Максимальное увеличение энергии прорастания (на 52%) относительно контроля наблюдалось у семян при их обработке плазмой в течение 5 с, при этом улучшение лабораторной всхожести (на 52%) было минимальным. С увеличением времени обработки положительное влияние на изменение энергии прорастания семян снижалось до 40%, 33% и 20% соответственно, а на изменение лабораторной всхожести – увеличивалось до 53%, 63% и 87% соответственно. Такой эффект, вероятно, связан с гидрофилизацией внешней поверхности семенного слоя из-за образования полярных групп, что способствует более интенсивному поглощению воды семенами и протеканию биохимических процессов [6].

При выращивании растений базилика в течение 35 суток из семян, обработанных 5, 10 и 15 с плазмой барьерного разряда в воздушной среде, т.е. из семян с улучшенными посевными качествами, достоверных изменений в морфометрических параметрах надземной части растений по сравнению с контролем не наблюдалось. Такой результат возможно связан с активным расходом запасов семени на прорастание, что в дальнейшем не способствует активации роста и развития растений [8]. У базилика, выращиваемого из обработанных плазмой барьерного разряда в течение 20 с семян, со второй недели наблюдался более интенсивный ростовой процесс относительно контроля. У таких растений на 35 сутки отметили увеличение числа листьев на 54%, площади поверхности листьев на 25%, сырой и сухой биомассы на 25% и 39% соответственно (табл. 2).

Таблица 2

Морфометрические показатели 35-суточных растений *Ocimum basilicum* ‘Гвоздичный’, выращенных из семян, необработанных (контроль) и обработанных плазмой барьерного разряда в воздушной среде

Время обработки семян плазмой барьерного разряда, с	Кол-во листьев, шт.	Площадь поверхности листьев, см ²	Сырая биомасса, г	Сухая биомасса, г
контроль	14,81 ± 1,19	12,33 ± 0,83	14,65 ± 1,15	0,99 ± 0,09
5	13,62 ± 1,32	12,04 ± 1,09	15,21 ± 1,22	1,02 ± 0,13
10	14,01 ± 0,59	12,29 ± 0,24	14,83 ± 0,48	1,00 ± 0,03
15	14,33 ± 0,53	11,53 ± 0,95	14,19 ± 0,65	0,99 ± 0,09
20	22,80 ± 1,65	15,40 ± 0,91	18,28 ± 1,36	1,38 ± 0,13

Увеличение ассимилирующей поверхности в основном происходило за счет большего числа новых листовых пластинок.

Изменения морфометрических показателей опытных растений относительно контроля не связаны с уровнем накопления фотосинтетических пигментов в их листьях, содержание и динамика накопления которых достоверно не различались на протяжении всего периода вегетации. Такой результат является сходным с данными, полученными при выращивании базилика из семян, обработанных плазмой барьерного разряда в среде аргона [10]. Однако он отличается от результатов, полученных при исследовании влияния плазмы на семена других культур, в которых установлена корреляция между улучшением ростовых процессов растений и увеличением содержания хлорофилла [7]. Это указывает на видовую специфичность изменения протекания ростовых процессов растений, выращиваемых из семян, обработанных плазмой барьерного разряда.

Заключение. Обработка семян *Ocimum basilicum* ‘Гвоздичный’ плазмой барьерного разряда в воздушной среде во временном диапазоне от 5 до 20 с улучшает их посевные качества. Достоверное повышение продуктивности относительно контроля и других опытных растений наблюдается только у базилика, выращенного из семян, обработанных плазмой барьерного разряда в атмосфере воздуха в течение 20 с. Такой результат может определяться тем, что такая продолжительность обработки семян базилика при данных параметрах плазмы барьерного разряда приводит к образованию в оптимальных количествах и в оптимальном соотношении определенных видов активных частиц, которые проникают в семя и положительно изменяют некоторые метаболические процессы [1]. Результаты показывают, что обработка семян *Ocimum basilicum* ‘Гвоздичный’ плазмой барьерного разряда в воздушной среде может применяться для улучшения их посевных качеств и повышения продуктивности растений.

Библиографический список

1. Attri P., Ishikawa K., Okumura T., Koga K., Shiratani M. Plasma agriculture from laboratory to farm: a review // *Processes*. 2020. Vol. 8. PP. 1002–1021. doi:10.3390/pr8081002
2. Puač N., Gherardi M., Shiratani M. Plasma agriculture: A rapidly emerging field // *Plasma Process Polym.* 2017. e1700174. doi: 10.1002/ppap.201700174.
3. Ito M., Oh J.-S., Ohta T., Shiratani M., Hori M. Current status and future prospects of agricultural applications using atmospheric-pressure plasma technologies // *Plasma Process Polym.* 2017. e1700073. doi: 10.1002/ppap.201700073.
4. Randeniya L.K., de Groot G.J.J.B. Non-thermal plasma treatment of agricultural seeds for stimulation of germination, removal of surface contamination and other benefits: a review // *Plasma Processes Polym.* 2015. Vol. 12(7). PP. 608–623. doi: 10.1002/ppap.201500042.
5. Henselová M., Slovákova L., Martinka M., Zahoranová A. Growth, anatomy and enzyme activity changes in maize roots induced by treatment of seeds with low-temperature plasma // *Biologia*. 2012. Vol. 67(3). PP. 490–497. doi: 10.2478/s11756-012-0046-5.
6. Park Y., Oh K.S., Oh J., Seok D.C., Kim S.B., Yoo S.J., Lee M.-J. The biological effects of surface dielectric barrier discharge on seed germination and plant growth with barley // *Plasma Process Polym.* 2016. Vol. 15(6). P. 1600056. doi: 10.1002/ppap.201600056.
7. Minich A.S., Minich I.B., Chursina N.L., Ivanitskii A.E., Ochered'ko A.N. Changes in morphogenesis and productivity of *Lactuca sativa* L. lettuce by presowing treatment of seeds with dielectric-barrier discharge plasma // *High Energy Chemistry*. 2021. Vol. 55(3). PP. 243–248. doi: 10.1134/S0018143921030085.
8. Sarinont T., Amano T., Attri P., Koga K., Hayashi N., Shiratani M. Effects of plasma irradiation using various feeding gases on growth of *Raphanus sativus* L. // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2016. Vol. 605. P. 129–140. doi: 10.1016/j.abb.2016.03.024.
9. Полякова Н.М., Мартиросян Ю.Ц., Диловарова Т.А., Кособрюхов А.А. Фотосинтез и продуктивность у растений базилика (*Ocimum basilicum* L.) при облучении различными источниками света // *Сельскохозяйственная биология*. 2015. Т. 50. №1. С. 124–130. doi: 10.15389/agrobiology.2015.1.124rus
10. Minich A.S., Kudryashov S.V., Minich I.B., Chursina N.L., Vasil'ev S.E., Finicheva A.A., Ryabov A.Yu., Ochered'ko A.N. Influence of basil seeds treatment with dielectric-barrier discharge plasma in argon atmosphere on their sowing quality and plant morphogenesis and productivity // *High Energy Chemistry*. 2022. Vol. 56(5). PP. 374–379. doi: 10.1134/S0018143922050113.

УДК 582.26

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНСОРЦИУМА ДИАТОМОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ АРКТИЧЕСКИХ РЕГИОНОВ ДЛЯ ОБОГАЩЕНИЯ КОРМОВЫХ ДОБАВОК АКВАКУЛЬТУР

Т.В. Невская², В.В. Поважный¹, Ю.А. Смятская², У.Д. Андрианова²

¹*Арктический и антарктический научно-исследовательский институт, Санкт-Петербург, Россия*

²*Санкт-Петербургский Политехнический университет, Санкт-Петербург, Россия*
nevskaya.tatyana92@yandex.ru

Водоросли играют важную роль в формировании пищевой цепочки водных организмов, они поглощают углекислый газ и производят кислород, содержат ценные питательные компоненты в своем составе, а также служат кормом для различных рыб, креветок, моллюсков и прочих представителей водной фауны [5]. Актуальным является использование данных видов культур для производства пищевых и кормовых добавок, фармацевтических субстанций и косметических средств широко используется. Набирает высокий оборот изучение антибактериальных свойств водорослей, а также изучение жирорастворимых витаминов и жирных кислот омега-3 в морепродуктах [2].

Цель работы: изучение состава ценных компонентов консорциума диатомовых водорослей, полученного из Баренцева моря.

Ключевые слова: водоросли, фитопланктон, липиды, высшие жирные кислоты, хлорофилл, консорциум, кормовые добавки, аквакультура

RESEARCH OF THE CONSORTIUM OF DIATOMS OF THE ARCTIC REGIONS FOR THE ENRICHMENT OF FEED ADDITIVES OF AQUACULTURE

T.V. Nevskaya², V.V. Povazhnyi¹, J.A. Smyatskaya², U.D. Andrianova²

¹*Arctic and Antarctic Research Institute, Saint Petersburg, Russia*

²*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia*

Algae play an important role in the formation of the food chain of aquatic organisms, they absorb carbon dioxide and produce oxygen, contain valuable nutritional components in their composition, and also serve as food for various fish, shrimps, shellfish and other representatives of aquatic fauna [5]. The use of these types of crops for the production of food and feed additives, pharmaceutical substances and cosmetics is widely used. The study of the antibacterial properties of algae, as well as the study of fat-soluble vitamins and omega-3 fatty acids in seafood is gaining high momentum [2]. The purpose of the work is to study the composition of valuable components of the consortium of diatoms obtained from the Barents Sea.

Keywords: algae, phytoplankton, lipids, higher fatty acids, chlorophyll, consortium, feed additives, aquaculture

Богатым источником ценных компонентов таких как полисахариды, пигменты, липиды могут быть природные объекты – диатомовые водоросли. Диатомовые водоросли Арктических регионов - являются малоизученными и представляет большой интерес среди ученых по всему миру [6]. Они способны выдерживать экстремально низкие температуры и при этом быть в фазе экспоненциального роста, в условиях полярного дня и ночи, могут приспособиться к изменениям окружающей среды, выдерживают условия повышенной солености морей. Образец для

исследования предоставлен учеными ААНИИ из научно-исследовательской экспедиции на Баренцево море.

Для детального изучения и отслеживания фаз роста использовали микроскоп ЛабоМед-2 с камерой Olimpus V-ND 25-2 при увеличении 100. На рис. 1 представлена микроскопия консорциума диатомовых водорослей на экспоненциальной фазе роста.

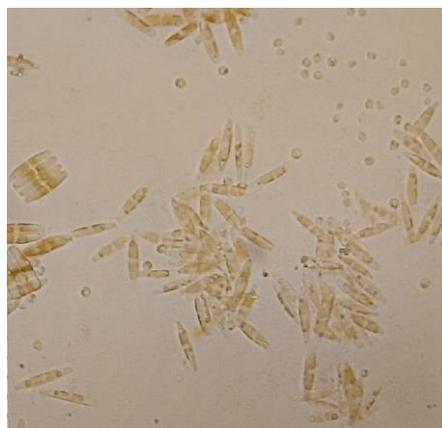


Рисунок 1. Консорциум диатомовых водорослей, x100

Для выращивания водорослей в лабораторных условиях была приготовлена питательная среда F/2. Для приготовления питательной среды использовали морскую воду, которая была собрана из Баренцево моря. Предварительно морскую воду фильтровали через фильтр марки ФБ-III и добавляли микро- и макроэлементы, концентрация которых указана в табл. 1. Срок годности питательной среды не более 1 месяца в плотно закрытой таре, при температуре от +12 до +16 °С.

Таблица 1

Концентрация макро- и микроэлементов для приготовления среды F/2

№	Микро- и макроэлементы	Концентрация в исходном растворе, г/л	Количество в 1 л среды
1	NaNO ₃	150,00	1
	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	10,00	
2	Na ₂ SiO ₃ *9H ₂ O	60,00	1
3	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,02	1
	ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,04	
	CoCl ₂ *6H ₂ O	0,02	
	MnCl ₂ *4H ₂ O	0,36	
	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,01	
4	Трилон	8,71	1
5	FeCl ₃ *6H ₂ O	6,31	1
6	Тиамин (витамин B ₁)	-	0,004
	Биотин (витамин B ₇)	0,12	20
	Цианокобаламин (витамин B ₁₂)	1,01	2

Параметры, при которых выращивали водоросли: температура +15-18 °С, освещение: лампа дневного света 2400±200 Лк, режим «день/ночь» - 6 /18» [4].

Основным и ключевым показателем роста водорослей является концентрация и наличие хлорофилла. Хлорофилл – это пигмент, который присутствует в клетках растений, он участвует в процессе фотосинтеза. По увеличению количества хлорофилла можно судить о росте

водорослей на питательной среде. Содержание хлорофилла а определяли по ГОСТу 17.1.4.02-90 [3] с помощью спектрофотометра SPECORD 200 Analytic Jena производства Omnilab-laborzentrum и программного обеспечения WinAspect 2.3.1. Измерение оптических плотностей производили на длинах волн: 664, 647, 630 и 750 нм. Выход хлорофилла в начале исследования составил $1,64 \pm 0,16$ мг/дм³. Результаты были сравнены после выращивания водорослей на среде F/2, необходимой температуры и освещенности. Полученный результат на 28 день исследования составил $1,78 \pm 0,18$ мг/г. Прирост биомассы зафиксирован на 5,95 %. Молекула хлорофилла содержит систему сопряжённых двойных связей, что способствует поглощению света. Центральный атом магния играет важную роль в этом процессе, так как он взаимодействует с фотонами света, позволяя молекуле поглощать свет в красной области спектра. Когда магний удаляется из молекулы хлорофилла, например, в результате взаимодействия с кислотой, это приводит к изменению её способности поглощать свет и, как следствие, к изменению цвета. Этот процесс называется деметаллизацией хлорофилла. В результате, хлорофилл без магния теряет свою зелёную окраску и становится более бледным или жёлтым. Для сравнения результатов производили измерение до и после подкисления соляной кислотой. Схематично данный процесс представлен на рис. 2.

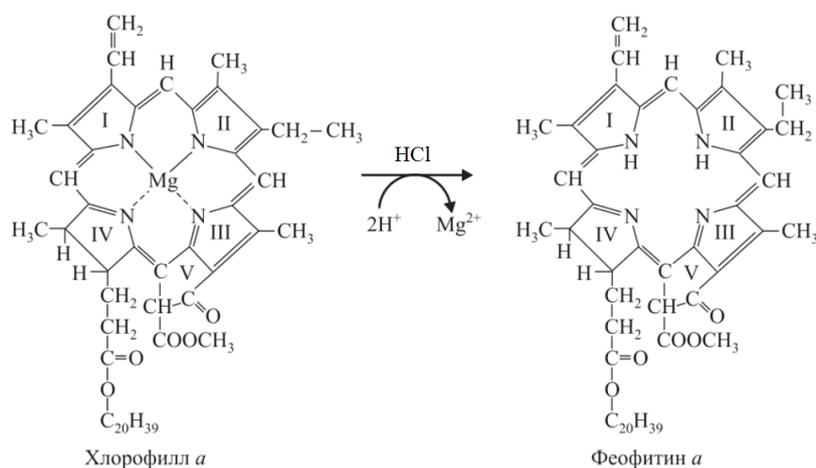


Рисунок 2. Получение Феофитина а

Согласно методике [3] определено количественное содержание хлорофилла а в начале исследования – $1,04 \pm 0,10$ мг/г, на 28 день исследования – $1,23 \pm 0,12$ мг/г.

Данное наблюдение дает нам возможность исследовать водоросли и просчитать фазу замедления, при которой уменьшается деление клеток происходящее из-за истощения питательной среды в закрытом биореакторе. Максимальный выход пигментов, в том числе хлорофилла и каротиноидов было зарегистрировано на 26-30 день выращивания культуры.

После проведения исследования пигментов в образце, исследовали общее содержание липидов. Особый интерес представляют липиды класса триацилглицеролы, которые состоят из глицерола и высших жирных кислот [8]. По своим свойствам в организме человека и животного могут выполнять ряд полезных функций: энергетическая – являются хорошим источником энергии (обеспечивают больше энергии на 1 грамм чем углеводы и белки); способствуют усвоению других питательных веществ (например жирорастворимых витаминов), улучшают передачу и проводимость веществ (например за счет образования липидной оболочки хиломикрон); структурная – поддержка клеток и тканей, обволакивающая функция; защитная – защита внутренних органов. Общее количество липидов определяли фосфованилиновым методом согласно методике [7]. Выход липидов составил $25,00 \pm 1,29$ мг/г от биомассы.

Наиболее важными для человека являются высшие жирные кислоты Эйкозапентаеновая кислота (ЭПК) и Докозагексаеновая кислота (ДГК). Согласно литературным данным [1]

диатомовые водоросли накапливают и синтезируют достаточно большое количество ЭПК и ДГК в период стресса и интервальных перепадов физико-химических параметров окружающей среды.

Заключение. Представленный консорциум водорослей является перспективным источником для получения ценных компонентов, которые могут быть использованы в качестве кормовой добавки для аквакультур. Проведение дальнейших исследований в области разработки позволит создать экономически эффективную технологию извлечения ценных компонентов, позволит заменить на российском рынке множество импортных добавок и компонентов растительного и животного происхождения.

Библиографический список

1. Боголицын К.Г., Паршина А.Э., Дружинина А.С., Шульгина Е.В. Сравнительная характеристика химического состава некоторых представителей бурых водорослей белого и желтого морей. *Химия растительного сырья*, 2020. №3. 35–46 с.
2. Гогорев Р.М. Ботанические исследования в Антарктике. Тезисы докладов научной конференции «Россия в Антарктике». СПб., 2006. С. 25–26.
3. ГОСТ 17.1.4.02-90 Вода. Методика спектрофотометрического определения хлорофилла а.
4. Куликовский М.С. История изучения флор диатомовых водорослей в сфагновых болотах России и некоторых сопредельных государств. *Новости систематики низших растений*, 2008, С. 36–54.
5. Смирнова В.С. Фитопланктон как индикатор состояния экосистемы Кондопожской губы Онежского озера в условиях садкового выращивания форели. *Трансформация экосистем т. 7*, выпуск 1, 2024. 177–195 с.
6. Шилин М.Б., Саранчова О.Л. Полярная аквакультура. Российский государственный метеорологический университет. СПб., 2005. 58 с.
7. Anschau, A., Caruso, C.K, Raquel F.T. Validation of the sulfo-phosphovanillin (SPV) method for the determination of lipid content in oleaginous microorganisms. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2017. P. 19–27.
8. Sakdullah A., Makoto T. One-step method for quantitative and qualitative analysis of fatty acids in marine animal samples. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. V. 354, Issue 1, 4 January 2008, P. 1–8.

УДК 547:637.136(045)

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЯ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Т.А. Обрезкова, Н.А. Шавыркина

Бийский технологический институт (филиал) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова» (БТИ АлтГТУ), г. Бийск, Россия

В статье приведены результаты аналитических и экспериментальных исследований влияния на жизнедеятельность молочнокислых бактерий процесса их иммобилизации в структуре бактериальной наноцеллюлозы (БНЦ). В работе использовали закваску ацидофильной палочки на обезжиренном молоке и бактериальную наноцеллюлозу, полученную статическим культивированием симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* на полусинтетической питательной среде. Установлено, что внесение более 5 % БНЦ приводит к образованию сгустка уже на стадии стерилизации, поэтому следует либо вносить меньше этой дозировки, либо изменить способ внесения БНЦ. Иммобилизации бактерий ацидофильной палочки на БНЦ не влечет увеличения численности бактерий, но стимулирует их кислотообразование. Культивирование более 3 суток нецелесообразно, т.к. и кислотность, и численность микроорганизмов по истечению этого времени начинают снижаться, а на 7-е сутки жизнеспособных клеток в образцах не обнаруживается.

Ключевые слова: бактериальная наноцеллюлоза, молочнокислые бактерии, иммобилизация.

THE USE OF BACTERIAL NANOCELLULOSE AS A CARRIER FOR THE IMMOBILIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA

T.A. Obrezkova, N.A. Shavyrkina

Biysk Institute of Technology (branch) of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Altai State Technical University named after I.I. Polzunov" (BTI AltSTU), Biysk, Russia

The article presents the results of analytical and experimental studies of the influence of the process of their immobilization in the structure of bacterial nanocellulose (BNC) on the vital activity of lactic acid bacteria. The work used a starter culture of acidophilus bacillus in skim milk and bacterial nanocellulose obtained by static cultivation of a symbiotic culture of *Medusomyces gisevii* in a semi-synthetic nutrient medium. It has been established that adding more than 5% BNC leads to the formation of a clot already at the sterilization stage, so you should either add less than this dosage or change the method of adding BNC. Immobilization of acidophilus bacteria on BNC does not increase the number of bacteria, but stimulates their acid formation. Cultivation for more than 3 days is impractical, because both the acidity and the number of microorganisms begin to decrease after this time, and on the 7th day no viable cells are detected in the samples.

Keywords: bacterial nanocellulose, lactic acid bacteria, immobilization.

Иммобилизация молочнокислых бактерий является важным процессом в пищевой промышленности. Она позволяет сохранить высокую активность бактерий и обеспечить стабильное качество продукции. Для этого используют различные носители, такие как альгинат, казеин или гель-микрокапсулы. Эти материалы обеспечивают защиту бактерий от внешних

воздействий, таких как изменения температуры, рН или осмотического давления. Благодаря иммобилизации молочнокислых бактерий можно улучшить качество и полезные свойства различных молочных продуктов, таких как йогурты, кефиры или творог.

Первые научные исследования молочнокислых бактерий были проведены Л. Пастером, результаты он опубликовал в 1857 г. С тех пор молочнокислые бактерии привлекают к себе внимание специалистов. На основе использования этих микроорганизмов создаются и развиваются крупные отрасли пищевой промышленности [6].

Молочнокислые бактерии играют важную роль в производстве многих молочных продуктов. Они способствуют брожению молока, при этом защищая его от различных патогенных микроорганизмов. Благодаря этим бактериям происходит процесс квашения, который придает молочным продуктам характерный вкус и аромату. Использование молочнокислых бактерий в качестве закваски улучшает пищеварение и способствует укреплению иммунитета. Молочные продукты, обогащенные данными бактериями, являются важным источником пробиотиков, которые благотворно влияют на состояние микрофлоры кишечника и оказывают положительное воздействие на организм в целом.

Применение иммобилизованных молочнокислых бактерий является эффективным способом улучшения качества и срока хранения молочных продуктов. Иммобилизация бактерий позволяет увеличить их выход на поверхность продукта, что способствует улучшению вкусовых качеств и текстуры. Кроме того, данный метод обеспечивает более стабильное развитие молочнокислых бактерий в продукте, что способствует сохранению его полезных свойств. В результате использования иммобилизованных бактерий удается снизить риск развития патогенных микроорганизмов и улучшить общую безопасность продукта.

Степень сохранности иммобилизованных молочнокислых бактерий играет важную роль в продолжительности их жизнеспособности и эффективности применения в различных областях, таких как пищевая промышленность, медицина и сельское хозяйство. Она зависит от многих факторов, таких как тип иммобилизационной матрицы, метод фиксации бактерий, условия хранения и транспортировки. Для обеспечения высокой степени сохранности необходимо проводить тщательный контроль всех этапов процесса и поддерживать оптимальные условия для жизнедеятельности микроорганизмов. Важно также постоянно совершенствовать методы иммобилизации и разрабатывать новые технологии для повышения стабильности и долговечности иммобилизованных молочнокислых бактерий.

В статье [3] описывается исследование выживаемости молочнокислых микроорганизмов в составе эмульгированных мясных продуктов. В ходе исследования авторы выяснили, что на начальном этапе хранения происходит отмирание живых клеток лактобактерий, но затем их численность постепенно увеличивается за счет клетчатки, содержащейся в овсяных хлопьях и растительных компонентах.

Авторы [4] описали влияние иммобилизации *Bifidobacterium bifidum* в структуре альгинатных микрокапсул на жизнеспособность штамма в процессе воздействия смоделированных желудочно-кишечных жидкостей и хранения в кисломолочном напитке из овечьего молока. Рассмотрены влияние резистентного крахмала на процесс иммобилизации бифидобактерий, который в сочетании с альгинатом оказывает синергическое действие на гелеобразование, обеспечивая дополнительную защиту пробиотических клеток. Введение резистентного крахмала в структуру микрокапсул способствовало улучшению защиты и сохранению жизнеспособности микрокапсулированных бифидобактерий до 87 % от исходной концентрации при прохождении модельных сред, имитирующих процесс пищеварения человека.

В работе [8] исследованы приемы стабилизации клеток молочнокислых организмов (МКО). Выявлена высокая эффективность использования природных ассоциаций МКО, селективированных по признаку длительного сохранения клетками МКО жизнеспособности и впервые показано, что дрожжевым компонентом стабильной ассоциации с молочнокислыми бактериями является *S. parapsilosis*.

Известен способ разработки защитной среды для сохранения активности кислотообразования молочнокислых бактерий. Защитная среда для хранения молочнокислых бактерий содержащая основу - обезжиренное молоко, источник азота, отличающаяся тем, что с целью обеспечения сохранения активности кислотообразования молочнокислых бактерий при хранении в лиофилизированном виде и удешевления среды, она дополнительно содержит кормовой витамин В12 и кальций углекислый, а в качестве источника азота и одновременно минеральных веществ - водный экстракт травяной муки с содержанием сухих веществ, общего от сухого вещества и золы от сухого вещества в определенном соотношении исходных компонентов [7].

Гаврилова и другие рассматривают методы защиты клеток пробиотических культур в неблагоприятных условиях сложных компонентных систем и желудочно-кишечного тракта. В качестве носителя для иммобилизации авторы использовали биополимеры натурального происхождения, а именно пектин цитрусовый и желатин. В результате исследований установлено, что иммобилизованные клетки микроорганизмов проявили устойчивость к исследуемым концентрациям тест-веществ, что может рассматриваться как косвенный показатель лучшей способности иммобилизованных клеток микроорганизмов приживаться в желудочно-кишечном тракте человека [5].

Бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) – полностью экологический продукт. При этом отличается прочностью, гибкостью, низкой теплопроводностью и другими необыкновенными свойствами, которые могут привести к новым открытиям. БНЦ синтезируется различными бактериями и отличается от растительной целлюлозы структурными характеристиками [1-2].

БНЦ – это перспективный материал, который может использоваться в качестве носителя для иммобилизации молочнокислых бактерий. Иммобилизация бактерий на поверхности материала позволяет улучшить их выживаемость и функциональные свойства. БНЦ обладают высокой адсорбционной способностью, повышенной механической прочностью и биологической совместимостью, что делает их идеальным материалом для создания носителей для микроорганизмов. Таким образом, использование БНЦ в качестве носителя для иммобилизации молочнокислых бактерий может быть эффективным способом улучшить качество и функциональные характеристики кисломолочных продуктов.

Целью данной работы являлось исследование влияния на жизнедеятельность молочнокислых бактерий процесса их иммобилизации в структуре бактериальной наноцеллюлозы.

В качестве закваски использовали культуру ацидофильной палочки, которую предварительно активизировали на стерильном обезжиренном молоке при 40 °С в течение 8 часов. Количество клеток ацидофильной палочки в 1 мл закваски составило $3 \cdot 10^8$ КОЕ. БНЦ получали статическим культивированием симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* на полусинтетической питательной среде, состоящей из экстракта черного чая и глюкозы, при температуре 29 °С в течение 10 суток. Затем БНЦ отмывали 2%-ным раствором едкого натра с последующей промывкой 2%-ной соляной кислотой, и промывкой в дистиллированной воде до нейтральной реакции.

Далее готовили три варианта сорбции: в обезжиренное молоко вносили 3 % БНЦ, 5 % БНЦ и 10 % БНЦ. БНЦ предварительно размалывали. Затем проводили гомогенизацию образцов и стерилизацию их в автоклаве при 112 °С в течение 30 минут. В контрольный образец БНЦ не вносили. При этом было отмечено, что после автоклавирования образец с добавлением 10% БНЦ расслоился, образовался плотный сгусток, из которого выделялась прозрачная сыворотка (рис. 1). Возможно, БНЦ в процессе автоклавирования образует плотную пространственную сетку, в ячейках которой заключены белки молока.

В каждый из четырех образцов вносили исходную закваску в количестве 10 %, помещали в термостат при температуре 40 °С и выдерживали в течение 7 суток. В качестве контролируемых параметров были выбраны численность жизнеспособных клеток ацидофильной палочки

(определяли высевом на питательную среду гидролизованное молоко с агаром методом предельных разведений) и титруемая кислотность образцов (титрование пробы 0,1 Н раствором едкого натра). Изменение кислотности образцов в процессе культивирования представлено на рис. 2, изменение численности бактерий – в таблице 1.

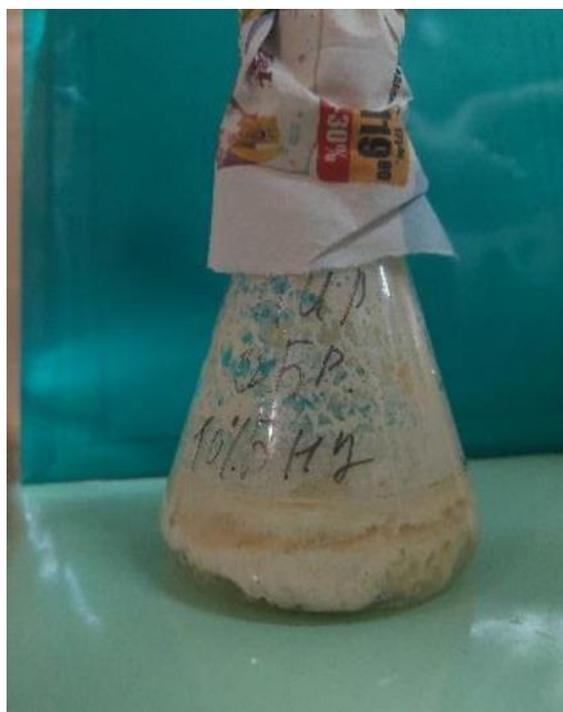


Рисунок 1. Образец обезжиренного молока с добавлением 10 % БНЦ после автоклавирования

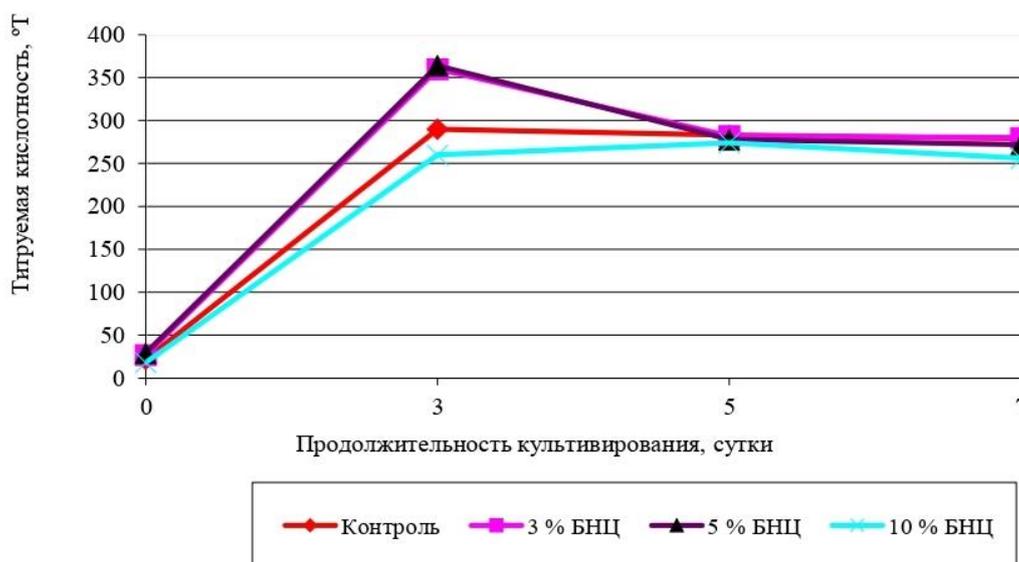


Рисунок 2. Динамика кислотности образцов в процессе культивирования

Можно отметить, что внесение 3 % и 5 % БНЦ способствует более активному росту кислотности, наибольшие значения наблюдаются на 3 сутки культивирования – 360 °Т и 364 °Т соответственно (против 290 °Т в контрольном образце). Далее кислотность во всех образцах начинает снижаться.

Таблица 1

Динамика численности бактерий ацидофильной палочки

Продолжительность культивирования, сутки	Численность микроорганизмов, КОЕ/мл			
	контроль	3% БНЦ	5% БНЦ	10% БНЦ
0	3·10 ⁷			
3	3·10 ⁹	3·10 ⁹	1·10 ⁹	1·10 ⁷
5	2·10 ⁵	1·10 ⁵	1·10 ⁵	-
7	-	-	-	-

Что касается численности бактерий, то при внесении 3 % и 5 % БНЦ численность сохраняется на уровне контроля, при внесении 10 % БНЦ число клеток в образцах снижается существенно, возможно из-за структурной деформации образца.

Таким образом, суммируя полученные данные, можно сделать следующие выводы:

1. Внесение более 5 % БНЦ приводит к образованию сгустка уже на стадии стерилизации, поэтому следует либо вносить меньше этой дозировки, либо изменить способ внесения БНЦ.
2. Иммобилизации бактерий ацидофильной палочки на БНЦ не влечет увеличения численности бактерий, но стимулирует их кислотообразование.
3. Культивирование более 3 суток нецелесообразно, т.к. и кислотность, и численность микроорганизмов по истечению этого времени начинают снижаться.

Библиографический список

1. Gregory D.A., Tripathi L., Fricker A.T.R. et al. Bacterial cellulose: A smart biomaterial with diverse applications // Mater. Sci. Eng. R. 2021. V. 145. P. 100623. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2021.100623>
2. Urbina L., Corcuera M.A., Gabilondo N. et al. A review of bacterial cellulose: sustainable production from agricultural waste and applications in various fields // Cellulose. 2021. V. 28. P. 8229. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04020-4>.
3. Бараненко Д.А., Борисова И.И., Борисов А.Е. Исследование выживаемости молочнокислых микроорганизмов в составе эмульгированных мясных продуктов. // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств». 2016. № 3. С. 12-16. DOI: 10.17586/2310-1164-2016-9-3-12-16.
4. Вобликова Т.В. Жизнеспособность иммобилизованной микрокапсулированием культуры *Bifidobacterium bifidum* в кисломолочном напитке и смоделированных желудочно-кишечных жидкостях. // Вестник МГТУ. 2019. Т. 22, № 3. С. 305-313. DOI: 10.21443/1560-9278-2019-22-3-305-313.
5. Гаврилова Н.Б., Чернопольская Н.Л. Иммобилизация клеток в гель биополимеров как метод защиты микроорганизмов. // Вестник Омского государственного аграрного университета. 2012. № 4 (8). С. 116-122.
6. Зарицкая В.В., Держапольская Ю.И. Микробиология молока и молочных продуктов: учебное пособие. Благовещенск: Изд-во Дальневосточного гос. аграрного ун-та, 2017. 89 с.
7. Защитная среда для хранения молочнокислых бактерий : а.с. 1413131 СССР. № 4005734/28-13; заявл. 03.01.86. ; опубл. 30.07.88, Бюл. 28. 8 с.
8. Николаев Ю.А., Шаненко Е.Ф., Эль-Регистан Г.И. Способы повышения жизнеспособности молочнокислых микроорганизмов. // Микробиология. 2019. Т. 88. № 5. С. 562-567. DOI: 10.1134/S0026365619050124.

УДК 579.67; 579.61

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ *DAEDALEOPSIS TRICOLOR* KS11, СОДЕРЖАНИЕ В НЕЙ ФЛАВОНОИДОВ, ПРОСТЫХ ФЕНОЛОВ

И. Ш. Прозорова, М. А. Сысоева, Е. В. Сысоева, Р. О. Красильников

*ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»
г. Казань, Россия*

В последнее время во всем мире интерес ученых к базидиальным грибам как объектам биотехнологии возрос, поскольку они синтезируют соединения, проявляющие биологически активные свойства. Ксилотроф *Daedaleopsis tricolor* при жидкофазном культивировании способен за короткое время накапливать большое количество биомассы, а полученные экстракты его мицелия обладают антирадикальной активностью. В настоящем исследовании определена антиоксидантная активность культуральной жидкости гриба *Daedaleopsis tricolor* KS11, полученной при погруженном культивировании на 1, 5 и 7 суток, с помощью фосфомолибденового, фенантролинового методов и удалению радикалов DPPH. Также в ней измерено содержание простых фенолов и флавоноидов. Выявлено, что содержание исследуемых соединений и антиоксидантные свойства увеличиваются с течением времени выращивания и достигают максимальных значений к 7 суткам. Полученные данные могут быть использованы для разработки технологий получения продуктов на основе культуральной жидкости гриба *Daedaleopsis tricolor* KS11 для фармацевтических, пищевых и косметических производств.

Ключевые слова: культуральная жидкость, *Daedaleopsis tricolor*, антиоксидантная активность, простые фенолы, флавоноиды.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF DAEDALEOPSIS TRICOLOR KS11 CULTURE LIQUID, ITS CONTENT OF FLAVONOIDS, SIMPLE PHENOLS

I. Sh. Prozorova, M. A. Sysoeva, E. V. Sysoeva, R. O. Krasilnikov

*Kazan National Research Technological University,
Kazan, Russia*

Recently, worldwide interest of scientists in basidial fungi as objects of biotechnology has increased, as they synthesize compounds exhibiting biologically active properties. Xylotrophus *Daedaleopsis tricolor* during liquid phase cultivation is able to accumulate a large amount of biomass in a short time, and the obtained extracts of its mycelium have antiradical activity. In this study, the antioxidant activity of the culture fluid of the fungus *Daedaleopsis tricolor* KS11 obtained by submerged cultivation on days 1, 5 and 7 using phosphomolybdenum, phenanthroline methods and removal of DPPH radicals was determined. It also measures the content of simple phenols and flavonoids. It was revealed that the content of the studied compounds and antioxidant properties increase over time of cultivation and reach maximum values by 7 days. The obtained data can be used to develop technologies for the production of products based on the culture liquid of the fungus *Daedaleopsis tricolor* KS11 for pharmaceutical, food and cosmetic industries.

Keywords: culture fluid, *Daedaleopsis tricolor*, antioxidant activity, simple phenols, flavonoids.

В качестве продуцентов биологически активных веществ в биотехнологии все чаще стали применять культуры грибов, в том числе дереворазрушающих. Основным объектом исследования при их культивировании являются биомасса и эндометаболиты. Однако

экзометаболиты также представляют практический интерес, поскольку они могут обладать биологически активными свойствами.

Грибы рода *Daedaleopsis* можно встретить во влажных лесах в России, они распространены в Сибири и на Дальнем Востоке. Плодовые тела этого рода базидиомицетов окрашены в темно-коричневый, красно-бурый цвета [8]. В литературных источниках наибольшее количество сведений наблюдается у двух видов данного рода гриба – *Daedaleopsis tricolor* и *Daedaleopsis confragosa*. Они являются продуцентами белков, полисахаридов, каротиноидов, фенольных соединений, флавоноидов и меланина [2, 6]. Из экстрактов как дикорастущих плодовых тел, так и культивируемой мицелии и культуральной жидкости *D. tricolor* выделены и установлены структуры терпеноидных соединений, некоторые из которых обладают антиоксидантной и антимикробной активностью [4, 9, 10]. Например, соединение 20(29)-люпен-3-он, которое выделено из природного гриба *D. tricolor* экстракцией петролейным эфиром, проявляет фунгицидное действие против *S. cerevisiae* и *M. gypseum*, антибактериальную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также ингибирует перекисное окисление липидов [4]. В работе [2] показано, что в спиртовом и водном экстрактах плодовых тел *D. tricolor*, произрастающих в природе, содержится больше биологически активных соединений по сравнению с аналогичными экстрактами культивируемого мицелия, но они уступают последним по антиоксидантным свойствам.

Вышеперечисленное показывает перспективу исследования и изучения метаболитов не только природного гриба *D. tricolor*, но выращенного в искусственных условиях, в качестве источника биологически активных соединений. Целью работы является определение оптимальной фазы роста при погруженном культивировании наиболее высоких антиоксидантных свойств у культуральной жидкости, а также накопления в ней флавоноидов и простых фенолов

Штамм гриба *Daedaleopsis tricolor* KS11 был выделен и введен в культуру на кафедре пищевой биотехнологии ФГБОУ ВО «КНИТУ». Для проведения погруженного культивирования использовали 7-суточный инокулят, выращенный на синтетической среде с соевым изолятом (состав, г/л: глюкоза – 20; соевый изолят – 5; KH_2PO_4 – 0,5; MgSO_4 – 0,5). Основной процесс культивирования осуществляли на этой же среде в течение 7 суток в шейкере при 27 °С, количество вращений 200 об/мин. В высушенной культуральной жидкости, отделенной от биомассы, определяли содержание фенолов и флавоноидов, а также антиоксидантные свойства на 1, 5, 7 сутки выращивания. Содержание простых фенолов измеряли с помощью реактива 4-аминоантипирин [1], а флавоноидов – с раствором хлорида алюминия [2]. Антиоксидантные свойства определяли тремя методами: фосфомолибденовым (ТАС) [7], фенантролиновым (ОРМ) [5] и удаления радикалов DPPH [3].

Проведено определение содержания простых фенолов и флавоноидов в высушенной культуральной жидкости. Полученные результаты показаны на рис. 1.

Как видно из данных рисунка, при погруженном культивировании гриба *D. tricolor* KS11 на синтетической среде с соевым изолятом содержание в культуральной жидкости флавоноидов увеличивается на протяжении всего процесса выращивания, а фенолов практически не меняется. Стоит отметить, что на 7 сутки культивирования секретируемых в среду флавоноидов в 6,4 раза больше по сравнению с фенолами. Количество флавоноидов в культуральной жидкости гриба *D. tricolor* KS11 находятся на уровне их содержания в 70 % этанольном экстракте биомассы *Daedaleopsis tricolor* Db-14 (10 ± 3 мг/г) [2].

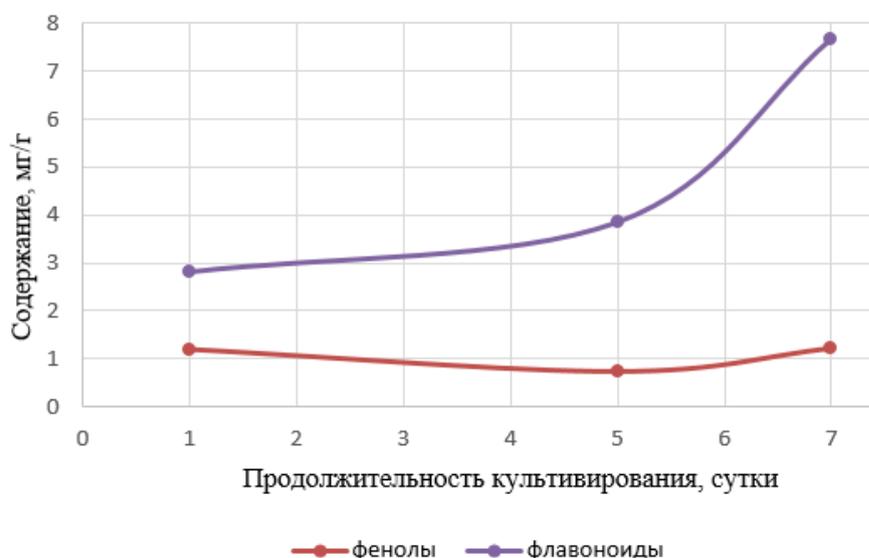


Рисунок 1. Содержание фенолов и флавоноидов в культуральной жидкости *D. tricolor* KS11 от продолжительности культивирования

Результаты определения антиоксидантной активности полученных культуральных жидкостей представлены на рис. 2.

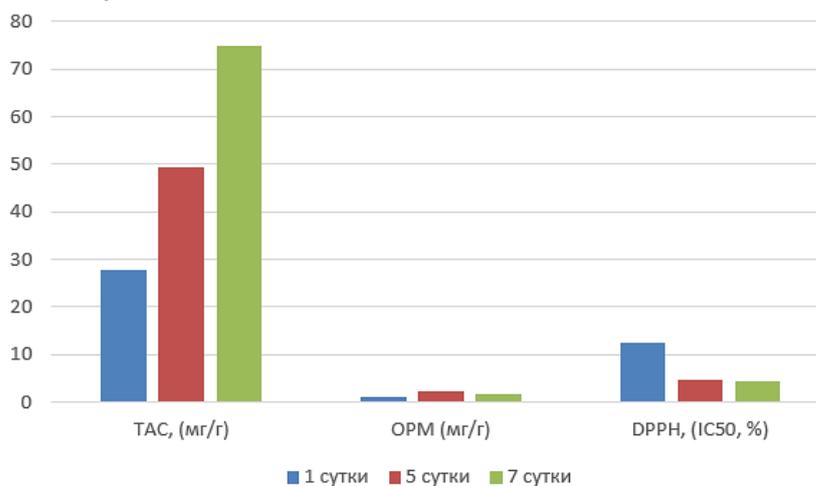


Рисунок 2. Антиоксидантная активность культуральных жидкостей *D. tricolor* KS11

Показано, что при измерении антиоксидантных свойств тремя методами наибольшей активностью обладает культуральная жидкость на 7 сутки выращивания. Значение антиоксидантной активности и содержание флавоноидов коррелируют. Можно предположить, что вклад в данную активность вносят флавоноиды, значение которых к 7 суткам также достигают максимальных значений. В данной работе определены антиоксидантные свойства высушенной культуральной жидкости базидиомицета *D. tricolor* KS11, а также содержание в ней простых фенолов и флавоноидов на протяжении процесса выращивания. Установлено, что к 7 суткам, в стационарной фазе роста, в ней достигается наибольшее количество простых фенолов, флавоноидов, а также она проявляет высокие антиоксидантные свойства.

Библиографический список

1. Полюдек-Фабини Р. Органический анализ / Р. Полюдек-Фабини, Т. Бейрих. – Л.: Химия. – 1981. – 624 с.

2. Проценко, М.А. Подбор питательных сред для глубинного культивирования дереворазрушающего гриба *Daedaleopsis tricolor* (Bull.) Bondartsev et Singer / М.А. Проценко, Н.Е. Костина, Т.В. Теплякова // Биотехнология. – 2018. – Т.34., №1. – С. 45-51.
3. Шпигун, Л.К. Методы количественной оценки антиоксидантной активности лекарственных веществ на основе свободнорадикальных реакций / Л.К. Шпигун, Н.Н. Замятина, Я.В. Шушеначев // Биржа интеллектуальной собственности. – 2011. – Т.10, вып. 3. – С. 35-38.
4. Kim, E.M. Purification, Structure Determination and Biological Activities of 20(29)-lupen-3-one from *Daedaleopsis tricolor* (Bull. ex Fr.) Bond. et Sing. / E.M. Kim, H.R. Jung, T.J. Min // Bulletin of the Korean Chemical Society. – 2001. – V.22., №1. – P. 59-62.
5. Klyushova, L.S. Antioxidant Activity of New Sulphur- and Selenium-Containing Analogues of Potassium Phenosan against H₂O₂-Induced Cytotoxicity in Tumour Cells / L.S. Klyushova, N.V. Kandalintseva, A.Y. Grishanova // CIMB. – 2022. – V.44. – P. 3131-3145.
6. Le, T.N. Anti-ultraviolet, antibacterial, and biofilm eradication activities against *Cutibacterium acnes* of melanins and melanin derivatives from *Daedaleopsis tricolor* and *Fomes fomentarius* / T.N. Le, et al. // Frontiers in Microbiol-ogy. – 2024. – 11 p.
7. Saadaoui, N. Phytochemical Profiling, Antioxidant Potential and Pro-protective Effect of Leaves Extract of Tunisian *Vitis vinifera* Autochthonous Accessions against Acute CCl₄-Injured Hepatotoxicity in Mice / N. Saadaoui, et al. // Heliyon. – 2023. – V.9. – 15 p.
8. Vladykina, V. D. *Daedaleopsis* Genus in Siberia and the Far East of Russia / V.D. Vladykina, V.A. Mukhin, S.M. Badalyan // Information Technology in Biodiversity Research: материалы III Russian National Conference, ноябрь 2020 г., Екатеринбург. – Екатеринбург, 2020. – С. 17-26.
9. Yaoita, Y. Terpenoids and Sterols from Some Japanese Mushrooms / Y. Yaoita, M. Kikuchi, K. Machida // Natural Product Communications. – 2014. – V.9., №3. – P. 419-426.
10. Zhao, J.Y. Sesquiterpenoids and an ergosterol from cultures of the fungus *Daedaleopsis tricolor* / J.Y. Zhao, et al. // Natural Products and Bio-prospecting. – 2013. – V.3. – P. 271-276.

УДК 54-116

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО МЕТОДА РУЛАНДА ДЛЯ РАСЧЕТА СТЕПЕНИ КРИСТАЛЛИЧНОСТИ ОБРАЗЦОВ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

А.И. Прусский¹, Н. Е. Котельникова²

¹*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, Россия*

²*Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия*

Целлюлоза является наиболее распространённым природным биополимером. Этот полисахарид широко применяется в различных отраслях – фармацевтике, медицине, промышленности, что частично обусловлено высокой доступностью целлюлозы, низкой стоимостью и исключительными механическими свойствами, в частности, высоким модулем Юнга. Механические и физико-химические свойства целлюлозы определяются ее надмолекулярной и морфологической структурой, а именно, совершенством ее аморфно-кристаллического состояния. Относительное содержание кристаллического материала в целлюлозе описывается индексом (степенью) кристалличности (СК). В данной работе с использованием модифицированного метода Руланда проведен расчёт СК изученных ранее образцов целлюлозы, а также гидрогеля, выделенного из порошковой целлюлозы, чья картина рассеяния нетипична и полностью не описывается теоретическими моделями.

Ключевые слова: природные полимеры; целлюлоза; модификация, рентгеноструктурный анализ; метод Руланда; гидрогель

APPLICATION OF THE MODIFIED RULAND METHOD FOR CALCULATING THE DEGREE OF CRYSTALLINITY OF CELLULOSE SAMPLES

A.I. Prusskii¹, N.E. Kotelnikova²

¹*Petrozavodsk State University, pr. Lenina 33, Petrozavodsk, Russia*

²*Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

Cellulose is the most abundant natural biopolymer. This polysaccharide is widely used in various fields such as pharmaceuticals, medicine, and industry, which is partly due to its high availability, low cost, and exceptional mechanical properties, particularly high Young's modulus. The mechanical and physicochemical properties of cellulose are determined by its supramolecular and morphological structure, specifically the perfection of its amorphous-crystalline state. The relative content of crystalline material in cellulose is described by the crystallinity index (degree of crystallinity). In this work, the crystallinity indices of previously studied cellulose samples and hydrogel derived from powdered cellulose were calculated using the modified Ruland method. The scattering pattern of the latter is atypical and is not fully described by theoretical models.

Keywords: natural polymers; cellulose; modification; X-ray diffraction analysis; Ruland method; hydrogel

Целлюлоза является высокомолекулярным линейным полимером, состоящим из звеньев D-глюкопиранозы, соединённых β-1,4-гликозидными связями. Гидроксильные группы в звеньях макромолекул целлюлозы образуют внутри- и межмолекулярные водородные связи, что приводит к формированию упорядоченных кристаллических структур [3]. Целлюлоза и композиты на ее основе обладают не только хорошими механическими свойствами, но и

перспективными физико-химическими свойствами. Механические свойства микрофибрилл в значительной степени зависят от степени кристалличности и организации обеих фаз целлюлозы — кристаллической и аморфной [1,4]. Известно также, что кристаллические области определяют термическую стабильность целлюлозы [5], а увеличение кристалличности приводит к возрастанию плотности материала [6]. В тех случаях, когда преобладает аморфная составляющая, наблюдаются более высокая влагоудерживающая способность [7], растворимость и химическая активность [8,9]. Поэтому анализ структурных характеристик целлюлозных объектов важен для описания их свойств.

Для оценки СК целлюлозы разработано большое количество методов [10], к числу которых относятся методы Сегала [11], Руланда [12] и др. В данной работе степень кристалличности рассчитывали методом Руланда, усовершенствованным с целью более точного определения СК целлюлозы и материалов на ее основе. Модифицированный метод имеет улучшенные алгоритмы для разделения вкладов в картину рассеяния кристаллических и аморфных областей и использование более точных моделей для описания фона.

Методика расчета степени кристалличности данным методом целлюлозных образцов, которые имеют типичные картины рассеяния, хорошо изучена и апробирована. В качестве примера на рисунке 1 представлены рентгенограммы образца порошковой целлюлозы льна (рис. 1а) и мерсеризованного хлопка (рис. 1б) (Институт химии Коми НЦ УрО РАН, Лаборатория химии растительных полимеров) [13], зарегистрированные на дифрактометре ДРОН-3 на $FeK\alpha$ излучении в геометрии на отражение.

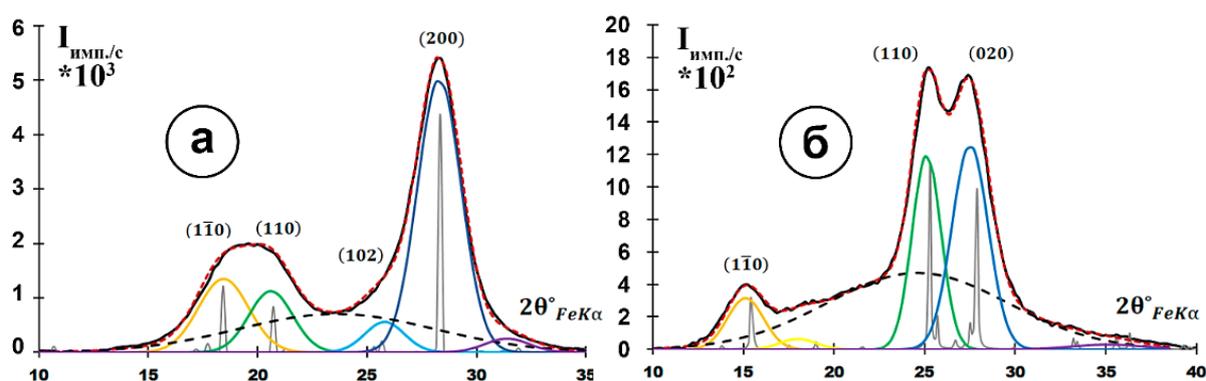


Рис. 1. Рентгенограммы порошковой целлюлозы льна (а) и мерсеризованного хлопка (б) в сравнении с теоретическими рентгенограммами, построенными для фаз целлюлозы 1β (рис. 1а) и целлюлозы II (рис. 1б).

Из рисунка видно, что картина рассеяния порошковой целлюлозы льна (— рис. 1а) характеризуется двумя диффузными максимумами. Такой вид характерен для природных целлюлоз [13], и хорошо согласуется с картиной рассеяния, построенной для теоретической фазы целлюлозы 1β (— рис. 1а), а рентгенограмма мерсеризованного хлопка (— рис. 1б) согласуется с теоретической рентгенограммой целлюлозы II (— рис. 1б).

Идея представленного в данной работе модифицированного метода Руланда заключается в том, что экспериментальная кривая рассеяния (— рис. 1) раскладывается на сумму интегральных интенсивностей кристаллических максимумов и «аморфной» составляющей (— —). Рассчитав отношение суммарной интегральной интенсивности кристаллической составляющей и общей интегральной интенсивности, получаем значение СК: 72% и 53% для образцов целлюлозы льна и мерсеризованного хлопка соответственно.

Следует отметить, что новые материалы, синтезированные на основе целлюлозы, не всегда обладают типичными картинами рентгенограмм. Для таких материалов оценка надмолекулярных параметров с помощью рентгеноструктурного анализа является

нетривиальной задачей. В данной работе проведено сравнительное исследование двух образцов: порошковой целлюлозы (ПЦ), полученной сульфатной варкой из древесной лиственной белой лигноцеллюлозы [15] и гидрогель, синтезированный из порошковой целлюлозы. Гидрогель получали из раствора лиственной ПЦ 1.0–3.0 масс. % концентрации в смеси ДМАА/LiCl путем спонтанной регенерации и последующей самоорганизации целлюлозных цепей без применения осадителей, давления и повышенной температуры [15]. Основные свойства исследованных образцов представлены в табл. 1.

Рентгенограммы модифицированного образца ПЦ, полученные на дифрактометре ДРОН-6 на $\text{CuK}\alpha$ излучении в геометрии на просвет, в сравнении с теоретическими рентгенограммами, полученные для моделей целлюлозы I β (рис. 2б) и целлюлозы II (рис. 2в), представлены на рис. 2.

Таблица 1

Характеристики порошковой лиственной целлюлозы и гидрогеля, полученного из нее

Содержание основных компонентов, %		СП _v	Длина волокон, мкм	УП, м ² /г	ВУ, %	ППР, нм
целлюлоза	лигнин					
Порошковая целлюлоза						
79.5±1.3	7.9±0.3	240	50-90	5.7	54	4.2
Гидрогель						
-	0.1	115	-	41.0	2500	4.5

СП_v – средневязкостная степень полимеризации; УП – удельная поверхность; ВУ – водоудерживающая способность [15]; ППР – поперечный размер кристаллитов.

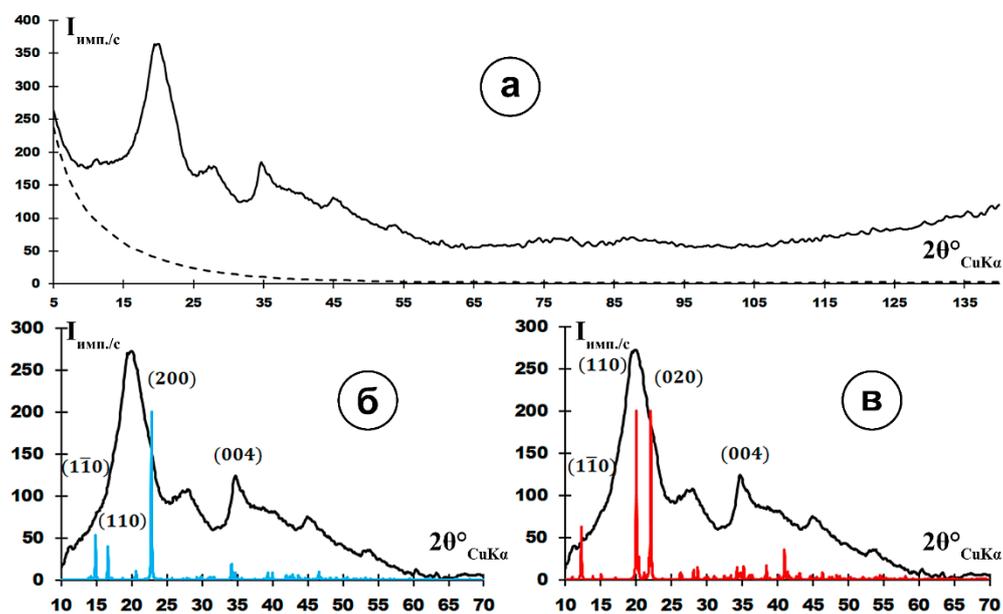


Рис. 2. Рентгенограммы исследуемого образца ПЦ — и воздуха — — (а) в сравнении с теоретическими рентгенограммами, построенные для фаз целлюлозы I β — (рис. 2б) и целлюлозы II — (рис.2в).

Из рис. 2 видно, что исследуемый образец ПЦ характеризуется рентгенограммой, характерной для кристалло-аморфных объектов: наблюдается интенсивный диффузный максимум при $2\theta \sim 20^\circ$, и ряд менее интенсивных диффузных рефлексов с увеличением угла рассеяния. При учете рассеяния воздухом и вычета собственного фона, получаем область при 2θ от 10° до 70° , которая не согласуется с теоретической рентгенограммой целлюлозы I β (рис. 2б), и недостаточно хорошо коррелирует с теоретической рентгенограммой целлюлозы II (рис. 2в). Однако при сравнении экспериментальной картины рассеяния модифицированного образца ПЦ

и теоретической картины рассеяния, рассчитанной для модели целлюлозы II, можно отметить следующее: интенсивный диффузный экспериментальный пик соответствует теоретическому рефлексу (110); в положении теоретического максимума (020) наблюдается перегиб на экспериментальной кривой; пик при $2\theta \sim 34.7^\circ$ характеризует длину элементарных фибрилл, а его интенсивность свидетельствует об анизотропии исследуемого образца [9].

Подобный вид рентгенограмм, полученных для модифицированных образцов целлюлозы, рассматривался ранее в статье [17], в которой надмолекулярная структура и ближний порядок «аморфного» образца были установлены на основе модели целлюлозы II.

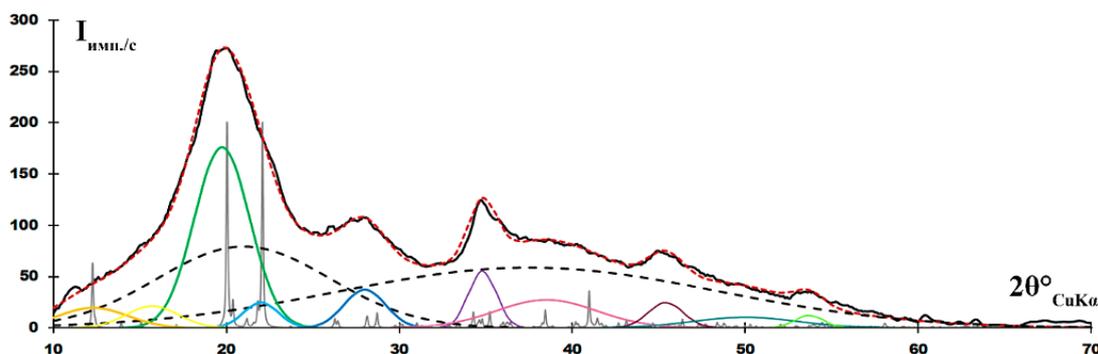


Рис. 3. Рентгенограмма исследуемого образца гидрогеля ПЦ, разложенная на сумму интегральных интенсивностей.

Кривая рассеяния исследуемого образца гидрогеля была разложена на сумму интегральных интенсивностей кристаллической составляющей фазы целлюлозы II и диффузных максимумов аморфной составляющей. Различие по сравнению с ранее изученными образцами заключается в том, что анализируемая область рентгенограммы исследуемого образца от 10° до 70° вдвое шире области, используемой для стандартных образцов целлюлозы (рис. 1). Это позволило при анализе контура кривой рассеяния выделить не одно, а два аморфных гало (— — рис. 3) для корректного описания данной рентгенограммы.

Следует отметить также, что на рентгенограмме (рис. 3) видно сильное перераспределение интенсивности рассчитанных контуров отражений (110) (— рис.3) и (020) (— рис.3) по сравнению с соответствующими данными для кристаллической целлюлозы II, что говорит об изменении структурного состояния исследуемого образца. Помимо рефлексов (— (110); — (110); — (020); — (004)), выделено еще шесть аппроксимирующих контуров, которые описывают менее интенсивные группы рефлексов, находящихся в близком диапазоне углов.

Таким образом, корректно описан экспериментальный контур рентгенограммы десятью аппроксимирующими пиками, согласующимися с контуром теоретической модели целлюлозы II, и двумя аморфными гало. Степень несоответствия экспериментальной (— рис.3) и рассчитанной рентгенограмм (— — рис.3) составила $\sim 5\%$.

Таким образом, используя модифицированный метод Руланда, оценена степень кристалличности образца гидрогеля, синтезированного на основе лиственной ПЦ, значение которой составило 38%, что согласуется с представлением о кристалло-аморфных образцах и результатами, описанными в литературе [10].

Библиографический список

1. Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindström, T., Ankerfors, M., Gray, D., Dorris, A. Nanocelluloses: A new family of nature-based materials // Cellulose. 2011. Vol. 18, no. 3. P. 563-567. DOI: 10.1007/s10570-014-0213-7.

2. Казаков Я.В., Казакова О. Я., Манахова Т. Н., Малков А. В. Определение упругих констант целлюлозно-бумажных материалов при растяжении в плоскости листа // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2015. – Т. 81, № 8. – С. 53-58.
3. Park, S., Baker, J. O., Himmel, M. E., Parilla, P. A., Johnson, D. K. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance // *Biotechnology for Biofuels*. 2010. Vol. 3, no. 10. P. 1-10. DOI: 10.1186/1754-6834-3-10.
4. Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P., Bohn, A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material // *Angewandte Chemie International Edition*. 2005. Vol. 44, no. 22. P. 3358-3393. DOI: 10.1002/anie.200460587.
5. French, A. D. Idealized powder diffraction patterns for cellulose polymorphs // *Carbohydrate Polymers*. 2014. Vol. 112. P. 439-444. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.04.027.
6. Nishiyama, Y., Langan, P., Chanzy, H. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I β from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction // *Journal of the American Chemical Society*. 2002. Vol. 124, no. 31. P. 9074-9082. DOI: 10.1021/ja0257319.
7. O'Sullivan, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels // *Progress in Polymer Science*. 1997. Vol. 22, no. 1. P. 151-207. DOI: 10.1016/S0079-6700(96)00010-5.
8. Medronho, B., Romano, A., Miguel, M. G., Stigsson, L., Lindman, B. Rationalizing cellulose (in)solubility: reviewing basic physicochemical aspects and role of hydrophobic interactions // *Carbohydrate Polymers*. 2012. Vol. 87, no. 2. P. 1079-1096. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.04.043.
9. Habibi, Y., Lucia, L. A., Rojas, O. J. Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications // *Chemical Reviews*. 2010. Vol. 110, no. 6. P. 3479-3500. DOI: 10.1021/cr900339w.
10. Saurov S.K., Svedström K., Kotelnikova N. Comparative study of powder celluloses and cellulose hydrogels by WAXS method. Impact of measurement technique and computation on variability of results // *Cellulose Chem. Technol.* – 2019. – Vol. 53, No. 9-10. – P. 885-896. DOI: 10.35812/CelluloseChemTechnol.2019.53.86
11. Park, S., Baker, J. O., Himmel, M. E., Parilla, P. A., Johnson, D. K. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance // *Biotechnology for Biofuels*. 2010. Vol. 3, no. 10. P. 1-10. DOI: 10.1186/1754-6834-3-10.
12. French, A. D. Increment in evolution of cellulose crystallinity analysis // *Cellulose*. 2020. Vol. 27. P. 5445-5448. DOI: 10.1007/s10570-020-03172-z.
13. Прусский А. И., Алешина Л. А. Рентгеновские исследования целлюлозы хлопка и льна в различных состояниях // Структура и физико-химические свойства целлюлоз и нанокомпозитов на их основе / под ред. Л. А. Алешинной, В. А. Гуртова, Н. В. Мелех. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2014. С. 98-133.
14. Park, S., Baker, J. O., Himmel, M. E., Parilla, P. A., Johnson, D. K. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance // *Biotechnology for Biofuels*. 2010. Vol. 3, no. 10. P. 1-10. DOI: 10.1186/1754-6834-3-10.
15. Щербакова Т.П., Котельникова Н. Е., Быховцева Ю. В. Сравнительное изучение образцов порошковой и микрокристаллической целлюлозы различного природного происхождения. Физико-химические характеристики // *Химия растительного сырья*. 2011. №3. С. 33–42.
16. Котельникова Н.Е., Михаилиди А.М., Мартакова Ю.В. Получение целлюлозных гидрогелей при самоорганизации из растворов в ДМАА/LiCl и их свойства // *Высокомолекулярные соединения. Серия А*, 2017, том 59, № 1, с. 63–75. DOI: 10.7868/S2308112017010084.
17. Прусский А. И., Алешина Л. А. Компьютерное моделирование атомной структуры регенерированной целлюлозы // *Высокомолекулярные соединения А*. 2016. Т. 58. № 3. С. 268-281. <https://doi.org/10.7868/S2308112016030147>

УДК543.55

ИЗУЧЕНИЕ ЭЛЕКТРОГЕННОСТИ ИЗОЛЯТА RHODOCOCCELECTRODIPHILUS С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА

*К.В. Ревякина¹, С.Е. Тарасов², Ю.В. Плеханова², А.Г. Быков², Г.В. Хохлова²,
М. Б. Вайнштейн², А.Н. Решетилов²*

¹ Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П.
Королева, Самара, Россия

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, ФИЦ
Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Пушчино, Россия

В статье рассмотрены электрохимические особенности поведения изолята грамположительного микроорганизма *Rhodococcus electrodiphilus* при его иммобилизации на графитовом печатном электроде. Данный микроорганизм был использован как биокатализатор амперометрического биосенсора, изучена возможность и условия передачи электронов от данных микроорганизмов на электрод в процессе трансформации различных субстратов. Показано влияние иммобилизующих полимерных гелей и углеродных наноматериалов на активность данного микроорганизма и возможность его долговременной работы в составе биосенсора. Оценены перспективы использования *R. Electrodiphilus* в качестве биокатализатора биосенсора для детекции глюкозы, а также 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Ключевые слова: *Rhodococcus electrodiphilus*, электрогенность, микробный биосенсор, электрохимические свойства, биокатализатор

EVALUATION OF THE ELECTROGENICITY OF RHODOCOCCUS ELECTRODIPHILUS ISOLATE USING AN ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR

*K.V. Revyakina¹, S.E. Tarasov², Y.V. Plekhanova², A.G. Bykov², G.V. Khokhlova²,
M. B. Wainshtein², A.N. Reshetilov²*

¹ S.P. Korolev Samara National Research University, Samara, Russia

² G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Federal Research
Center "Pushchino Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences"
Pushchino, Russia

The paper discusses the electrochemical behavior of an isolate of Gram-positive microorganism *Rhodococcus electrodiphilus* upon its immobilization on a graphite screen-printed electrode. This microorganism was used as a biocatalyst for an amperometric biosensor, the possibility and conditions of electron transfer from these microorganisms to the electrode in the process of transformation of various substrates were studied. The influence of polymer gels and carbon nanomaterials on the activity of this microorganism and the possibility of its long-term operation as part of the biosensor was shown. The prospects of using *R. electrodiphilus* as a biocatalyst of biosensor for the detection of glucose and 2,6-dichlorophenolindophenol were evaluated.

Keywords: *Rhodococcus electrodiphilus*, electrogenicity, microbial biosensor, electrochemical properties, biocatalyst

Электрогенные бактерии или экзоэлектрогены – принято название микроорганизмов, которые способны переносить электроны на внешние акцепторы [1]. Подобные микроорганизмы находят свое применение в производстве биотоплива, биоремедиации, очистке сточных вод, а также в области биосенсоров [2]. В настоящее время большое внимание исследователей направлено на то, чтобы максимизировать способность бактерий к электронному переносу и позволить масштабировать эти технологии из лабораторных масштабов до промышленного уровня. До недавнего времени область изучения внешнего электронного переноса была ограничена достаточно узким рядом электрогенных грамотрицательных бактерий, потому что считалось, что грамположительные бактерии меньше способны к электронному переносу, из-за своих более толстых и менее проводящих клеточных стенок [3]. Тем не менее в 2018 году были опубликованы работы, в которых показаны электрогенные свойства и пути внешнего электронного переноса для некоторых грамположительных бактерий, включая *Listeria monocytogenes* и *Enterococcus faecalis* [4-6]. Это привело к новой волне интереса к грамположительным бактериям в качестве потенциальных электрогенов, в том числе в качестве биокатализаторов для электрохимических биосенсоров.

Одним из перспективных биокатализаторов для электрохимических биосенсоров могут являться бактерии рода *Rhodococcus*. Это филогенетически и физиологически разнообразная группа бактерий в составе нокардиоформных актиномицетов. Они были выделены из самых разных источников, включая почву, горные породы, подземные воды, морские отложения, фекалии животных, внутренние органы насекомых, здоровых и больных животных и растений. Представители рода *Rhodococcus* демонстрируют выдающуюся способность к деградации и трансформации широкого спектра природных органических и ксенобиотических соединений через разнообразные катаболические пути [7]. Помимо способности метаболизировать широкий спектр химических соединений, толерантность клеток к токсичным субстратам и растворителям, частое отсутствие репрессии катаболитов, производство биосурфактантов и устойчивость в окружающей среде делают их отличными кандидатами для биоремедиации и биоконверсии, а также используются в составе биосенсоров.

В качестве потенциального биокатализатора в работе была использована культура, выделенная из корродированного сплава металлов. Штамм SiAl был идентифицирован на основании сравнения 16S рНК и показал наибольшее сходство с *Rhodococcus electrodiphilus*, а именно 99,71%.

Цель работы – оценка электрогенности изолята *R. electrodiphilus* SiAl и возможности его использования в составе электрохимического биосенсора. Для этого изучали его способность к переносу электронов на внешние акцепторы, а именно на графитовые печатные электроды.

Культивирование микроорганизмов проводили на жидкой и агаризованной среде 5/5 состава: аминокислота – 60 мл, триптон – 5 г, дрожжевой экстракт – 1 г, соевый экстракт – 30 мл, агар-агар – 20 г, вода дистиллированная до 1000 мл; pH 7.2. Полученную биомассу из культуральной жидкости центрифугировали при комнатной температуре 10 минут (10000 об/мин) и ресуспендировали. Измерения электрогенной активности микроорганизмов производили с использованием электрохимических биосенсоров второго поколения, основой которых служили трехконтактные графитовые печатные электроды (ООО «КолорЭлектроникс», Москва, Россия).

Для оценки электрогенного потенциала бактерий *Rhodococcus* был использован метод циклической вольтамперометрии. Для этого были получены циклические вольтамперные характеристики электрода (рис. 1), на котором была адсорбирована бактериальная клетка *R. electrodiphilus* SiAl в фосфатном буфере. Измерение проводили в присутствии медиатора электронного транспорта – 2,6-дихлорофенолиндофенола (ДХФИФ, 138 мкМ) и субстрата – глюкозы (5 мМ). Из рисунка видно, что при добавлении в буфер медиатора и субстрата величина тока окисления в диапазоне увеличивается от 200 до 620 нА, что свидетельствует о наличии переноса электронов в данной системе.

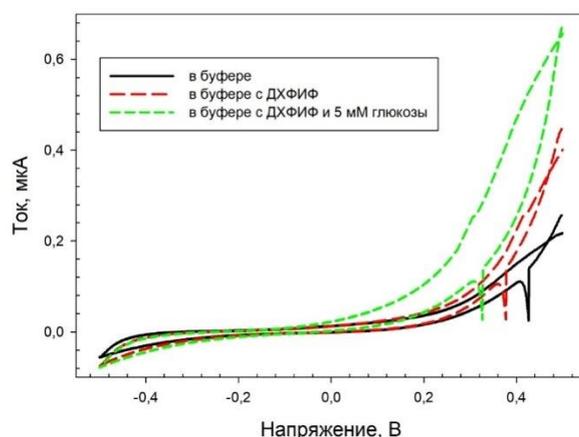


Рисунок 1. Циклические вольтамперограммы для электрода с иммобилизованными сорбцией клетками *Rhodococcus electrodiphilus* SiAl в различных условиях измерения

Возможность использования данных микроорганизмов как биокатализатора для электрохимических биосенсоров оценили с помощью метода хроноамперометрии. Для этого изучили изменение уровня тока электрода при добавлении субстрата. На рис. 2. показан типичный вид сигнала биосенсора на основе адсорбированных на рабочем электроде клеток *R. electrodiphilus* SiAl на введение ДХФИФ и глюкозы.

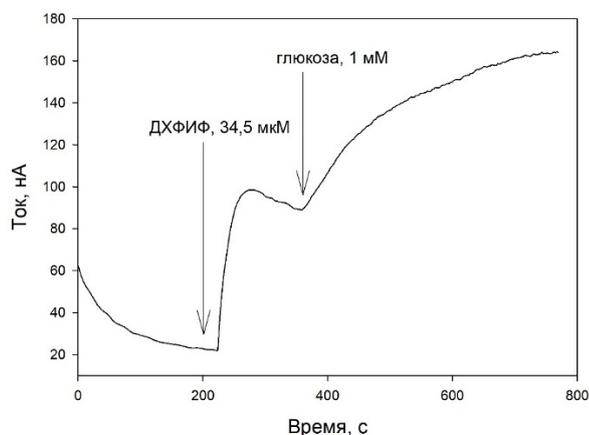


Рисунок 2. Изменение уровня тока биосенсора при введении ДХФИФ (34,5 мкМ) и глюкозы (1 мМ). Введение субстратов показано стрелками.

Как видно из рис. 2, 2,6–дихлорофенолиндофенол, который часто применяется в электрохимических микробных биосенсорах в качестве медиатора электронного транспорта [8], является субстратом для клеток *R. electrodiphilus* SiAl, что осложняет его использование в этом качестве в электрохимическом биосенсоре. Тем не менее, его применение позволяет регистрировать увеличение тока биосенсора при биотрансформации клетками дополнительного субстрата, например, глюкозы. В отсутствие данного медиатора амперометрического сигнала на введение глюкозы в измерительную кювету не наблюдали ни в случае регистрации циклических вольтамперограмм, ни в случае хроноамперометрических измерений.

Оценили влияние уровня pH измерительного раствора на сигнал биосенсора при введении ДХФИФ. Показали, что оптимальным является буферный раствор с $pH = 7,6$. Было изучено влияние концентрации ДХФИФ на отклик биосенсора. Сигнал биосенсора достигал уровня в 40 нА при достижении концентрации 65 мкМ, дальнейшее увеличение концентрации не приводило

к увеличению сигнала. Была изучена стабильность электрода при непрерывном измерении ДХФИФ (34,5 мкМ) в течение суток. Сигнал биосенсора уменьшился на 60% за первые 10 измерений, а затем стабилизировался на уровне ~ 40 нА.

Были изучены сигналы биосенсора на основе *R. electrodiphilus* SiAl на различные концентрации глюкозы и построены калибровочные зависимости. Полученные данные глюкозы были обработаны с помощью четырехпараметрического уравнения Хилла:

$$I = I_0 + \frac{I_{max} \times S^h}{K_M^h + S^h},$$

где I_{max} – максимальный сигнал биосенсора, достигаемый при концентрации субстрата (S), стремящейся к бесконечности; K_M^h – кажущаяся константа Михаэлиса-Ментен, h – коэффициент Хилла, I_0 – начальная скорость реакции.

Коэффициент Хилла для данного биосенсора больше 0, что говорит о положительной кооперативности (т.е. присоединение одной молекулы субстрата облегчает присоединение следующих) ферментных систем данного микроорганизма. Значение кажущейся константы Михаэлиса составило $0,041 \pm 0,005$, что свидетельствует о высоком сродстве биокатализатора к глюкозе. Диапазон детекции составил 0,005 – 0,30 мМ, при этом чувствительность биосенсора в линейном диапазоне составила $1697,80 \text{ нА} \cdot \text{мМ}^{-1}$.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии электрогенных свойств у изолята грамположительного микроорганизма *Rhodococcus electrodiphilus* SiAl. Наличие электрохимического отклика бактерий в присутствии 2,6-дихлорофенолиндофенола свидетельствует о потенциале применения данного штамма для создания биосенсоров, которые могут быть применены при детекции различных фенольных соединений.

Библиографический список

1. Rabaey K., Angenent L., Schroder U., Keller J. Bioelectrochemical Systems: From Extracellular Electron Transfer to Biotechnological Application, 1st ed. IWA Publishing: London, UK.
2. Choi S. Electrogenic Bacteria Promise New Opportunities for Powering, Sensing, and Synthesizing // Small. 2022. V. 18. 2107902. <https://doi.org/10.1002/sml.202107902>
3. Doyle L. E., Marsili E. Weak electricigens: A new avenue for bioelectrochemical research // Bioresource Technology. 2018.V. 258. P. 354–364. doi: 10.1016/j.biortech.2018.02.073
4. Light S.H., Su L., Rivera-Lugo R. et al. A flavin-based extracellular electron transfer mechanism in diverse Gram-positive bacteria // Nature. 2018. V. 562. № 7725. P. 140–144. doi: 10.1038/s41586-018-0498-z.
5. Pankratova G., Leech D., Gorton L., Hederstedt, L. Extracellular Electron Transfer by the Gram-Positive Bacterium *Enterococcus faecalis* // Biochemistry. 2018. V. 57. № 30. P. 4597–4603. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00600
6. Keogh D., Lam L.N., Doyle L.E. et al. Extracellular Electron Transfer Powers *Enterococcus faecalis* Biofilm Metabolism // mBio. 2018. V. 9. № 2.e00626-17. doi: 10.1128/mBio.00626-17.
7. Filonov A., Akhmetov L., Puntus I., Solyanikova I. Removal of oil spills in temperate and cold climates of Russia experience in the creation and use of biopreparations based on effective microbial consortia // Biodegradation, Pollutants and Bioremediation Principles. Bidoia, E.D., Motagnolli, R.N., Eds.; Taylor's & Francis CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2021.P. 137–159.
8. Reshetilov A., Alferov S., Tomashevskaya L., Ponamoreva O. Testing of Bacteria *Gluconobacter Oxydans* and Electron Transport Mediators Composition for Application in Biofuel Cell // Electroanalysis. 2006. V. 18. P. 2030–2034.

УДК 57.084.1 : 578.71

**БИОТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МНОЖЕСТВЕННЫХ ЭФФЕКТОВ
ДЕЙСТВИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *UGT/IAGLU* ИЗ КУКУРУЗЫ *ZEA MAYS L.* ДЛЯ
УВЕЛИЧЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР И
АКТИВНОГО СИНТЕЗА АНТИГЕННЫХ БЕЛКОВ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ВАКЦИН
ПРОТИВ ОПАСНЫХ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Н.И. Рекославская, А.В. Третьякова, А.А. Чемезова, Ю.В. Нурминская, А.В. Чемезов
*Федеральное Государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт
физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской Академии Наук
664033 Россия, Иркутск, ул.Лермонтова, 132. e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru*

The *ugt/iaglu* gene was isolated from a sweet corn seedling cDNA library in the laboratory under Professor R.S. Bandurski (MSU, East Lansing, USA) and shared with Dr N. I. Rekoslavskaya for further experimental work. The *ugt/iaglu* gene encoded the UDPG-transferase, which participated in the metabolism of IAA, the main plant phytohormone, by binding IAA with glucose and thus creating a depot of auxin in plants. In our work, we used the gene *ugt / iaglu* to improve the hormonal status as much as 20 species of plants both cultivated and wild species by inserting the gene *ugt/iaglu* in binary agrobacterial vectors. As a result of transformation, an increase of growth, development, rooting, and fruit formation was observed in all transgenic plant species tested. The highest level of free and bound IAA was determined and a very high specific activity of UDPG-transferase in these transgenic plants was found. The transformation characteristics were stable in the 16 seed generations. Due to improvement of hormonal status in transgenic plants, the gene *ugt/iaglu* was recruited in experience in biotechnological works for developing of preventive vaccines against HIV/AIDS and hepatitis B (HBV) using classical binary agrobacterial vectors. The coat and core proteins of HIV and HBV were barely expressed in transgenic tomato with the low coefficient of transformation for HIV proteins which was less than 0,001-0,01% and for HBV proteins about 0,01% of yield. But the addition of the *ugt/iaglu* gene revealed in 50% of surviving explants for HIV transformants and up to 100% of surviving for HBV transgenic explants. Furthermore, the yields of target vaccine proteins both for HIV and for HBV increased twice or more. We developed our own new plant expression system on the basis of RdRP (RNA dependent RNA polymerase, RNA encoded) from CMV with antisilent RNA 2b encoded in the same frame as RNA 2a. As the second antisilencer gene, we used the *ugt/iaglu* gene form *Z. mays* because the *ugt / iaglu* gene not only stabilized the hormonal homeostasis of tomato transgenic fruits by prolonging its synthesizing activity, but highly increased the accumulation of "early" and "late" proteins of HPV16 high-risk papillomavirus HPV16 during the development of both prophylactic and therapeutic vaccines against cancer. The HPV antigenic protein yield was about 25% per 1 mg of total soluble protein in transgenic tomato fruit. The high yield of antigenic HPV proteins in our plant expression system allowed us to raise antibodies in mice with high titer, strong avidity, and remarkable cross-reactivity with antigens from unrelated HPV families. In our experiments with mice, antibodies to HPV16 L1, HPV18 L1, HPV16 E2, and HPV6 L1 have higher titer and avidity than analogs from the Santa Cruz company. According to the data these multiple enriched functions of the *ugt/iaglu* gene could not be explained only by the binding and liberation of free auxin during development (for example, fast growth of baby corn after pollination), but by opening new reading frames and accelerating gene expression. Glycosylation and destruction of protein repressors at promoter sites do play important role in this way.

Keywords: IAA, hormonal homeostasis, crop productivity, vaccines development

1. Использование гена *ugt/iaglu* из кукурузы *Zea mays L.*, кодирующего синтез УДФГ-трансферазы/ИУК-глюкоза синтазы (рис.1) для трансформации картофеля и томата (рис.2,3).

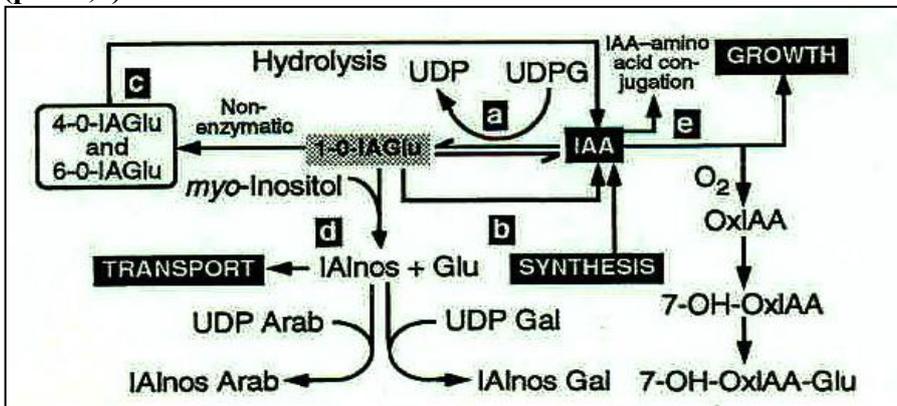


Рисунок1. Схема конъюгирования ИУК с глюкозой, осуществляемого УДФГ-трансферазой/ИУК-глюкоза синтазой

УДФГ-трансфераза осуществляет конъюгирование ИУК и других ксенобиотиков с целью регуляции их концентрации и сохранения гормонального статуса, гомеостаза и устойчивости к неблагоприятным факторам среды.

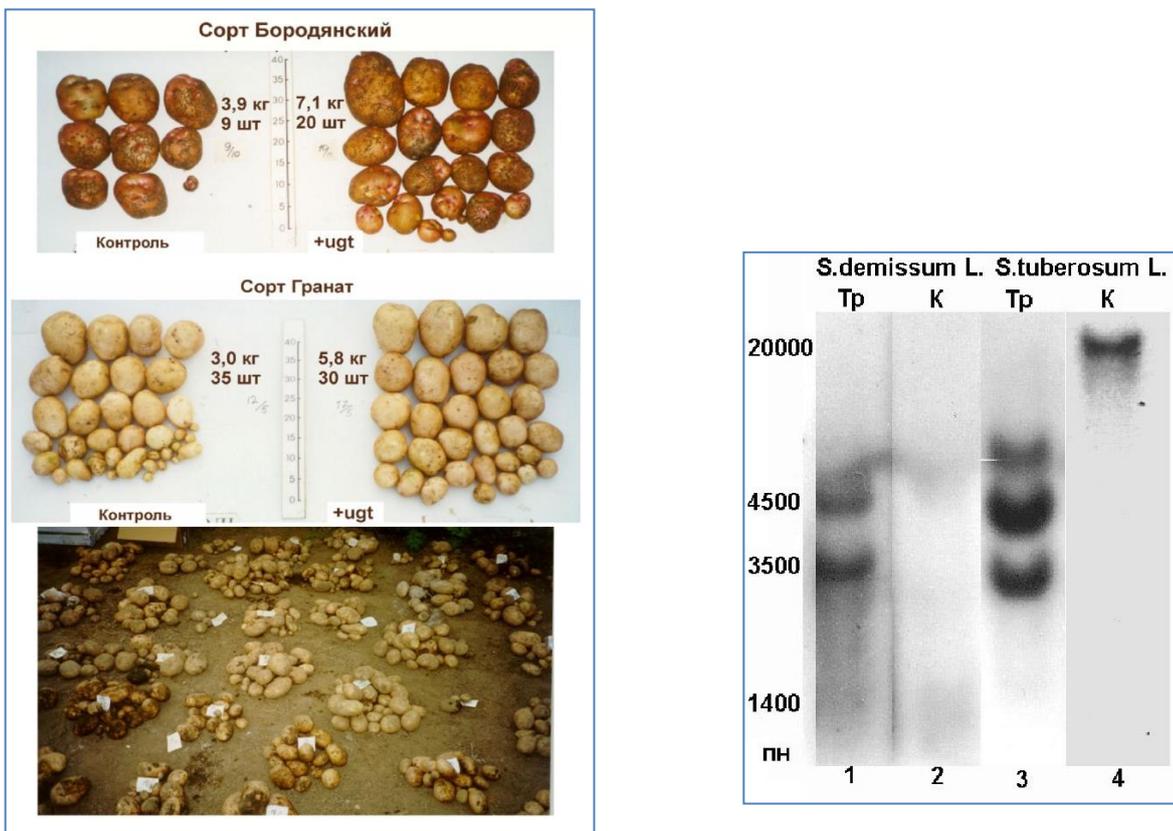


Рисунок 2А. Продуктивность трансгенного картофеля (с.Бородинский и с. Гранат) с геном *ugt/iaglu*. Внизу: каждая кучка — это урожай клубней с одного куста картофеля. Рисунок 2Б. Саузерн блот гибридизация ДНК. ДНК картофеля гибридизовали с *pBlueScript/ugt*, меченого с ³²P-АТФ (электрофорез в 1% агарозе). К - ДНК выделена из нетрансгенного картофеля, Тр - ДНК выделена из трансгенного картофеля. *Solanum demissum L.* - дикий тип, *Solanum tuberosum L.* - с. Бородинский



Рисунок 3. А - Селекция трансгенных проростков томата (с.Вентура) с геном *ugt* (слева), проростки нетрансгенного томата на среде МС, содержащей 1 мг/л 2,4-Д (справа). Б - ПЦР с ДНК, выделенной из трансгенных проростков томата с геном *ugt*. Праймеры к фрагменту в 357 пн гена *ugt*. Крайняя справа дорожка - стандарт DNA ladder 100 bp. Представлены образцы ПЦР ДНК из разных индивидуальных проростков трансгенного томата.



Рисунок 4. Слева - продуктивность трансгенного томата с геном *ugt* после селекции на 2,4-Д. Справа - сравнение урожайности нетрансформированного томата и трансгенного с геном *ugt* томата с одного растения (с. Вентура).

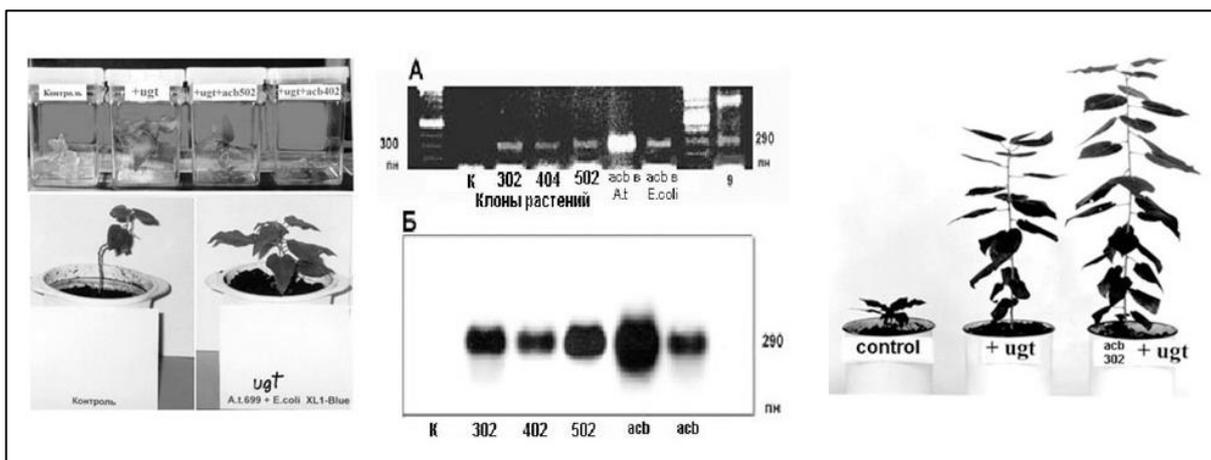


Рисунок 5. Получение быстрорастущих трансгенных растений осины с геном *ugt* и *acb* (кодирующим синтазу мембранного ацилсвязывающего белка). Слева - трансформация *in vitro*, в центре: А - ПЦР с праймерами к гену *acb* (300 пн), Б - саузерн блот гибридизация ДНК осины с геном *acb* (pBIN), меченым ^{32}P -АТР. Представлены индивидуальные клоны трансгенной осины. Справа - акклиматизация на воздухе трансгенных и контрольного растений осины, выращенных *in vitro*.



Рисунок 6. Слева - трансгенные и контрольные растения осины в поле в первый год выращивания, справа - трансгенное и контрольное растения осины через 3 года выращивания в полевых условиях.

Контроль **Трансгенный**

Разовый сбор

Контроль Трансгенный

Урожай, кг/кв.м:
контроль = 15,5, трансгенный = 46,4
Количество плодов, шт :
контроль = 121, трансгенный = 351

2642
1000
500
234
пн

1 2 3 4

1, 2 - ПЦР фрагмента гена *ugt* 234 пн в ДНК трансгенного огурца,
3 - *ugt* в pBlueScript,
4 - ДНК стандарт

Получение трансгенной пекинской капусты

Контроль **acb513+ugt+аср**

Вес, кг
1,0 1,5

ПЦР геномной ДНК салата с праймерами к фрагменту 234 пн гена *ugt* из кукурузы

234 пн

pBlue Script Контроль Трансгенный

Саузерн блот гибридизация геномной ДНК пекинской капусты с зондом фрагмента 234 пн гена *ugt* из кукурузы

234 пн

Контроль Трансгенный pBlue Script

Рисунок 6. Получение трансгенных растений огурца (F1 Моринда) и пекинской капусты.

2. Использование гена *ugt/iaglu* для усиления экспрессии антигенных вирусных белков при получении вакцин

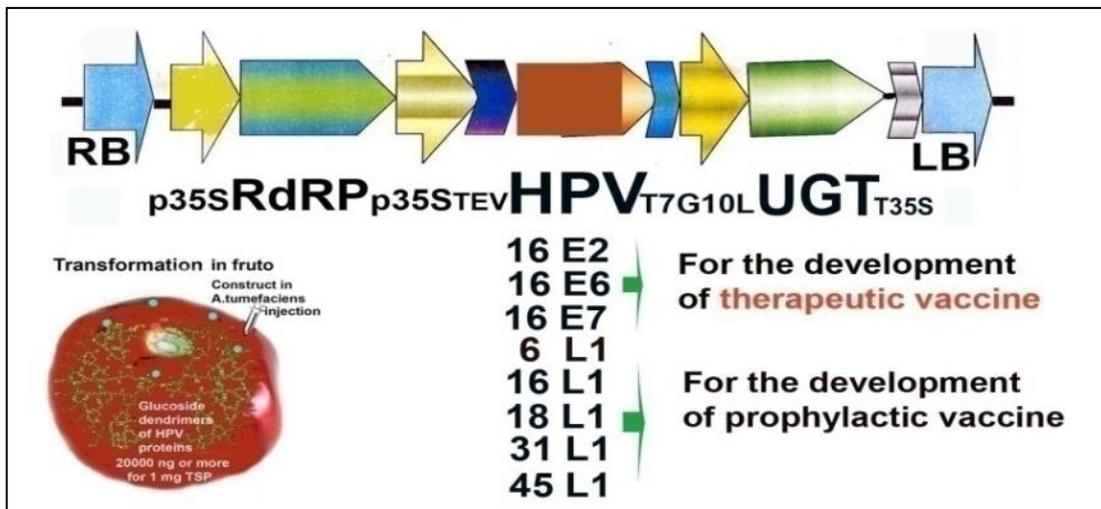


Рисунок 7. Включение гена *ugt* в генетические конструкции для синтеза антигенных белков позволилократно увеличить синтез трудно экспрессируемых вирусных белков в плодах томата

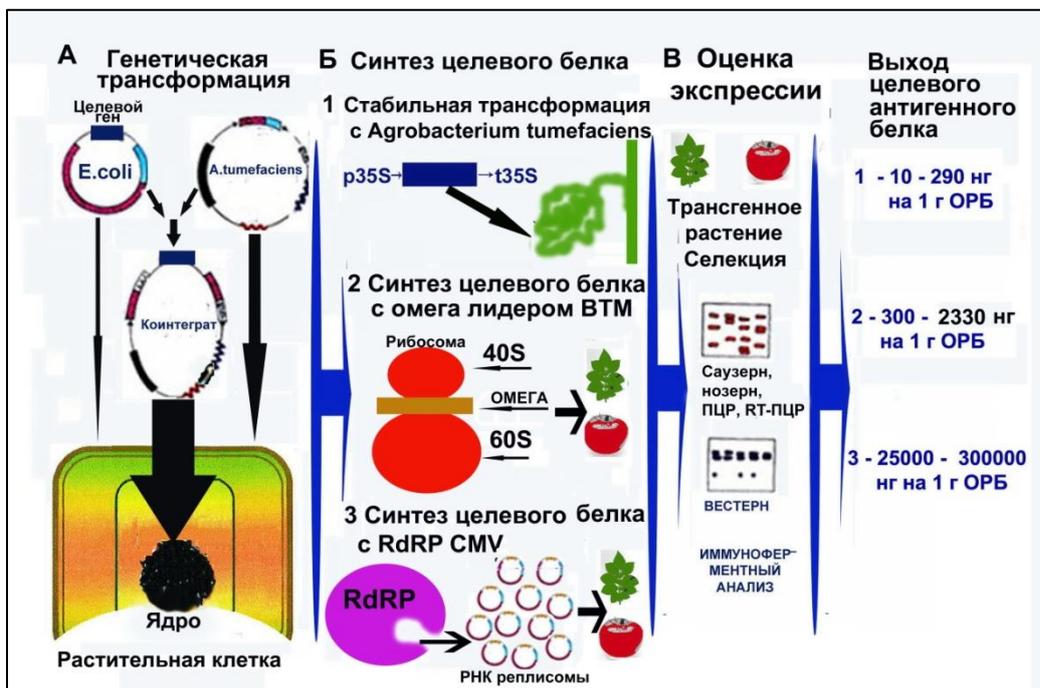


Рисунок 8. Получение антигенного белка при стабильной трансформации с агробактерией и использованием омега лидера РНК ВТМ и RdRP CMV. А – Генетическая трансформация, Б – 3 варианта синтеза антигенного белка: 1 – стабильная трансформация с *A. tumefaciens*, 2 – с омега лидером РНК ВТМ, 3 – с включением RdRP репликазы

Таким образом, использование гена *ugt/iaglu* в рекомбинатных технологиях оказывается весьма перспективным.

УДК 66.02

ПОЛУЧЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ В АППАРАТЕ РОТОРНОГО ТИПА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛАХ

Е.А. Рогова¹, Ю.Д. Алашкевич¹, В.А. Кожухов¹, Е.Г. Киселев²

*¹Сибирский государственный университет науки и технологий
имени академика М. Ф. Решетнева*

Российская Федерация, 660037, г. Красноярск, просп. им. газ. «Красноярский рабочий», 31

*² Сибирский Федеральный Университет, Российская федерация, 660041, г.Красноярск, пр.
Свободный, 79/10*

В статье представлены данные по получению бактериальной целлюлозы во вновь разработанном и запатентованном аппарате роторного типа с использованием роторов различной конфигурации. Показана практическая значимость использования полученной бактериальной целлюлозы в разработке композиционных материалов для применения ее в целлюлозно-бумажной промышленности.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, получение бактериальной целлюлозы, аппарат для получения бактериальной целлюлозы, композиционные материалы, композиционные материалы с применением бактериальной целлюлозы

PRODUCTION OF BACTERIAL CELLULOSE IN A ROTARY-TYPE APPARATUS AND ITS USE IN THE DEVELOPMENT OF COMPOSITE MATERIALS

E.A. Rogova¹, Y.D. Alashkevich¹, V.A. Kozhukhov¹, E.G. Kiselyov²

*¹ Siberian State University of Science and Technology named after Academician M. F. Reshetneva
Russian Federation, 660037, Krasnoyarsk, newspaper Ave. Krasnoyarsk Worker, 31*

² Siberian Federal University, Russian Federation 660041, Krasnoyarsk, 79/10 Svobodny Ave.,

The article presents data on the production of bacterial cellulose in a newly developed and patented rotary-type apparatus using rotors of various configurations. The practical significance of using the obtained bacterial cellulose in the development of composite materials for its application in the pulp and paper industry is shown.

Keywords: bacterial cellulose, production of bacterial cellulose, apparatus for the production of bacterial cellulose, composite materials, composite materials using bacterial cellulose

Бактериальная целлюлоза (БЦ) своего рода уникальный материал. Изучением ее свойств и получением, занимаются ученые со всего мира. Благодаря такой популярности, в настоящее время существует более двухсот запатентованных способов получения БЦ с помощью уксуснокислых бактерий различного рода. Все эти способы можно разделить на два типа: статический и динамический (рис. 1). При статическом способе культивирования, БЦ получается в виде многомерной пленки, образующейся на поверхности биореактора. Главным недостатком такого способа является значительные производственные площади для получения в промышленных и полупромышленных масштабах и низкая производительность. БЦ, получаемая динамическим способом, представляет собой сферы различного диаметра, либо отдельно образовавшиеся волокна. Такой способ позволяет получить БЦ в большем объеме, применять современное оборудование с минимальным участием человека, но, такая БЦ имеет более низкие показатели качества [1].

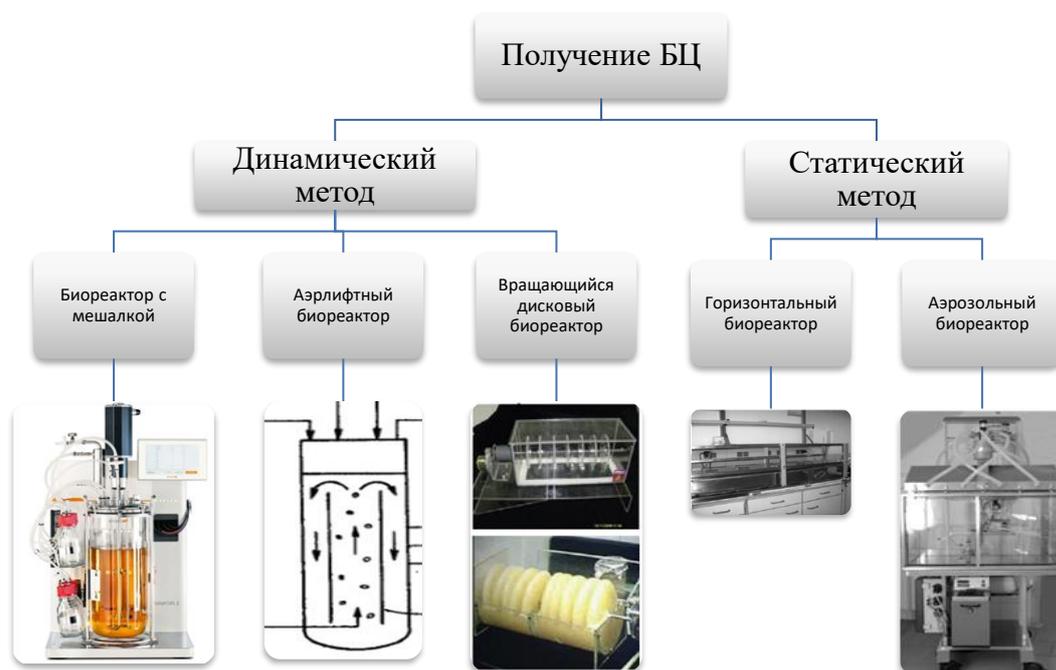
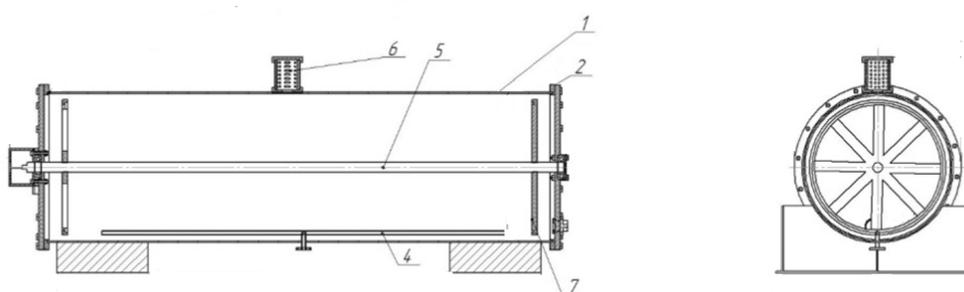


Рис. 1. Способы получения БС

Изучив: основные способы получения БС в настоящее время; их достоинства и недостатки; биореакторы, с помощью которого осуществляется получение БС [2] – коллективом авторов Сибирского государственного университета науки и технологий имени академика М. Ф. Решетнева, был разработан аппарат роторного типа для динамического способа получения БС в виде пленки образующейся на роторах различного типа. Принципиальная схема биореактора представлена на рис.2 [3].



1 – корпус; 2 – крышка; 3 – опора; 4 – подача воздуха; 5 – привод; 6 – фильтр; 7 – крепление ротора

Рисунок 2. Аппарат роторного типа для получения БС

Основной частью аппарата является корпус цилиндрической формы 1. При помощи привода 5 осуществляется вращение вала, на котором с помощью специального крепления 7, зафиксирован ротор. Крышки 2 с помощью болтовых соединений крепятся к фланцам корпуса 1. С помощью устройства 4 методом барботирования в среду подается очищенный воздух. Так же на нижней части корпуса 1 закреплено устройство для поддержания заданной температуры среды. Типы роторов, применяемых для исследования по выявлению оптимальной формы, для получения БС в аппарате роторного типа представлены на рис. 3.



Рисунок 3. Типы роторов, применяемых в биореакторе для получения БЦ

Исследования по получению БЦ в аппарате роторного типа осуществлялись на базе института Биофизики СО РАН в городе Красноярск. Синтез бактериальной целлюлозы осуществлялся штаммом *Comagataeibacter Xylinum* в течении 12 суток. Среда, на основе которой проводилось исследование - среда Хестрина и Шрамма в объеме 1 литр. Исходная концентрация глюкозы 30 г/л, на 5 сутки в среду была введена дополнительная глюкоза в количестве 30 грамм. Частота вращения ротора 2 об/мин. Подогрев среды осуществлялся до 28 °С. Основным показателем эффективности работы аппарата роторного типа, по получению БЦ на роторах различного типа, являлся выход БЦ в размерности г·л/сутки. Результаты исследования представлены на рис. 4 в виде гистограммы.

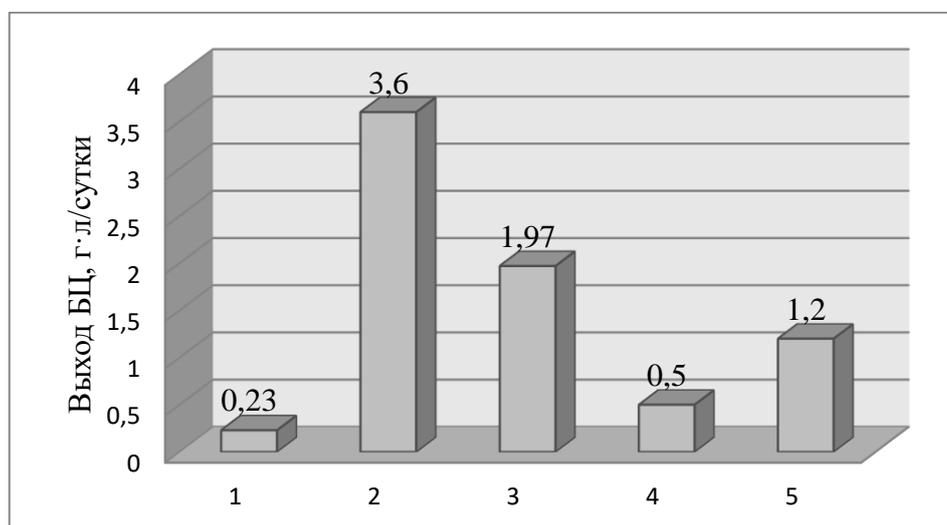


Рисунок 4. Выход БЦ в зависимости от типа использованного ротора (1 – цилиндрический ротор из нержавеющей стали, 2 - ротор в виде пластин из пластика; 3 – цилиндрический пластиковый ротор; 4 – ротор в виде дисков, 5 - статический метод)

Из рисунка видно, что высокая эффективность получения БЦ в аппарате достигалась, при использовании ротора в виде пластин из пластика, при этом продуктивность цилиндрического ротора из нержавеющей стали значительно ниже, даже в сравнении со статическим выращиванием при одинаковых условиях, что может быть обусловлено низкой адгезией с

металлом. Таким образом, полученные результаты подтверждают эффективность получения БЦ в аппарате с определёнными конструкциями ротора.

БЦ, полученная в аппарате роторного типа была использована для получения композиционных материалов для применения в целлюлозно-бумажной промышленности. Для оценки качества готового продукта композиционных полуфабрикатов из волокон растительного и бактериального происхождения, была подготовлена листовая целлюлоза (ЛЦ). Листовая целлюлоза была размолота на установке ЦРА при 150 об/мин. Первоначальная степень помола листовой целлюлозы составляла 15 °ШР. Целлюлозу растительного происхождения концентрацией 4% размалывали до 30 °ШР, 45 °ШР и 60 °ШР. БЦ подвергали процессу разделения на волокна при той же концентрации 4%. Далее составлялся композиционный полуфабрикат в пропорции БЦ/ЛЦ в процентном соотношении: 0/100, 10/90, 20/80 и 30/70. Из композиционного полуфабриката были изготовлены бумажные отливки плотностью 70 г/м². Для определения физико-механических характеристик готовой продукции, бумажные отливки проверили по следующим показателям: разрывная длина, сопротивление продавливанию и сопротивление излому. Результаты проведенных испытаний представлены в виде графиков на рис. 5-7.

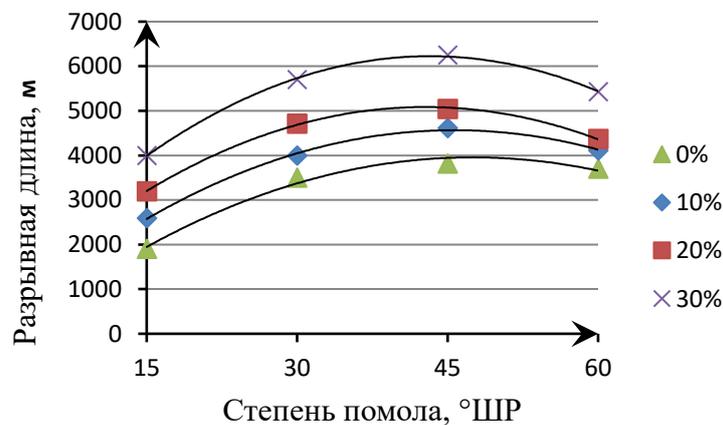


Рисунок 5. Зависимость показателя разрывной длины от степени помола и % содержания БЦ в композиции целлюлозно-бумажных материалов

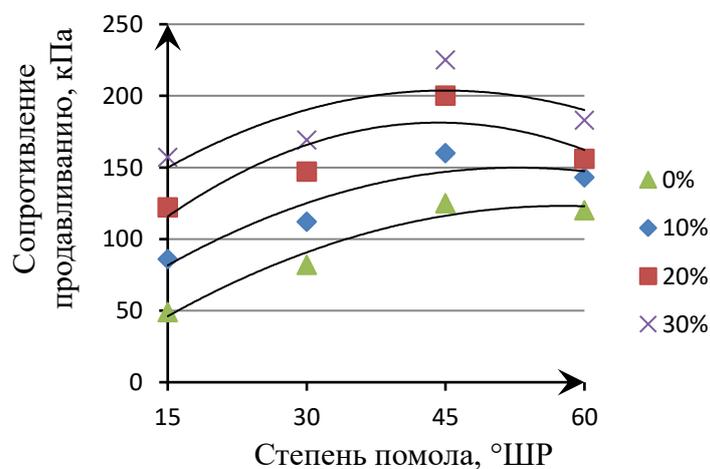


Рисунок 6. Зависимость показателя сопротивления продавливанию от степени помола и % содержания БЦ в композиции целлюлозно-бумажных материалов

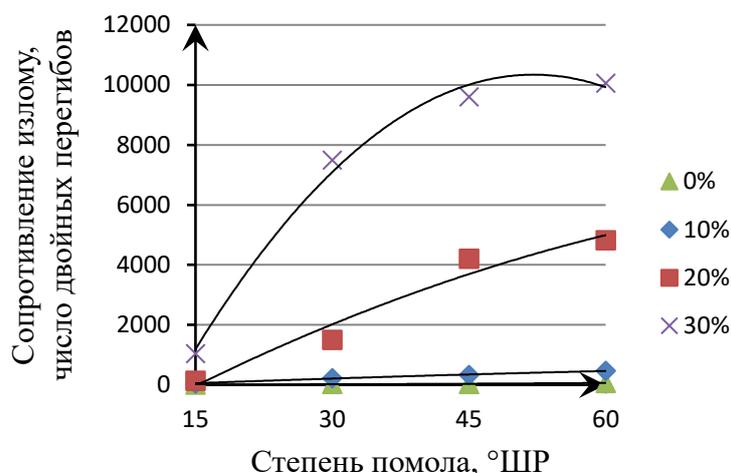


Рисунок 7. Зависимость показателя сопротивления излому от степени помола и % содержания БЦ в композиции целлюлозно-бумажных материалов

По результатам проведенного исследования были выявлены значительные увеличения основных физико-механических показателей готовой продукции, полученной из композиционных материалов. Так максимальный прирост показателя разрывной длины составил 110 % при добавлении в композицию 30 % БНЦ в волокнистую массу при степени помола 15 °ШР. Волокно, размолотое до 45 °ШР в композиции с 30 % БЦ, имеет прирост всего 64 %, но значения отличаются значительно.

Максимальный прирост показателя сопротивления продавливанию составил 220 % при добавлении в композицию 30 % БЦ при степени помола 15 °ШР. Волокно, размолотое до 30 °ШР в композиции с 30 % БЦ, имеет прирост всего 106 %, и размолотое до 45 °ШР при тех же условиях – дает прирост показателя в 80 %.

Что касается показателя сопротивления излому, то значительные изменения были выявлены при размоле волокнистой массы до 60 °ШР в композиции с 30 % БЦ. Показатель увеличился в 320 раз в сравнении с первоначальным (без добавления БЦ).

Таким образом добавление БЦ в композицию к волокнистой массе растительного происхождения говорит о эффективности ее применения в процессах получения готового продукта в ЦБП.

Библиографический список

1. Гисматулина Ю.А., Будаева В.В., Ситникова А.Е. и др. Композиционная бумага из бактериальной наноцеллюлозы и хвойной целлюлозы // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология, 2021. Том 11, № 3. С. 460-471.
2. Рогова Е.А., Алашкевич Ю.Д., Кожухов В.А. и др. Состояние и перспективы совершенствования способов получения и использования бактериальной целлюлозы (обзор) // Химия растительного сырья. – 2022. – № 4. – С. 27-46. – DOI 10.14258/jcprgm.20220411373.
3. Биореактор для получения бактериальной целлюлозы: пат. 2822177 Рос. Федерация. № 2023115782 / Рогова Е.А.; заявл. 15.06.23; опубл. 02.07.24, Бюл. № 19. 3 с.

УДК 615.451.16

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ХЛОРОФИЛЛОВ ИЗ КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ ЛИСТЬЕВ

Н.С. Русаева, Е.И. Молохова

ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России), 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2.

Крапива двудомная обладает значительными запасами сырья в России [6], содержит большое количество различных биологически активных веществ, таких как хлорофиллы, флавоноиды, каротиноиды, витамины и т.д., благодаря которым обладает различными фармакологическими эффектами (стимулирует кроветворение, оказывает бактерицидное, противовирусное и иммуностимулирующее действие, а также в качестве пребиотика в комплексной терапии дисбактериоза), но она редко используется для разработки лекарственных препаратов. Согласно данным Единого реестра свидетельств о государственной регистрации, в России с хлорофиллом зарегистрированы раствор для приёма внутрь, раствор для местного и наружного применения спиртовой и масляный, таблетки для рассасывания, экстракт густой и капсулы, при этом, чаще всего для производства используются эвкалипта и шелковицы листья и люцерны трава [3]. В связи с этим актуальна разработка лекарственного препарата для внутреннего применения с использованием хлорофиллов, выделенных из крапивы двудомной листьев.

Ключевые слова: хлорофилл, крапива двудомная, крапивы двудомной листья, разработка, стандартизация.

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY AND STANDARDIZATION OF A DRUG BASED ON CHLOROPHYLLS FROM URTICA DIOICA LEAVES

N.S. Rusaeva, E.I. Molokhova

Perm State Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation (FSEI HE PGFA of the Ministry of Health of the Russian Federation), 614990, Russia, Perm, Poleyaya str., 2.

Urtica dioica has significant reserves of raw materials in Russia [6], contains a large number of various biologically active substances such as chlorophylls, flavonoids, carotenoids, vitamins, thanks to which it has various pharmacological effects (stimulates hematopoiesis, has bactericidal, antiviral, and immunostimulating effects, as well as as a prebiotic in complex therapy of dysbiosis), but is rarely used for drug development. According to the data from the Unified Register of State Registration, an oral solution, an alcohol and oil solution for local and external use, tablets for resorption, thick extract and capsules are registered in Russia with chlorophyll, while Eucalyptus and Morus leaves and Medicago herb are most often used for production [3]. In this regard, the development of a drug for internal use using chlorophylls isolated from *Urtica dioica* leaves is relevant.

Keywords: chlorophyll, *Urtica dioica*, *Urtica dioica* leaves, development, standardization.

Целью исследования является выделение хлорофиллов из крапивы двудомной листьев и разработка лекарственного средства на их основе (сироп). Для достижения цели исследования необходимо решить следующие задачи:

1. Систематизация данных по характеристике лекарственных средств на основе хлорофиллов из крапивы двудомной. Согласно Единому реестру свидетельств о

государственной регистрации и Государственному реестру лекарственных препаратов с крапивой двудомной в России зарегистрированы только крапива двудомная как лекарственное растительное сырьё и экстракт жидкий на её основе. Зарегистрированные лекарственные препараты с хлорофиллом получены с использованием хлорофиллов, выделенных в основном из эвкалипта, шелковицы и люцерны [2, 3].

2. Выбор методов извлечения хлорофиллов из крапивы двудомной листьев и количественного определения хлорофиллов в полученных экстрактах. В современных исследованиях для выделения хлорофиллов из растительного сырья часто применяется экстракция при повышенных температурах с использованием этилового спирта различных концентраций (70-96%) или ацетона. Для количественного определения чаще используются методы спектрофотометрии и фотоколориметрии. Благодаря разнообразию методов извлечения и количественного определения хлорофиллов, необходимо выбрать оптимальные для крапивы двудомной листьев.

3. Разработка технологии и стандартизация лекарственного средства на основе хлорофиллов, выделенных из крапивы двудомной листьев. В связи с ограниченным количеством зарегистрированных лекарственных препаратов на основе хлорофиллов, выделенных из крапивы двудомной листьев, при значительных её запасах в России, стоит вопрос о разработке таких лекарственных препаратов. Целью нашей работы является разработка сиропа с хлорофиллами, выделенными из крапивы двудомной листьев.

В рамках исследовательской работы проведена оценка технологических параметров крапивы двудомной листьев измельчённых. В качестве объектов использованы крапивы двудомной листья (*Urticae Dioicae Folia*), фирм «ФармаЦвет» (серия: 30222, дата производства: 02/2022) и «Здоровье» (серия: 050823, дата производства: 05/08/2023). Сырьё высушено методом естественной воздушно-теневого сушки. Степень измельчения 3-5 мм. Перед началом анализа технологических параметров исследованы товароведческие показатели сырья, которые показали соответствие анализируемых образцов нормам Государственной фармакопеи XV издания [1]. В ходе анализа определены удельная, насыпная, объёмная массы, пористость, порозность, свободный объём слоя сырья и коэффициенты поглощения экстрагентов (для воды и этилового спирта 70% и 95%). Коэффициент водопоглощения – 6,27 мл/г. Коэффициент спиртопоглощения для этилового спирта 70 % – 4,95 мл/г; для этилового спирта 95%- 4,29 мл/г. На основании полученных результатов обоснован рациональный метод экстрагирования хлорофиллов из сырья крапивы двудомной листьев – мацерация с интенсификацией при нагревании и выбран экстрагент- этиловый спирт в интервале концентраций от 70 до 95% [4].

Нами разработана и валидирована аналитическая методика количественного определения содержания хлорофиллов в крапивы двудомной листьях. Количественное содержание хлорофиллов определяли в сырье крапивы двудомной листьев марки «ФармаЦвет» АО «Красногорсклексредства» (серия: 30222, дата производства: 02/2022, срок годности 3 года). Пробоподготовка заключалась в дробной экстракции в течение часа по 30 мин каждая измельченного сырья с размером частиц 1,0 мм на водяной бане при температуре 100°C 70% этиловым спиртом в соотношении сырье:экстрагент 1:100, объединение извлечений и доведение используемым растворителем до 100 мл, с последующим разведением полученного раствора в соотношении 2:25 95% этиловым спиртом.

Количественное определение включало измерение оптической плотности раствора относительно 95% этилового спирта в максимуме поглощения 663±5 нм, вычисление содержания хлорофилла в процентах, в пересчете на абсолютно сухое сырьё, по формуле:

$$x = \frac{A * 25 * 100 * 100 * 100}{m * 944,5 * 2 * 100 * (100 - W)}$$

где: А – оптическая плотность раствора в соответствующем максимуме поглощения;
 m – масса сырья, г; W – потеря в массе при высушивании, % (W = 5,41%); 944,5 – удельный показатель поглощения хлорофилла при 663нм. [6]

Проведена валидация разработанной методики, которая показала её линейность и специфичность. Проведена метрологическая оценка методики, которая свидетельствует об относительной ошибке единичного определения 10,53% и аналитической области в интервале от 0,5 до 1,5 г. На основании проведённого исследования сделан вывод, что аналитическая методика валидна и пригодна для фотометрического определения хлорофиллов, выделенных из крапивы двудомной листьев.

Анализ существующих лекарственных форм лекарственных препаратов и биологически активных добавок с хлорофиллом показал необходимость создания более стабильной лекарственной формы, которая бы содержала необходимый уровень хлорофилла. В качестве такой лекарственной формой выбран сироп с использованием 80% мальтитолом.

Выводы. Разработка лекарственного препарата (сиропа) на основе хлорофиллов, выделенных из крапивы двудомной листьев, является перспективным направлением исследований в связи с обширными запасами фармакопейного сырья крапивы двудомной на территории России, большому количеству различных биологически активных веществ в данном сырье, в том числе хлорофиллов, и ограниченном количестве лекарственных препаратов на основе крапивы двудомной листьев.

Библиографический список

1. Государственная фармакопея XV издания / Институт фармакопеи и стандартизации в сфере обращения лекарственных средств, 2023. ФС.2.5.0019.15 «Крапивы двудомной листья. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/2/2-5/krapivy-dvudomnoy-listya-urticae-dioicae-folia/>
2. Государственный реестр лекарственных средств. URL: <https://web.archive.org/web/20230306063202/https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx>
3. Единый реестр свидетельств о государственной регистрации. URL: <https://nsi.eaeunion.org/portal/1995?date=2024-07-14>
4. Русаева Н. С., Молохова Е. И. Технологические параметры растительного сырья крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) листьев. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Кромеровские чтения 2024»: Сборник материалов (24 апреля 2024) / отв. ред. В.Г.Лужанин. – Пермь, ПГФА, 2024. – 124-126 с. URL: https://pfa.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=1060&Itemid=960
5. Тринеева Ольга Валерьевна, Сливкин Алексей Иванович, Сафонова Елена Федоровна. Определение гидроксикоричных кислот, каротиноидов и хлорофилла в листьях крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) // Химия растительного сырья. 2015. №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/opredelenie-gidroksikorichnyh-kislot-karotinoidov-i-hlorofilla-v-listyah-krapivy-dvudomnoy-urtica-dioica-l>
6. Турышев, Алексей Юрьевич. Методологические основы мониторинга ресурсов дикорастущих лекарственных растений Среднего Урала с использованием информационных технологий : автореферат дис. ... доктора фармацевтических наук : 3.4.2. / Турышев Алексей Юрьевич; [Место защиты: ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации ; Диссовет 21.2.061.06 (Д 208.085.06)]. - Самара, 2022. - 42 с.

УДК 631.8

БИОТЕХНОЛОГИЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОСТПИРОГЕННЫХ ПОЧВ*Р.Р. Салеев, Л.Ю. Кошкина, А.А. Кузнецова**ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», Казань, Россия*

В работе исследуется влияние гуминовых препаратов на постпирогенные почвы. Гуминовые вещества составляют самую большую часть органического вещества почвы (около 60%) и считаются ключевым компонентом наземной экосистемы, ответственным за многие сложные химические реакции в почве. Изучена возможность восстановления постпирогенной почвы биотехнологическими способами, а именно, с использованием гуминовых препаратов. Выполнен агрохимический анализ постпирогенной почвы, проведен тест на рост и развитие проростков в постпирогенной почве с внесением гуминовых препаратов, выполнен анализ.

Ключевые слова: постпирогенные почвы, гуминовые препараты, агрохимический анализ, биотестирование

POST-PYROGENIC SOIL REMEDIATION BIOTECHNOLOGY*R.R. Saleev, L.Yu. Koshkina, A.A. Kuznetsova**Kazan National Research Technological University*

The work examines the effect of humic drugs on post-pyrogenic soils. Humic substances make up the largest portion of soil organic matter (about 60%) and are considered a key component of the terrestrial ecosystem responsible for many complex chemical reactions in the soil. The possibility of restoring post-pyrogenic soil by biotechnological methods, namely, the use of humic drugs, has been studied. An agrochemical analysis of post-pyrogenic soil was performed, a test for the growth and development of seedlings in post-pyrogenic soil with the introduction of humic preparations was carried out, an analysis was performed.

Keywords: post-pyrogenic soils, humic preparations, agrochemical analysis, biotesting

Для скорейшего восстановления почвы после пожаров существуют различные способы, которые основаны на восстановлении её физико-химических показателей, на насыщении питательными веществами. К традиционным можно отнести следующие: пересыпание опилками, внесение минеральных удобрений, использование навоза, перегноя, укрывание ветками хвойных пород, которые быстро укореняются в постпирогенной почве, добавление сидератов. В Средней полосе России наиболее популярными сидератами, восстановителями питательных свойств почвы являются: горох, ледвенец, люцерна, донник, клевер, горчица, люпин, рапс, овес и т.д. [1,2].

В ряде работ отмечается, что «...обработка постпирогенных почв комплексным удобрением на основе гуминовых кислот выполняет стресс-протекторную роль не только для растений, но и для микробного сообщества корнеобитаемого слоя почвы, что может иметь значение для восстановления почвенного плодородия» [3, 4].

Цель работы изучить возможность восстановления постпирогенной почвы биотехнологическими способами, а именно, внесением гуминовых препаратов. Для этого: выполнить агрохимический анализ постпирогенной почвы, провести тест на рост и развитие проростков в постпирогенной почве с внесением гуминовых препаратов, провести анализ.

Место отбора почвы после пирогенного воздействия (пожара): Республика Татарстан, Нижнекамский район, близ с. Афанасово. Дата проведения анализа: 05.06.2023 г. Тип пробы: почва, относящаяся к дерново-подзолистым почвам, постпирогенная.

В соответствии с действующими нормативными актами в области анализа почвы и методов отбора проб, образцы могут отбираться методом «конверта», либо методом «сетки». Отбор проб произведен в соответствии с: ПНД Ф 12.1:2:2.2:2.3:3.2-03, ГОСТ 17.4.02-2017, ГОСТ 17.4.3.01-2017.

Цель агрохимических исследований — выполнение комплекса анализов, проводимых для определения степени обеспеченности почвы основными элементами минерального питания (в частности, подвижных соединений азота, фосфора и калия), определения механического состава почвы, водородного показателя и степени насыщения органическим веществом, т.е. тех элементов, которые определяют ее плодородие [5].

Таблица 1

Результаты агрохимического анализа почвы

№ п/п	Определяемые показатели, единицы измерения	Результаты анализа, $C \pm \Delta$, $P=0,95$, $n=2$	Уровень содержания
1	pH солевой вытяжки, ед. pH	6,7	нейтральная
2	Азот нитратный, мг/кг	17,8	средний
3	Азот аммонийный, мг/кг	9,2	очень низкий
4	Общий фосфор, мг/кг	20,6	очень низкий
5	Калий, мг/кг	34,7	низкий
6	Кальций, мг/кг	27,4	средний
7	Магний, мг/кг	7,9	низкий
8	Органическое вещество, %	1,5	очень низкий

Пояснения к табл. 1.

При pH до 4,5 кислотность сильная, pH 4,6-5 — средняя, pH 5,1-5,5 — слабая, pH 5,6-6,0 — реакция, близкая к нейтральной, >6,0 — нейтральная.

Концентрации азота нитратного и азота аммонийного в почвах исчисляются сравнимыми величинами одного порядка.

Содержание азота нитратного в почвенных образцах показало невысокое значение равное 17,8 мг/кг, что не превышает предельно допустимой концентрации (ПДК) величины нитратного азота в почве 130 мг/кг (ГН 2.1.7.2041-06), рекомендуемое содержание азота аммонийного 30–45 мг/кг.

Регламентирующих документов по оценке загрязнения почв калия и фосфора не существует. Общий фосфор в почве рекомендуемый $\leq 27,2$ мг/кг.

Магний считается полифункциональным элементом питания растений, является структурообразующим агентом, играет важную функциональную роль для ферментов. Норма в пределах от 12 до 48 мг/л. Избыток магния может повлиять на растения при преобладании содержания магния над содержанием кальция, т. е. когда соотношение [магний : кальций] > 1.

Кальций поступает в растения в течение всего периода вегетации. При наличии в растворе нитратного азота проникновение его в растения усиливается, а в присутствии аммиачного азота — снижается. Содержание кальция определяется типом почвы. Содержание кальция в почве (в % сухого вещества): на подзолистых почвах - 0,73; на серых лесных - 0,90; на черноземах - 1,44; на сероземах - 6,04. Чем выше уровень pH, тем больше в почве доступного для растений кальция.

Характеризуя элементарный состав органического вещества почв, обычно определяют общее содержание углерода. В зависимости от количества углерода органического вещества рассчитывается содержание гумуса, поскольку в почвах нет надежных методов

непосредственного определения гумуса. Полученные данные указывают на низкое содержание органического вещества в пробе постпирогенной почвы.

В табл. 2 приведены оценки почв по различным показателям.

Таблица 2

Оценка потенциального плодородия почв по содержанию гумуса и доступных для растений фосфора, калия и азота

Уровень содержания	Подвижный фосфор P ₂ O ₅ , млн ⁻¹	Обменный калий K ₂ O, млн ⁻¹	Нитратный азот N - NO ₃ , млн ⁻¹	Аммонийный азот N-NH ³⁺ , N-NH ₄ , млн ⁻¹	Содержание гумуса (С орг*1,724), % от массы почвы
Очень высокий	Более 250	Более 250	–	–	Более 10
Высокий	250–150	250–170	> 20	> 40	6–10
Повышенный	150–100	170–120	–	–	–
Средний	100–50	120–80	15–20	20–40	4–6
Низкий	50–25	80–40	10–15	10–20	2–4
Очень низкий	< 25	< 7	< 10	< 10	< 2

Как видно из полученных результатов (табл. 1, 2) многие показатели агрохимического анализа имеют низкие значения.

Дальнейшим этапом работы является проведение теста по ГОСТ 33061-2014 с целью оценки влияния гуминовых препаратов на постпирогенную почву.

Для эксперимента были выбраны два удобрения с гуминовыми препаратами в составе.

Гумин 1 (Гуми-Оми) – органоминеральное удобрение на основе ферментированного куриного помета, сбалансированное по органическим, минеральным, гумусным веществам и микроэлементам. Класс опасности – IV (малоопасное вещество).

Состав (%): азот – 3,0, фосфор – 7,0, калий – 6,0; микроэлементы: бор – 100-300 мг/кг, медь – 100-300 мг/кг; эликсир плодородия Гуми – 0,6, ферментированная органика – 20.

Гумин 2 (Гумат+7 Йод) – удобрение на основе гуминовых кислот с микроэлементами для предпосевной обработки и подкормки растений. Улучшает структуру и повышает плодородие почвы. Класс опасности – IV.

Состав (%): гуминовые кислоты – 37; азот – 1,5; калий – 5; бор – 0,2; железо – 0,4; кобальт – 0,02; марганец – 0,17; медь – 0,2; молибден – 0,018; цинк – 0,2; йод – 0,005.

Оценить степень влияния гуминовых препаратов на растения-биоиндикаторы в почве контрольной и постпирогенной. Для этого:

1. выбрать растение-биоиндикатор на основе анализа источников информации [6-8];
2. провести биотестирование [9];
3. оценить эффект использования гуминовых препаратов на выбранные растения-биоиндикаторы.

В эксперименте использовался ячмень яровой Вереск (*Hordeum vulgare L.*), один из видов ячменя, который отличается своей способностью расти на бедных почвах и в условиях низких температур.

Результаты изучения влияния гуминовых препаратов на рост растений-биоиндикаторов представлены на рис.1, рис. 2, рис. 3, рис. 4.

Наибольший прирост биомассы тестового растения отмечен под воздействием Гуми-Оми, если сравнивать одновременно результаты контрольной почвы и пирогена (рис. 1, рис. 2).

Как видно из рис. 3 наилучший результат контрольного образца в контрольной почве по длине ростка у ячменя под воздействием Гуми-Оми, а корневого ростка – под воздействием Гумат+7 йод.

В случае постпирогенной почвы, лучший результат показали ростки под воздействием Гуми-Оми, что наблюдается на рис. 4. Однако корневая система в случаях с использованием гуминовых препаратов развита хуже по сравнению с контрольной группой.

Проведенный согласно ГОСТ 33061-2014 тест выявил следующее: в контрольной почве наибольший прирост биомассы ячменя был замечен при использовании препарата Гуми-Оми по сравнению с препаратом Гумат+7 Йод. В то же время у ячменя в постпирогенной почве использование гуминовых препаратов также показало положительные результаты.

Чтобы понять и использовать здоровье почвы в качестве инструмента для обеспечения устойчивости, необходимо использовать физические, химические и биологические свойства, чтобы проверить, какие из них реагируют на использование и управление почвой в желаемых временных рамках. Малые дозы применения, невысокая цена, совмещение обработок определяют высокую экономическую эффективность гуминовых препаратов препарата [5].

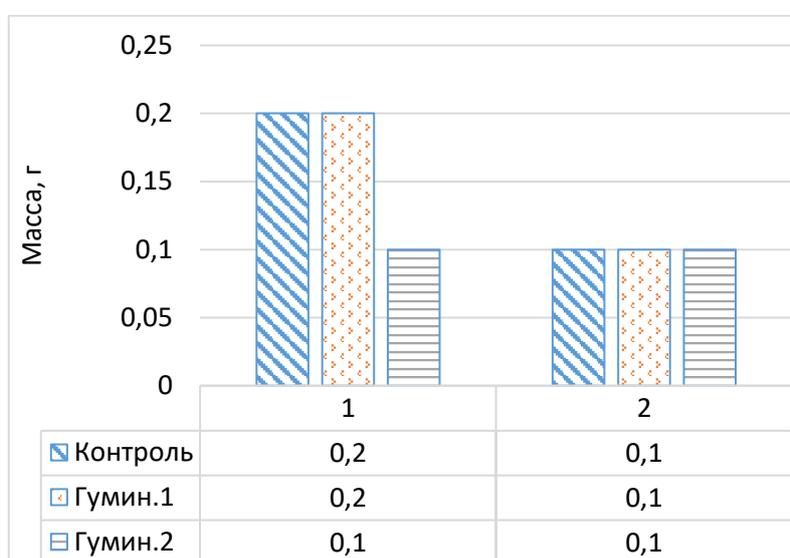


Рисунок 1. Биомасса растений в контрольной почве после обработки гуминовыми препаратами

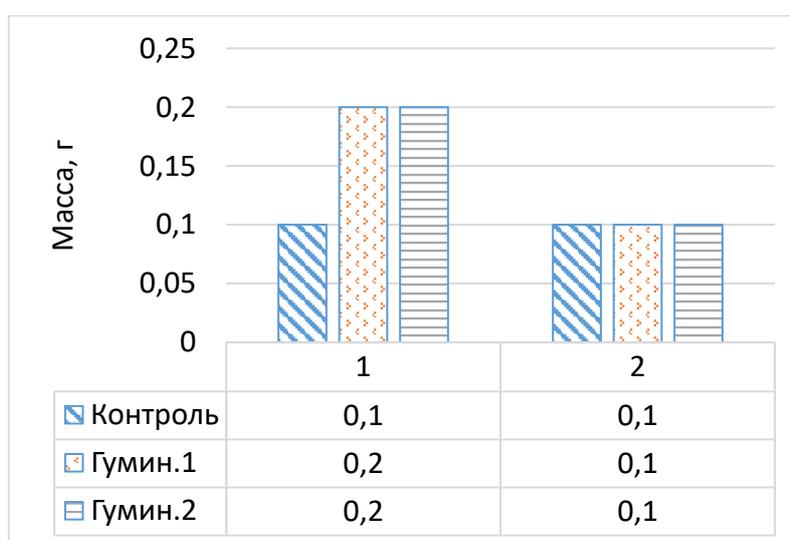


Рисунок 2. Биомасса растений в постпирогенной почве после обработки гуминовыми препаратами

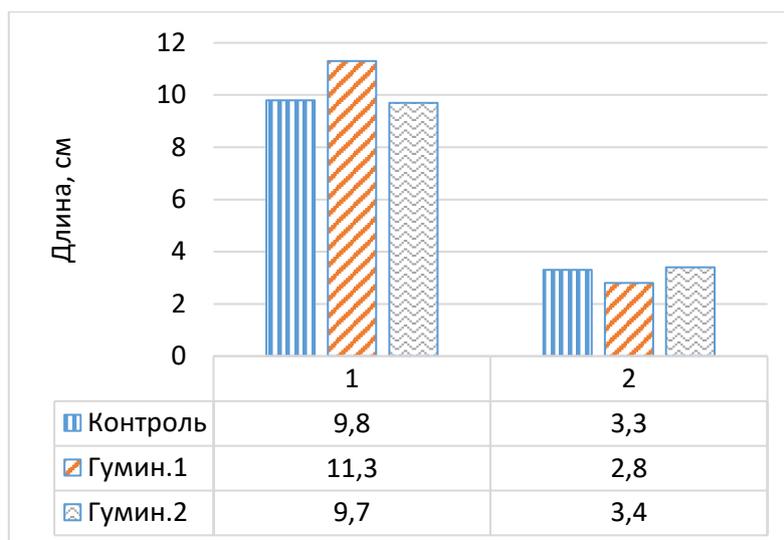


Рисунок 3. Длина стебля и корня проростков тестовых растений в контрольной почве после обработки препаратами

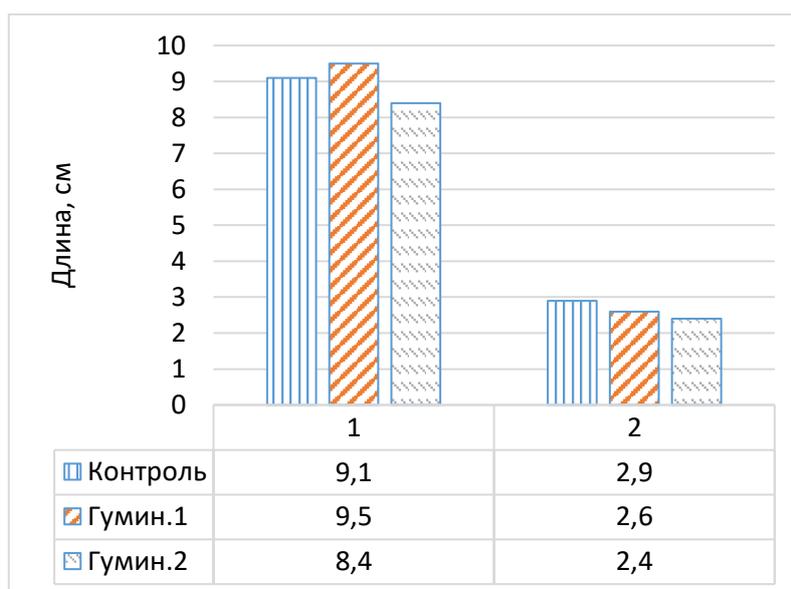


Рисунок 4. Длина стебля и корня проростков тестовых растений в постпирогенной почве после обработки препаратами

Библиографический список

1. Агапов, А.И. Влияние пирогенного фактора на растения: история и современное состояние проблемы // Горизонты цивилизации. – 2019. – № 10. – С.24-31.
2. Пирогенное воздействие на почвенный покров/ Кадиханов А. И., Кузнецова А. А., Кошкина Л. Ю. // XVIII Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Пищевые технологии и биотехнологии»: материалы конференции – Казань : Изд-во КНИТУ, 2023. – С. 735-739.
3. Максимова Е.Ю., Абакумов Е.В. Оценка применения гуминовых препаратов в качестве мелиорантов для рекультивации деградированных постпирогенных почв // Агрехимический вестник, № 1 – 2018. – С. 46-51.

4. Горвая А.И., Редько Е.С., Скворцова Т.В. Обоснование применения торфяных препаратов для целей экологизации сельскохозяйственного производства // Торфяная промышленность. 1992. № 2. С. 29–30.
5. Теория и практика химического анализа почв / под ред. Л.Н. Воробьева. – М.: ГЕОС, 2006. – 400 с.
6. Биологический контроль окружающей среды: Биоиндикация и биотестирование: учеб. пособие для вузов / под ред. О. П. Мелеховой, Е. И. Сарапульцевой. // 3-е изд., стер. – М.: Академия, 2010. – 288 с.
7. Опекунова М. Г. Биоиндикация загрязнений: учебное пособие. // СПб, Издательство С.-Петербургского университета, 2017. – 300 с.
8. Методы биоиндикации: учебно-методическое пособие / М.Н. Мукминов, Э.А. Шуралев. // Казань: Казанский университет, 2011. – 48 с.
9. Биотестирование в рациональном и ресурсосберегающем выборе противогололедных реагентов / Козлова Е.А., Кошкина Л.Ю. // В сборнике: Региональная экология: актуальные вопросы теории и практики. – Чебоксары, 2022. – С. 55-58.

УДК 631.879.4 : 579.64

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ КУРИНОГО ПОМЁТА СМЕШАННЫМИ КУЛЬТУРАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ

К. Г. Семёнова^{1,2}, Ю. Г. Максимова^{1,3}

¹*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия*

²*Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия*

³*Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия*

Объектами исследования являлись консорциумы микроорганизмов, осуществляющие биотрансформацию органического вещества куриного помёта. В ходе работы получили смешанные бактериальные культуры из отдельных селекционированных штаммов с определенной ферментативной активностью, изучили влияние комплексов микроорганизмов на изменение элементного состава куриного помёта (ионов аммония, фосфат-ионов). Установили, что обязательным является включение в состав консорциума лактобактерий, микроорганизмов с протеолитической, фосфатмобилизующей и фитатгидролизующей активностью. Данные штаммы способствуют качественному улучшению состава получаемого биоудобрения для растений.

Ключевые слова: переработка отходов птицеводства, смешанные культуры микроорганизмов, компостирование, биопрепараты, органические удобрения.

Введение.

Куриный помёт относится к побочным продуктам животноводства. Содержание органического вещества в нём составляет от 30 до 80%. Отмечается также высокое содержание азота, фосфора, калия, кальция, магния, железа, цинка и других макро- и микроэлементов, что делает куриный помёт ценным органическим удобрением для роста и развития сельскохозяйственных растений. Однако согласно федеральному классификационному каталогу отходов свежий куриный помет относится к 3 классу опасности и не может использоваться без дополнительной обработки [6].

Самым распространенным методом утилизации куриного помёта является складирование [5]. Данный способ требует больших временных затрат, поскольку собственные микробные процессы, происходящие в помёте, неэффективны, что приводит к необходимости выдерживания отхода в помехранилищах в течение 2-3 лет. При этом теряется около 40% азота, что является не желательным процессом [7]. Ввиду большого количества образующихся отходов, метод складирования может повлечь серьезные экологические проблемы – загрязнение почв, водоемов и подземных вод, увеличение зараженности паразитами, патогенными микроорганизмами и насекомыми [4]. Компостирование относится к биологическим способам переработки отходов, является наиболее простым и доступным методом и позволяет в конечном итоге получить ценный продукт в виде органического удобрения [8].

Биотрансформация куриного помёта происходит при участии смешанных популяций микроорганизмов. Применение биопрепаратов на их основе способствует ускорению переработки органических отходов и сокращению продолжительности их складирования до 3-8 недель [6]. В состав известного коммерческого бактериального препарата «Байкал ЭМ-1» входят молочнокислые, фотосинтезирующие, азотфиксирующие бактерии, дрожжевые грибки [9]. Существенным недостатком данного препарата, а также других микробиологических способов переработки является низкая устойчивость микроорганизмов к щелочной среде свежего

куриного помёта. Следовательно, создание новых биопрепаратов на основе эффективных микроорганизмов, является актуальной проблемой современности.

Цель работы заключается в изучении процесса биотрансформации органического вещества куриного помёта под действием различных консорциумов микроорганизмов. В конечном счете, это будет способствовать созданию биопрепарата с наиболее эффективным сочетанием микробных культур.

Новизна работы заключается в использовании экстремофильных микроорганизмов, отличающихся достаточно высокой выживаемостью в чужеродных биотопах: во-первых, при внесении биопрепарата в побочные продукты птицеводства; во-вторых, при внесении их в составе удобрения в почвы для улучшения роста растений.

Материалы и методы.

Для изучения процесса биотрансформации куриного помёта проводили ряд экспериментов с различным сочетанием штаммов микроорганизмов (Л – лактобактерии, 14 КМЦ – целлюлозолитический, ФМ 3.4.2 – фосфатмобилизующий, ФГ 3.9.1 – фитатгидролизующий, 14П – пептонгидролизующий изоляты). Каждый образец помёта перед инокуляцией микробными культурами разводили водой. После внесения бактериальной суспензии подсчитывали число колониеобразующих единиц путём посева десятикратных разведений куриного помёта на питательные среды: ГРМ, Пфеннига с карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ) как источником углерода, Сабуро, NBRIP.

Питательная среда NBRIP является селективной для фосфатмобилизующих микроорганизмов и имеет следующий состав (г/л): глюкоза – 10,0; магния хлорид шестиводный – 5,0; магния сульфат семиводный – 0,25; калия хлорид – 2,0; аммония сульфат – 0,1. Трикальций фосфат получают внесением 5,3 г/л шестиводного хлорида кальция, после его растворения добавляют 5,7 г/л двенадцативодного фосфата натрия [11].

Среда Пфеннига для целлюлозолитических микроорганизмов имеет следующий состав (г/л): хлорид аммония — 0,3, дигидрофосфат калия — 0,3, хлорид магния — 0,3, хлорид кальция — 0,03, дрожжевой экстракт — 0,5, раствор микроэлементов по Липперту–Витману — 1 мл. В качестве субстрата вносили до концентрации 1% карбоксиметилцеллюлозу [10].

Выполняли посев в нулевой точке (помёт без инокуляции микроорганизмами), через 7, 14, 28 суток после инокуляции. В каждой точке проводили отбор проб на определение элементов (фосфат-ионы, ионы аммония).

Определение аммиачного азота в курином помёте осуществляли колориметрическим методом. К навеске помёта приливали 0,05 н раствор соляной кислоты, перемешивали на качалке в течение 30 мин, вытяжку отфильтровывали, добавляли 25%-й раствор сегнетовой соли и реактив Несслера. Оптическую плотность растворов определяли через 15 мин на ФЭКе при 440 нм и оценивали концентрацию ионов аммония по калибровочному графику. Концентрацию аммиачного азота выражали в мг NH_4^+ на 1 г помёта [3].

Содержание подвижного фосфора проводили также с помощью колориметрического метода. К навеске помёта добавляли 1%-й раствор углекислого аммония, взбалтывали на качалке в течение 1 часа. После этого вытяжку фильтровали через бумажный фильтр, приливали молибденовый реактив и 1%-й раствор аскорбиновой кислоты в 0,1М соляной кислоте. Оптическую плотность калибровочных и опытных проб измеряли на ФЭКе при длине волны 670 нм. Концентрацию фосфат-ионов выражали в мкг PO_4^{3-} на 1 г помёта [1,2].

Результаты и их обсуждение.

Для опыта №1 по подбору оптимального бактериального сообщества увлажненный куриный помёт инокулировали смесью микроорганизмов: 1 образец: Л+14 КМЦ+ФМ 3.4.2; 2 образец: Л+14П+3К; 3 образец: 14 КМЦ+ФМ 3.4.2. Количественный учёт микроорганизмов проводили путём посева на агаризованные среды (КОЕ/1 г куриного помёта). Динамика КОЕ на среде ГРМ в течение 28 суток представлена на рис. 1. На 28 сутки отмечено снижение количества микроорганизмов во всех образцах при посеве на среды ГРМ, Сабуро и Пфеннига. Это связано

с их частичной гибелью в условиях истощения источников питания и накопления продуктов жизнедеятельности. При высеве нулевой точки на среду NBRIP, селективную для фосфатмобилизаторов, данных микроорганизмов не обнаружено. Селективная среда Пфеннига с КМЦ позволила выявить наличие в исходном образце помёта целлюлозолитических микроорганизмов.

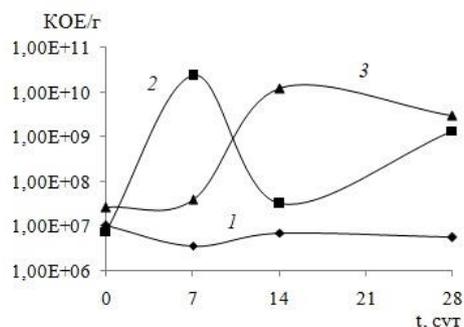


Рисунок 1. Динамика КОЕ в ходе биотрансформации куриного помёта (опыт №1). 1 – образец №1, 2 – образец №2, 3 – образец №3 (на рис.1–6)

Изменение концентрации аммиачного азота представлено на рис. 2. Концентрация ионов аммония во всех образцах практически не менялась по сравнению с нулевой точкой. Это связано с тем, что естественные процессы разложения азотистых оснований органического вещества помёта достигли завершающей стадии.

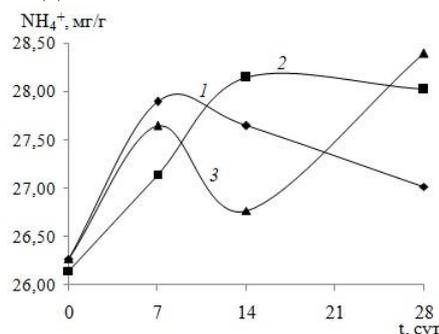


Рисунок 2. Динамика аммиачного азота в ходе биотрансформации куриного помёта (опыт №1)

Результаты определения концентрации подвижного фосфора в динамике отображены на рис. 3. Наблюдали повышение концентрации фосфатов в образце №1, в состав которого входили фосфатмобилизующие микроорганизмы. Изолят также добавляли к образцу №3, однако подобной динамики увеличения концентрации фосфатов не отмечено. Это связано с отсутствием роста данных микроорганизмов. Образец №2 отличался самыми низкими показателями содержания фосфат-ионов, поскольку фосфатмобилизаторы не были включены в состав консорциума.

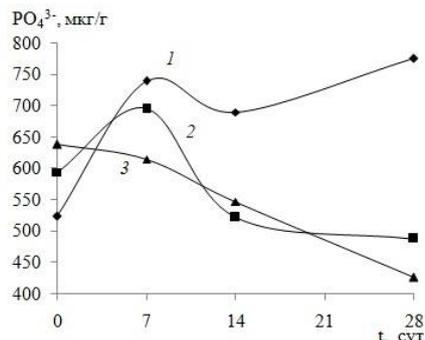


Рисунок 3. Динамика фосфат-ионов в ходе биотрансформации куриного помёта (опыт №1)

Для опыта №2 по подбору оптимального бактериального сообщества увлажненный куриный помёт инокулировали смесью микроорганизмов: 1 образец: Л+14П+ФМ 3.4.2+ФГ 3.9.1; 2 образец: Л+ФМ 3.4.2+ФГ 3.9.1; 3 образец: контроль (помёт без внесения культур микроорганизмов). Данный эксперимент проводили для установления необходимости включения в состав консорциума штамма 14П, а также фитатгидролизующего изолята 3.9.1, способствующего дополнительному высвобождению фосфора из труднодоступных соединений данного элемента.

Динамика изменения КОЕ на среде ГРМ в течение 28 суток представлена на рис. 4. Рост фосфатмобилизующих и фитатгидролизующих микроорганизмов не наблюдался при высеве образца №3 на среду NBRIP. Это связано с тем, что в данном случае помёт не инокулировали смесью микроорганизмов, и образец использовали в качестве контроля. В образце №2 также отсутствовал рост данных микроорганизмов, чего нельзя сказать об образце №1, в который вносили, в том числе и штамм 14П. Полученные результаты позволяют предположить, что данный штамм микроорганизмов способствует выживаемости изолятов ФМ 3.4.2 и ФГ 3.9.1.

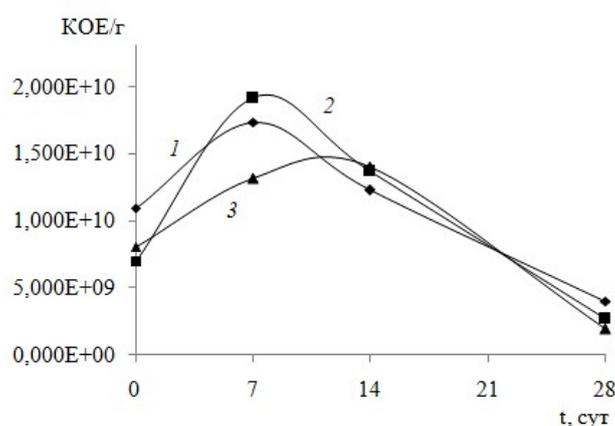


Рисунок 4. Динамика КОЕ в процессе биотрансформации куриного помёта (опыт №2)

Изменение концентрации ионов аммония в течение 28 суток отображено на рис. 5. Наименьшее отклонение от контроля наблюдается в образце №2. В образце №1 прослеживается увеличение концентрации аммиачного азота относительно нулевой точки. Это можно объяснить внесением штамма 14П, обладающего протеолитической активностью и способствующего образованию аммиака.

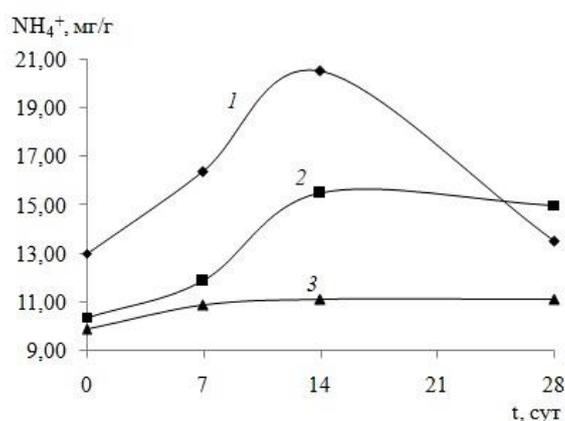


Рисунок 5. Динамика аммиачного азота в ходе биотрансформации куриного помёта (опыт №2)

Динамика концентрации фосфатов в образцах представлена на рис. 6.

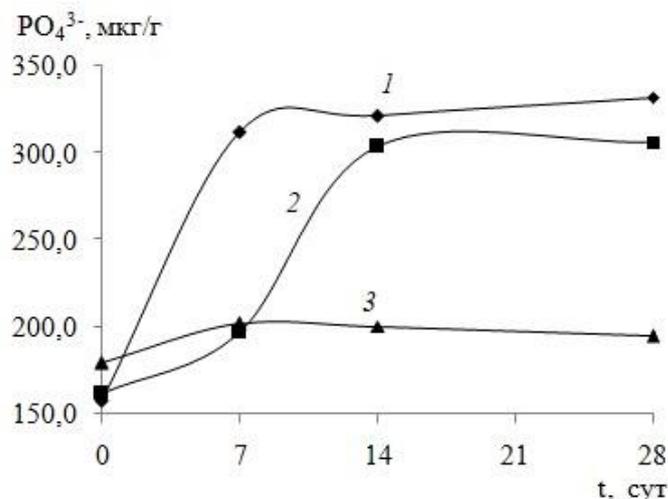


Рисунок 6. Динамика фосфат-ионов в ходе биотрансформации куриного помёта (опыт №2)

В контрольном образце наблюдаются лишь незначительные колебания концентрации свободного неорганического фосфора. Образец №1 характеризуется положительной динамикой концентрации фосфат-ионов, поскольку микроорганизмы, ответственные за увеличение подвижности фосфора, отличаются более высокой выживаемостью в отличие от образца №2.

Заключение. В результате проведения экспериментов по подбору оптимальных бактериальных штаммов пришли к следующим выводам. Так как исходный образец куриного помёта содержал в составе целлюлозолитические микроорганизмы, включение штамма 14КМЦ в состав консорциума не является обязательным.

По наличию роста на селективной для фосфатмобилизирующих микроорганизмов среде судили об их выживаемости в щелочной среде куриного помёта. Рост фосфатмобилизаторов подавлялся в опыте №1 (образец №3) предположительно под воздействием грибов, чего нельзя сказать об образце №1, в который добавляли лактобактерии. Это позволяет предположить наличие у данных микроорганизмов противогрибковой активности, и значит, они имеют перспективу включения в состав биопрепарата. Ввиду отсутствия фосфатмобилизирующих бактерий в исходном образце помёта, а также положительной динамики концентрации подвижного фосфора, образующегося в ходе их жизнедеятельности, добавление изолята ФМ 3.4.2 в консорциум является обязательным.

В опыте №2 (образец №1) отмечается повышение концентрации аммиачного азота, что говорит о более интенсивном процессе разложения белков благодаря пептонгидролизующему штамму 14П. Также можно предположить, что данный штамм способствует выживаемости фосфатмобилизаторов в помёте, следовательно, его необходимо включить в состав консорциума.

Концентрация фосфат-ионов в опыте №1 (образец №1) через 28 суток биотрансформации куриного помёта увеличилась на 47,9% по сравнению с нулевой точкой. Внесение же в образец №1 (опыт №2) фитатгидролизующих микроорганизмов привело к повышению концентрации свободного фосфора на 111,5%. Таким образом, добавление изолята ФГ 3.9.1 является перспективным для увеличения растворимости труднодоступных соединений фосфора.

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке гранта № 19112ГУ/2023 в рамках программы фонда содействия инновациям УМНИК.

Библиографический список

1. ГОСТ 18309-2014. Вода. Методы определения фосфорсодержащих веществ: дата введения 2016-01-01. М.: Стандартинформ, 2019. 23 с.
2. ГОСТ 26205-91. Почвы. Определение подвижных соединений фосфора и калия по методу Мачигина в модификации ЦИНАО: дата введения 1993-07-01. М.: Комитет стандартизации и метрологии СССР, 1992. 10 с.
3. Леймоева А. Ю. Практикум по агрохимии: Методические указания для лабораторных занятий по агрохимии для студентов по направлению подготовки Агрономия: Министерство науки и высшего образования РФ ФГБОУ ВО «Ингушский Государственный Университет». 2020. 53 с.
4. Маринченко Т. Е. Перспективные разработки в области переработки помета // Эффективное животноводство: электронный журнал. 2021. С. 80-83.
5. Пискаева А. И. Анализ способов переработки сельскохозяйственных органических отходов на примере куриного помета // Аэкономика: экономика и сельское хозяйство: электронный журнал. 2016. С. 1-8.
6. Попов В. Н., Корнеева О. С., Искусных А. Ю. Инновационные способы переработки биоотходов птицеводства // Вестник ВГУИТ. 2020. Т. 2, № 1. С. 194-200.
7. Романов А.С., Васильев Э.В. Анализ интенсивных технологий переработки побочных продуктов животноводства с внедрением альтернативных источников энергии // Техника и технологии в животноводстве. 2022. № 48. С. 90-97.
8. Семенов М.В., Железова А.Д., Ксенофонтова Н.А. Куриный помет как органическое удобрение: технологии компостирования и влияние на почвенные свойства // Бюллетень Почвенного института имени В.В. Докучаева. 2023. № 115. С. 160-198.
9. Суховеркова, В. Е. Способы утилизации птичьего помета, представленные в современных патентах // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2016. № 9. С. 45-55.
10. Шилова А. В., Максимов А. Ю., Максимова Ю. Г. Изменения микробиома как индикатор восстановления природных сред содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод» // Вода и экология: проблемы и решения. 2020. №1 (81).
11. Nadeem M, Wu J, Ghaffari H, Kedir AJ, Saleem S, Mollier A, Singh J, Cheema M. Understanding the Adaptive Mechanisms of Plants to Enhance Phosphorus Use Efficiency on Podzolic Soils in Boreal Agroecosystems. 2022, Pages 1-23.

УДК 579.66

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФИТОБИОТИКОВ НА ПРИМЕРЕ ЗЕЛЕННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Н.А. Сидорова, А.И. Савушкин

Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия

Исследованы биологические свойства перспективного фитобиотика на примере штамма зеленых микроводорослей *Chlorella vulgaris* GKO в составе коммерческого биопрепарата производства ООО «Альготек». Описаны морфологические особенности штамма, ультраструктура, концентрация хлорофилла (Chl a), биомасса, кинетика роста. Полученные данные необходимы для оптимизации технологий культивирования зеленых микроводорослей, как потенциальных биотехнологических объектов со свойствами фитобиотиков.

Ключевые слова: зеленые микроводоросли, морфология, кинетика роста, концентрация хлорофилла, биомасса, фитобиотики, *Chlorella vulgaris*.

BIOLOGICAL PROPERTIES OF PHYTOBIOTICS ON THE EXAMPLE OF GREEN MICROALGAE

N.A. Sidorova, A.I. Savushkin

Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia

The biological properties of a promising phytobiotic have been studied using the example of a strain of green microalgae *Chlorella vulgaris* GKO as part of a commercial biological product manufactured by Algotek LLC. The morphological features of the strain, ultrastructure, chlorophyll (Chl a) concentration, biomass, and growth kinetics are described. The data obtained are necessary to optimize the cultivation technologies of green microalgae as potential biotechnological objects with the properties of phytobiotics.

Keywords: green microalgae, morphology, growth kinetics, chlorophyll concentration, biomass, phytobiotics, *Chlorella vulgaris*.

В настоящее время, к фитобиотикам или фитогеникам относят широкий спектр природных (растительных) биоактивных соединений, которые используются в качестве пищевых добавок с целью повышения резистентности организма к неблагоприятным факторам среды и улучшения качества жизни [8, с. 7489]. Биотехнологический потенциал фитобиотиков во многом связан с многообразием их противовоспалительных, антибактериальных и иммуномодулирующих свойств. Их эффективность в виде добавок к пище для человека и кормовых премиксов для животных доказана на основании улучшения показателей иммунитета, физиологических параметров, пищевого статуса, данных биохимического анализа [9, с. 12].

В практике высокопродуктивного животноводства и рыбоводства по достоинству оценены антиоксидантные свойства фитобиотиков, которые в условиях интенсивного производства вызывают снижение стрессового воздействия окружающей среды на иммунную систему и продуктивность, а также положительно влияют на качество мяса и производство высококачественной и безопасной продукции животного происхождения [4, с. 6]. Благодаря изучению причин положительного эффекта фитобиотиков обнаружено, что в их присутствии наблюдается гомеостаз нормофлоры желудочно-кишечного тракта [3, с. 446; 12, с. 639; 13, с. 142], увеличивается секреция пищеварительных ферментов, повышается перистальтика желудка и

кишечника [7, с. 120]. Использование фитобиотиков в рационе рыб улучшает показатели врожденного иммунитета за счет стимуляции выработки естественных киллеров, активации лизоцима и системы комплемента [6, с. 409].

Примером фитобиотиков могут служить представители зеленых микроводорослей. Это группа эукариотических водных микроорганизмов, способных поддерживать постоянство внутриклеточной среды, быстро адаптироваться к неблагоприятным факторам, образовывать целый пул вторичных метаболитов [10, с. 68]. Обнаружено, что такие метаболиты зеленых микроводорослей, как жирные кислоты, гликолипиды, фенолы, терпены, β -дикетон и индольные алкалоиды способны проявлять антибактериальную активность [11, с. 310]. Однако наибольшей антибактериальной активностью обладают длинноцепочечные ненасыщенные жирные кислоты [5, с. 10]. Виды родов *Chlorella* и *Scenedesmus* используются для получения сбалансированного кормового белка и как источники незаменимых аминокислот, омега-3 (ω -3) полиненасыщенных жирных кислот и каротина.

Несмотря на доказанный потенциал зеленых микроводорослей как фитобиотиков, многообразие их биологических свойств остаётся ещё не до конца изученным. Актуальность подобных исследований также во многом связана с разработкой биотехнологических подходов к увеличению эффективности функционирования зеленых микроводорослей *in situ* и оптимизации культивирования *in vitro*.

Целью выполненного исследования стало изучение биологических свойств фитобиотиков на примере зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris*. К биологическим свойствам отнесены морфологические и ультраструктурные характеристика штамма, содержание в клетках хлорофилла «а», биомасса, кинетика роста.

Chlorella vulgaris Beijer относится к царству *Plantae*, отделу *Chlorophyta*, классу *Trebouxiophyceae*, порядку *Chlorellales*, семейству *Chlorellaceae*, роду *Chlorella*. Микроорганизм имеет средний размер клеток 0.05 мм и одноклеточный коккоидный тип таллома (рис. 1).

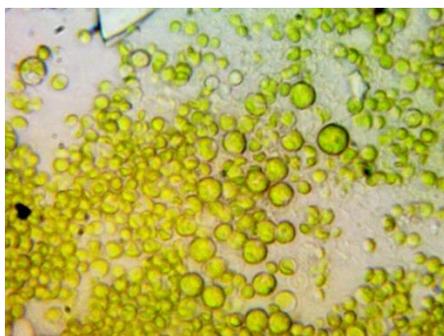


Рисунок 1. Одноклеточный коккоидный тип таллома *Ch. vulgaris* ГКО
(прижизненный препарат, $\times 1000$)

Клетка покрыта толстой клеточной стенкой, содержит одно ядро, хроматофор – чашевидный. Клеточная стенка состоит из наружного и внутреннего слоёв и снабжена порами, через которые происходит взаимодействие клетки с внешней средой и контроль секреции экзополисахаридного матрикса. Наружный слой представляет собой полимерный каротиноид, способный к адгезии и удалению токсичных для клетки соединений. Основным компонентом внутреннего слоя клеточной стенки хлореллы является целлюлоза. Хлоропласты окружены оболочкой из двух мембран фосфолипидного происхождения; хлоропластная эндоплазматическая сеть - отсутствует. Ламеллы состоят из 2-6 тилакоидов в виде гран, возникающих при скоплении тилакоидов; периферические тилакоиды отсутствуют, генофоры рассеянные [1, с. 115].

Особенности морфологии микроводорослей оценивали микроскопически на прижизненных препаратах «раздавленная капля» и окрашенных по Нейссеру с использованием уксуснокислой синьки и хризоидина. Предварительно, для проверки чистоты культуры выполняли посев концентрата хлореллы на элективные среды Тамия и Сабуро и на основные среды - мясопептонный агар и мясопептонный бульон.

Для определения содержания хлорофилла «а» из биомассы микроводорослей готовили концентрат клеток в количестве 10^6 в 1 мл питательной среды с использованием центрифуги «ELMI CM-70M-09». В колбу на 250 мл добавляли 100 мл среды Тамия и 1 мл концентрированной суспензии. Из полученного объема 101 мл готовили фильтрат клеток с последующим экстрагированием фильтрата с использованием 90% ацетона. Экстракт анализировали фотоэлектроколориметрически в области красного спектра поглощения (665 нм). По полученным значениям Chl a рассчитывали биомассу микроводорослей. Для этого учитывали, что концентрация Chl a соответствует примерно 2.5 % от сухой биомассы, или 6.75 % от содержания органического углерода. В этих условиях при переходе от концентрации Chl a к биомассе, выраженной в единицах углерода (мкг С/л), допустимо использовать пересчетный коэффициент 15 [2, с. 56] согласно формуле 1.

$$V_m = 15 \text{ Chl a} \quad (1)$$

V_m - биомасса микроводорослей (microalgae biomass), мг/л; 15 - пересчетный коэффициент;

Кинетику роста исследуемого штамма хлореллы оценивали в процессе периодического культивирования с использованием биореактора RTS-1C с технологией Reverse-Spin, снабженного программным обеспечением и функцией контроля роста клеток в режиме реального времени. Для культивирования микроводорослей использовали стерильные сосуды TPP TubeSpin 50 объемом 50 мл с мембранным фильтром. Объем питательной среды Тамия соответствовал 29 мл, а объем вносимой культуры микроводорослей – 1 мл. Все измерения выполняли при диапазоне OD от 0 до 8 единиц оптической плотности культурального раствора при точности измерений ± 0.3 OD, λ – 850 нм, температуре инкубации – 37.0 °C (стабильность температурного режима ± 0.1 °C).

Результаты

Благодаря выполненным микроскопическим исследованиям обнаружено, что штамм *Ch. vulgaris* ГКО имеет округлые, слабоэллипсоидные клетки от 1.2 ± 0.6 мкм в длину и 1.3 ± 0.2 мкм в ширину. В препаратах по Нейссеру выявлено присутствие зерен волютина (рис. 2) или метополифосфатов, обеспечивающих запас питательных веществ, расходуемых при попадании микроорганизма в неблагоприятные условия обитания.

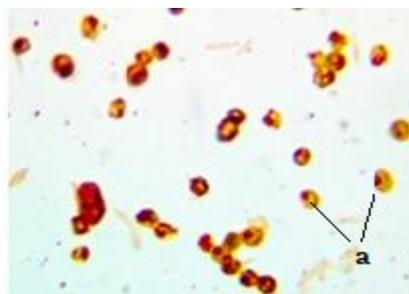


Рисунок 2. Зерна волютина (a) в клетках *Ch. vulgaris* ГКО (препарат по Нейссеру, $\times 1000$)

Содержание хлорофилла-а в клетках штамма *Ch. vulgaris* составило 0.28 ± 0.5 мкг/мл при биомассе 2.4 ± 0.1 мг/л. Благодаря измерениям оптической плотности культурального раствора и кинетики роста штамма *Chlorella vulgaris* ГКО при инкубировании в биореакторе RTS-1C

установлено, что в условиях статического культивирования исследуемый штамм хлореллы способен развиваться согласно закономерностям, отражающим изменения в биомассе клеток и в среде культивирования. За 6 суток или 144 ч культивирования было зарегистрировано две фазы экспоненциального роста, соответственно на 10 и 40 ч инкубирования штамма в биореакторе. Значения удельной скорости роста в первую фазу составили 0.18 ч^{-1} , во вторую – 0.04 ч^{-1} . Начало стационарной фазы роста соответствовало 60 ч культивирования, к этому времени культура достигла значений оптической плотности 1.4 OD, которые сохранились до завершения эксперимента. Полученные данные свидетельствуют о достаточной стабильности морфофизиологических свойств исследуемого штамма в составе коммерческого биопрепарата производства ООО «Альготек». К концу стационарной фазы роста было зафиксировано некоторое снижение доли живых клеток от 89% (60 ч культивирования) до 56% (144 ч культивирования). Подобные результаты связаны с постепенным уменьшением концентрации питательных веществ в среде культивирования и последующим сокращением количества жизнеспособных клеток исследуемого штамма хлореллы.

В заключении необходимо отметить, что биологические свойства, перспективных для целей биотехнологии, штаммов зеленых микроводорослей во многом зависят от условий культивирования микроорганизма таких, как оптимум pH, температура, источники питания. Как фитобиотик, исследуемый штамм должен быть дополнительно исследован на устойчивость к бактериальному антагонизму, включая определение выраженных антагонистических свойств при заданной плотности клеток в культуре и времени наступления гибели бактерий, вызывающих инфекции различной этиологии. Полученные биологические характеристики штамма *Chlorella vulgaris* ГКО могут быть применимы для контроля биотехнологических процессов культивирования хлореллы и получения концентратов зеленых микроводорослей с широким спектром применения.

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 322-23 (Соглашение № 23-16-20026) совместно с Республикой Карелия с финансированием из Фонда венчурных инвестиций Республики Карелия (ФВИ РК).

Библиографический список

1. Аужанова Н. Б. Морфологическая и систематическая характеристика хлореллы. Ее производство и применение // Научный вестник. 2014. №1(1). С.113-126.
2. Федоров В. Д. О методах изучения фитопланктона и его активности: учеб. пособие. М.: Издательство МГУ, 1979. 167 с.
3. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. and Idaomar M. Biological effects of essential oils – a review // Food and Chemical Toxicology, 2008. № 46. P. 446–475.
4. Brenes A., Roura E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action // Animal Feed Science and Technology. 2010. № 158. P.1-14.
5. Borowitzka M. A. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. J.Appl. Phycol. 1995. № 7. P. 3–15.
6. Ferdous MdF., Arefin MdS., Rahman MdM., Ripon MdMR., Rashid MdH. Beneficial effects of probiotic and phytobiotic as growth promoter alternative to antibiotic for safe broiler production // Journal of Advanced Veterinary and Animal Research. 2019. № 6(3). P. 409-415. doi: 10.5455/javar.2019.f361.
7. Gregacevic L., Klaric I., Domacinovic M., Galovic D. and Ronta M. Fitogeni aditivi u hranidbi domacih zivotinja // Krmiva. 2014. № 56 (3). P. 117–123.
8. Hashemzadeh-Cigari F., Khorvash, G.R., Ghorbani M. et al. 2014. Effects of supplementation with a phytobiotics-rich herbal mixture on performance, udder health, and metabolic status of Holstein cows with various levels of milk somatic cell counts. J. Dairy Sci. 97:7487–7497. doi:10.3168/jds.2014-7989

9. Hashemzadeh-Cigari, F., M. Khorvash, G. R. Ghorbani, M. Kadivar, J. Riasi, and Q. Zebeli. Effects of supplementation with a phytobiotics-rich herbal mixture on performance, udder health, and metabolic status of Holstein cows with various levels of milk somatic cell counts // *J Dairy Sci.* 2014. № 97. P. 7487-7497. doi: 10.3168/jds.2014-7989
10. Houketchang Ndomou S. C., Herve M. The Use of Plants as Phytobiotics: A New Challenge // *Phytochemicals in Agriculture and Food.* 2023. P. 1-19. doi:10.5772/intechopen.110731.
11. Malik V. S. Microbial secondary metabolism // *Trends Biochem. Sci.* 1980. № 5. P. 68–72.
12. Ördög V., Stirk W. A., Lenobel R., Bancířová M., Strnad M., Van Staden J., Szigeti J. and Németh L. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites // *J. Appl. Phycol.* 2004. № 16. P. 309–314.
13. Stojkovic D., Glamoclija J., Ciric A., Nikolic M., Ristic M., Siljegovic J. and Sokovic M. Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils // *Archives of Biological Sciences.* 2013. № 65 (2). P. 639–643.
14. Windisch W., Schedle K., Plitzner C. and Kroismayr A. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science.* 2008. № 86. P. 140–148.

УДК 631.147

ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА ЦИТРУСОВЫХ КУЛЬТУР, ВЫРАЩИВАЕМЫХ МЕТОДОМ *IN VITRO* НА РАЗНЫХ ВИДАХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, НА ПРИМЕРЕ СОРТОВ *C. UNSHIU* «*MIAGAWA*», *C. LIMON* «*SANBOKAN*», *C. FORTUNELLA CRASSIFOLIA* «*MEIWA*»

В.Е. Скворцов, Ю.Э. Шубина

ФГБОУ ВО «Липецкий государственный педагогический университет имени П.П. Семенова-Тян-Шанского», г. Липецк, Россия

v9871340@gmail.com

Представлены результаты по микроклональному размножению растений рода *Citrus*. На примере сортов *C. unshiu* «*Miagawa*», *C. limon* «*Sanbokan*», *C. fortunella crassifolia* «*Meiwa*» изучены основные особенности микроразмножения цитрусовых культур. Рассмотрены различные аспекты питательных сред для микроклонального размножения цитрусовых культур. Описаны стандартные составы питательных сред, используемые в практике, а также их недостатки и ограничения. Проведена сравнительная характеристика роста лимона, мандарина и кумквата в условиях *in vitro*. Оценена перспектива дальнейшего развития техники микроклонального размножения цитрусовых культур. Оценена перспективность использования метода микроклонального размножения по отношению со стандартными способами.

Ключевые слова: микроклональное размножение, цитрусовые, *in vitro*

FEATURES OF THE MORPHOGENESIS OF CITRUS CROPS GROWN BY THE *IN VITRO* METHOD ON DIFFERENT TYPES OF NUTRIENT MEDIA USING THE EXAMPLE OF THE VARIETIES *C. UNSHIU* “*MIAGAWA*”, *C. LIMON* “*SANBOKAN*”, *C. FORTUNELLA CRASSIFOLIA* “*MEIWA*”

V.E. Skvortsov, Y.E. Shubina

P.P. Semyonov-Tyan-Shansky Lipetsk State Pedagogical University, Lipetsk, Russia.

v9871340@gmail.com

This article presents the results on the microclonal reproduction of plants of the genus *Citrus*. The main features of the reproduction of citrus crops have been studied using the example of the varieties *C. unshiu* “*Miagawa*”, *C. limon* “*Sanbokan*”, *C. fortunella crassifolia* “*Meiwa*”. A comparative characterization of the growth of lemon, tangerine and kumquat *in vitro* was carried out. The prospect of further development of the technique of microclonal reproduction of citrus crops is evaluated. The peculiarities of the microclonal reproduction of citrus fruits have been revealed.

Keywords: microclonal reproduction, citrus fruits, *in vitro*

Цитрусоводство в мире является важной и весьма рентабельной отраслью сельского хозяйства. Цитрусовые занимают одно из первых мест в мире по объемам производства среди других плодовых субтропических культур. Цитрусовые активно используются при изготовлении фруктовых соков, алкогольных напитков, джемов и мармеладов. Площадь посадок цитрусовых растений в мире составляет более 987 тыс. га. В настоящее время выращиванием цитрусовых на промышленной основе занимаются более чем в 70 странах мира. Основными цитрусопроизводящими странами являются Китай, Бразилия, Испания, Италия, Япония, Марокко, Турция и другие, с теплым влажным климатом. Среди них Китай и Бразилия являются

крупнейшими производителями цитрусовых в мире с объемом производства более 50,16% от всего объема.

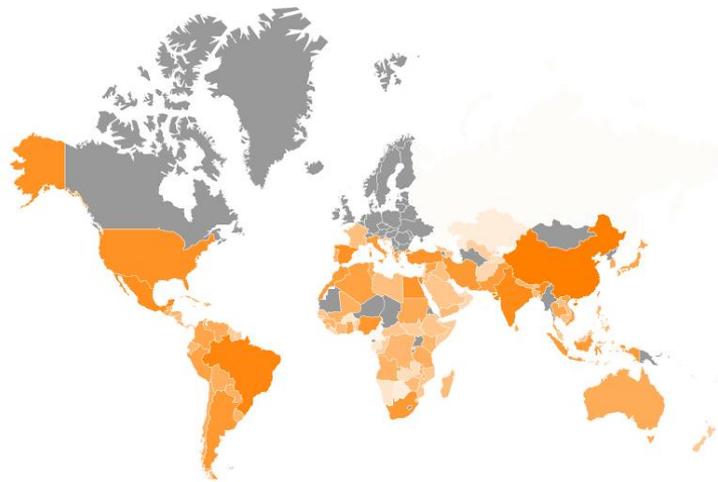


Рисунок 1. Страны по общему объему производства цитрусовых

Всего в мире сейчас выращивается около 25 видов цитрусовых культур: апельсины, грейпфруты, мандарины, лимоны, бергамот, помело, цитроны, лаймы, кумкваты, клементины, танжеринны. За последние 20 лет производство цитрусовых в мире непрерывно увеличивается и в настоящее время составляет около 150 млн. т.

Цитрусовые относятся к трудно размножаемым растениям. Основным методом размножения цитрусовых культур является прививка. Однако в последние десятилетия активно используется метод микроклонального размножения. Данный метод более предпочтителен по сравнению с обычным вегетативным размножением черенками, прививками, отводками. В настоящее время данный метод размножения сельскохозяйственных культур начинает набирать обороты, это актуально при размножении хозяйственно ценных сортов, которые плохо размножаются путем вегетативного размножения.

Исследование современных методов биотехнологии может помочь решить стоящие проблемы. Культивирование растений *in vitro* в состоянии замедленного роста имеет свои преимущества: высокая степень надежности сохранения ценных генотипов, освобождение растений от вирусов за счет использования меристемной культуры, высокий коэффициент размножения, ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития, экономия площади, трудовых ресурсов. Однако по отношению к цитрусовым в данном методе размножения есть ряд особенностей. Культивирование тканей цитрусовых *in vitro* долгое время редко использовалось как объект исследования. Это было связано со специфическими трудностями культивирования тканей, изолированных из растения. При размножении *in vitro* часто используют среды Мурасига и Скуга, Гамборга, Хеллера и другие. Наиболее часто используют среду Мурасига и Скуга, которая содержит много неорганического азота, что стимулирует процессы органогенеза и соматического эмбриогенеза, также данная среда является сбалансированной, богата макро и микроэлементами в силу чего развитие растений в данных средах происходит гораздо быстрее.

От химического состава питательной среды зависит скорость роста растительных эмплантов, особенности морфогенеза.

Основные компоненты питательных сред для растений:

1. Минеральные соли (макро- и микроэлементы).
2. Источник углеводного питания (сахароза).

3. Витамин.

4. Регуляторы роста (фитогормоны).

Для каждой растительной культуры необходим тщательный подбор питательной среды, которая должна содержать минеральные компоненты в различных концентрациях [7]. Состав питательной среды необходимо подбирать для каждого вида растений. Для citrusовых особенно важно повышенное содержание цитокининов (бензиламинопурина, фуруриламинопурин), а также применение регуляторов роста гетероауксина и этилена которые необходимы для дифференцировки клеток, индукции клеточных делений.

Это позволяет не только увеличить продуктивность размножения данных культур, но и оздоровить посадочный материал. В особенности метод *In vitro* часто применяется для размножения citrusовых культур в промышленных масштабах. Таким методом особенно часто размножаются мандарины, кумкваты, грейпфруты.

Целью данного исследования являлось выявление наиболее благоприятных условий состава питательной среды на уровень регенерации, роста и развития микропобегов citrusовых *in vitro*. Оценка особенностей морфогенеза на разных питательных средах. Оценка жизнеспособности силы роста и приживаемости образцов, культивируемых на разных средах.

Материалы и методы исследование проведено на 3 видах питательных сред, микропобеги citrusовых культур. Материалом для исследования служили мандарин сорта «Мигава» (*C. unshiu* «*Miagawa*»), лимон сорта «Санбоккан» (*C. limon* «*Sanbokan*»), кумкват сорта «Мейва» (*C. fortunella crassifolia* «*Meiwa*»).

Изучение процессов орфогенеза citrusовых растений на питательных средах оценка жизнеспособности силы роста и приживаемости образцов, культивируемых на разных средах. Для исследования было приготовлено 3 типа питательных сред: Мурасига и Скуга, Гамборга, Хеллера со стандартным составом (рис. 2). На каждую питательную среду было помещено 45 эксплантов по 15 образцов каждого сорта. На протяжении всего эксперимента производились наблюдения за образцами.

Состав разных питательных сред, применяемых при культивировании *in vitro*

Компоненты сред	Концентрация (мг/л) в средах по прописи				
	Мурасига и Скуга	Гамборга и Эвелера	Уайта	Нича, Нич	Кю и Михайлюка
KNO ₃	1900	3000	81	950	1900
NH ₄ NO ₃	1650	–	–	720	600
Ca(NO ₃) ₂	–	–	142	–	–
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	–	–	–	–	–
(NH ₄) ₂ SO ₄	–	134	–	–	–
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	500	74	185	300
CaCl ₂ ·H ₂ O	–	–	–	166	–
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	150	–	–	–
KCl	–	–	65	–	300
KH ₂ PO ₄	170	–	12	68	170
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	–	150	–	–	–
MnSO ₄ ·H ₂ O	–	10	–	–	10
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	–	–	25	–
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8,6	–	–	–	2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	–	2	–	10	–
H ₃ BO ₃	6,2	3	–	10	3,6
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,075	–	0,025	0,025
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	–	0,25	0,25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	–	–	0,025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	–	–	27,8	5,0
NaEDTA·2H ₂ O	37,3	–	–	37,3	–
Секвестрен 330-Fe	–	28	–	–	–
Мезонизит	100	–	–	200	100
Аскорбиновая кислота	–	–	–	3	–
Тиамин-HCl	0,5	–	–	3	0,005
Пиридоксин-HCl	0,5	–	–	1	0,005
Никотиновая кислота	0,5	–	–	–	–
Сахароза	30000	20000	20000	60000	125

Рисунок 2. Химический состав наиболее распространенных питательных сред

Сортовые различия проявлялись как на стадии пролиферации, так и на стадии корнеобразования

Среди эксплантов разных сортов одного и того же вида плодовых растений нередко наблюдается разная степень проявления реакции на включаемые в среду регуляторы роста.

Таблица 1

Выход жизнеспособных эксплантов цитрусовых на разных типах питательных сред

Сорт	Количество жизнеспособных эксплантов, шт		
	Мурасига и Скуга	Гамборга	Хеллера
<i>C. unshiu</i> « <i>Miagawa</i> »	13	11	9
<i>C. limon</i> « <i>Sanbokan</i> »	15	10	12
<i>C. fortunella</i> « <i>Meiwa</i> »	8	6	10

Приживаемость составила 77,8-81,6%. Наименьшая приживаемость наблюдается на среде Хеллера. В течение 4 месяцев в период с 27.09.2024-30.01.2024 мы проводили наблюдения за ростом и развитием высаженных эксплантов. По результатам наблюдений наибольший рост корневой системы и побегов наблюдался на среде Мурасига и Скуга.

Таблица 2

Сила роста цитрусовых на разных типах питательных сред.

Сорт	Сила роста, мм		
	Мурасига и Скуга	Гамборга	Хеллера
<i>C. unshiu</i> « <i>Miagawa</i> »	3,15±0,11	3,07±0,19	2,70±0,18
<i>C. limon</i> « <i>Sanbokan</i> »	3,09±0,13	3,11±0,11	3,05±0,13
<i>C. fortunella</i> « <i>Meiwa</i> »	2,51±0,17	2,14±0,15	3,09±0,11

Таблица 3

Коэффициент размножения цитрусовых культур в разных типах питательных средах

Сорт	Коэффициент размножения цитрусовых культур, %		
	Мурасига и Скуга	Гамборга	Хеллера
<i>C. unshiu</i> « <i>Miagawa</i> »	4,93	4,51	4,19
<i>C. limon</i> « <i>Sanbokan</i> »	5,47	5,17	5,08
<i>C. fortunella</i> « <i>Meiwa</i> »	6,38	6,10	5,26

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлен оптимальный гормональный состав питательной среды для введения исследуемых сортов цитрусовых в культуру *in vitro*. По результатам исследования наиболее благоприятной средой для размножения цитрусовых является Мурасига и Скуга на ней у исследуемых эксплантов наблюдалась наибольшая сила роста и высокий коэффициент размножения.

Библиографический список

1. Билалова Э.Г. Размножение цитрусовых в культуре *in vitro* /Биологические аспекты распространения, адаптации и устойчивости растений. (Материалы с международным участием) научной конференции. Изд-во Мордовского ун-та. г. Саранск, 2016 С. 53-55.
2. Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение цитрусовых культурой пазушных почек / Р. Г. Бутенко, Л. Н. Шенгелия // Культура клеток растений биотехнология. - М.: Наука, 1986. - С. 110-113.
3. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.
4. Вехов Н.К. Размножение древесных и кустарниковых пород. М.: Изд. Министерства коммунального хозяйства РСФСР, 1954. 320 с.
5. Высоцкий В. А. Культура изолированных тканей и органов плодовых растений: оздоровление и микрклональное размножение // Сельскохозяйственная биология: Ежемесячный научно-теоретический журнал. М., 1983. № 7. С. 42–47.

6. Глоба-Михайленко И.Д. Использование метода культуры ткани в цитрусоводстве / И.Д. Глоба-Михайленко // Субтропические культуры. -1980. -№3.- С. 32-35.
7. Гродзинский А.М. Биологические методы исследования ростовых веществ у растений. Ростовые вещества и их роль в процессе роста и развития растений. Ленинград. 1959. 64 с.
8. Деменко В.И. Микрклональное размножение садовых растений: Учебное пособие. -М.: РГАУ - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2007. - 55 с.
9. Иванова И. Физиологические основы микрклонального размножения растений. Международный агропромышленный журнал. 1990. №3. С.35-
10. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, Наукова думка, 1980
11. Моисеева Н.А. Молекулярные и клеточные механизмы морфогенеза в культуре клеток растений. Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. -И^Наука, 1991. С. 166-185
12. Муратова С.А. Размножение садовых культур *in vitro* /С.А. Муратова, Д.Г. Шорников, М.Б. Янковская. - Мичуринск-наукоград РФ, ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина, ОАО Тамбовская типография «Пролетарский светоч». 2008. - 68 с
13. Пронина И.Н. Экономические аспекты использования клонального микроразмножения в системе производства посадочного материала плодовых и ягодных культур // Плодоводство и ягодоводство России. 2011. Т. 26. С. 82-88\
14. Расторгуев С.Л. Совершенствование селекционного процесса плодовых и ягодных растений на основе цитологических методов и культуры изолированных тканей. Мичуринск-Наукоград РФ, 2008. 335с.
15. Рахимбаев И.Р. Культура клеток и клеточная инженерия растений. Алматы, КазГУ, 1993.\
16. Чернец А. М. Влияние минерального питания на интенсивность пролиферации сортов вишни *in vitro* // Тезисы докладов Международной конференции «Биология культивируемых клеток и биотехнология 2». Новосибирск, 1988. С. 343.

УДК 663.15

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ПЛОДОВО-ЯГОДНОГО СЫРЬЯ

Е.Н. Соколова

*ВНИИ пищевой биотехнологии – филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»
Москва, Россия*

Рациональный подход к подбору способа воздействия на субклеточные структуры плодово-ягодного сырья является важным аспектом для извлечения биологически активных компонентов и сохранения их природной ценности. Результаты исследований показали, что ферментативный метод позволяет осуществлять направленную конверсию высокомолекулярных полимеров в биодоступные для пищеварительных ферментов формы. Разработка биотехнологий производства функциональных ингредиентов с сохранением ценных биологически активных веществ растительного происхождения для создания пищевых продуктов является актуальным и перспективным направлением.

Ключевые слова: ферментализ, плодово-ягодное сырье, биокатализ, биологически активные вещества, ферментные препараты

BIOTECHNOLOGICAL BASES OF COMPLEX PROCESSING OF FRUIT AND BERRY RAW MATERIALS

E.N. Sokolova

All-Russian Research Institute of Food Biotechnology - branch of FGBUN "FIC Nutrition and Biotechnology". Moscow, Russia

The rational approach to the selection of the method of influence on the subcellular structures of fruit and berry raw materials is an important aspect for the extraction of biologically active components and preservation of their natural value. The results of the studies showed that the enzymatic method allows the directed conversion of high molecular weight polymers into bioavailable forms for digestive enzymes. Development of biotechnologies for production of functional ingredients with preservation of valuable biologically active substances of plant origin for creation of food products is an actual and perspective direction.

Keywords: fermentolysis, fruit and berry raw materials, biocatalysis, biologically active substances, enzyme preparations

Актуальность развития пищевой биотехнологии в России связана с решением проблем несбалансированности питания населения, недостатка лечебно-профилактических продуктов питания для больных хроническими заболеваниями, снижения себестоимости производства пищевых продуктов [1]. Перспективы использования отходов взамен традиционных видов первичного сырья вторичным, а также совершенствование технологий по производству полноценных, обогащенных биологически ценными компонентами ингредиентов в различных отраслях промышленности, очень велики [2]. Для сокращения вторичных сырьевых ресурсов (ВСП) используются различные безотходные технологии производства новых видов пищевых продуктов, обогащенных биологически ценными ингредиентами сырья [3]. Комплексная переработка сырья с максимальным извлечением биологически активных веществ будет эффективным решением для промышленности и сохранением экологической составляющей природного равновесия [4].

Президент Российской Федерации на Послании Федеральному собранию от 2018г. указал на необходимость ускоренной модернизации. Создаваемые и модернизируемые производства должны основываться не на традиционных, а на принципиально новых наукоемких технологиях, в которые входят и биотехнологические процессы. Они относятся к двум критическим технологиям РФ, а именно – №3 (биотехнологические, биосинтетические технологии) и №8 (нано-, биотехнологии) входящим в «Приоритетные направления развития науки, технологий и техники РФ» [5]. Стратегия повышения качества пищевой продукции до 2030 г., декларирует не только развитие отрасли ингредиентов, нормативно-методической базы по определению пищевых добавок в составе пищевых продуктов, развитие здорового питания и продукции заданного состава, пересмотр перечня разрешенных пищевых добавок, регламентов их применения, но также и совершенствование государственного регулирования в области качества пищевой продукции, что предусматривает пересмотр системы подтверждения (оценки) соответствия, а именно возврат процедуры государственной регистрации пищевых добавок, комплексных пищевых добавок, ароматизаторов [6].

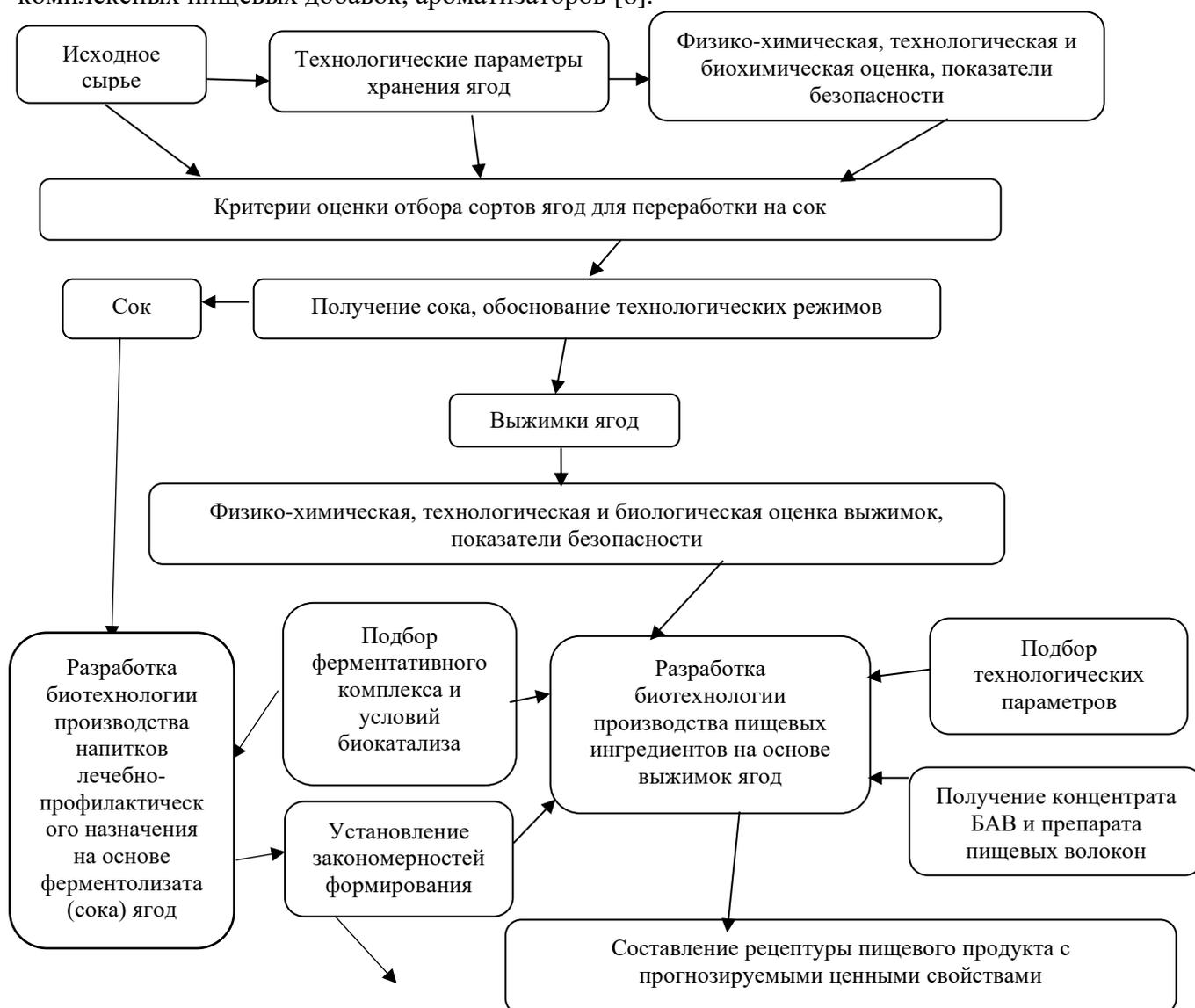


Рисунок 1. Алгоритм комплексного использования плодово-ягодного сырья в технологии производства пищевых ингредиентов

Цель данной работы – обобщение научных и экспериментальных данных биотехнологических основ комплексной переработки плодово-ягодного сырья по составу БАВ для их использования в качестве сырья при создании натуральных пищевых ингредиентов.

Рациональный подход к подбору способа воздействия на растительную ткань является крайне важным аспектом для извлечения биологически активных компонентов и сохранения их природной ценности. Особенности тканевого строения растительного сырья, а также локализация биологически ценных веществ в структуре сырья требует тщательного исследования для извлечения их в растворимую форму.

Основной характеристикой любой ферментной системы является уровень активности отдельных ферментов комплекса. В настоящем исследовании проводили определение различных ферментативных активностей, позволяющих составить представление о качественном и количественном составе того или иного комплекса, а также направленности его действия. Ферментные препараты, используемые для биокатализа плодово-ягодного сырья, входят в перечень ТР ТС 029/2012 (приложение 26) и разрешены к использованию в пищевой промышленности. Характеристика ферментов по основной (мажорной) активности и продуцент представлены в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика ферментных препаратов

Наименование ферментного препарата	Продуцент	Основной фермент	Активность основного фермента, ед/см ³
Extrapect color	<i>Aspergillus niger</i>	Пектиназа	ПкС-1926,0 \pm 96,3
Extrapect press	<i>Aspergillus niger</i>	Пектиназа	ПкС-2218,0 \pm 110,7
Pectase – KDN	<i>Aspergillus niger</i>	Пектинэстераза	ПэС-1963,9 \pm 97,5
Extrapect super clar	<i>Aspergillus niger</i>	Пектинэстераза	ПэС-421,0 \pm 20,5
Пектиназа 2 Г18Х	<i>Aspergillus niger</i>	Пектинэстераза	ПэС – 2900,0 \pm 145,0
Пектиназа МА Г18Х	<i>Aspergillus niger</i>	Пектинэстераза	ПэС – 715,0 \pm 35,1
Sunson	<i>Aspergillus niger</i>	Пектинэстераза	ПэС- 250,0 \pm 12,3
Пектофоеитидин Г10Х	<i>Aspergillus foetidus</i>	Пектиназа	ПкС – 397,0 \pm 19,7
Пектиназа 1 (Г18Х)	<i>Aspergillus foetidus</i>	Пектинэстераза	ПэС -2200,0 \pm 105,5
Брюзайм Г18Х	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Бета-Глюканаза	β -ГкС-800,0 \pm 38,7
Целловиридин Г20Х	<i>Trichoderma viride</i>	Целлюлаза	ЦС-2000,0 \pm 99,4
Амилопротооризин Г20Х	<i>Aspergillus oryzae</i>	Протеаза	ПС-800,0 \pm 39,1
Пектиназа Г 20Х	<i>Aspergillus foetidus</i>	Пектиназа	ПкС-3500 \pm 172,0
Нейтраза Г 18Х	<i>Bacillus subtilis</i>	Протеаза	ПС – 400,0 \pm 18,0
Липаза Г 20Х	<i>Aspergillus niger</i>	Липаза	ЛС - 4000,0 \pm 197,0

Значения представлены в виде средних \pm стандартное отклонение

Во ВНИИПБТ проведена серия исследований, направленных на изучение особенностей биохимического состава плодово-ягодного сырья, а также влияния состава ферментных систем на степень деструктивных изменений полимеров плодово-ягодного сырья, необходимых для извлечения БАВ.

Анализ полученных экспериментальных данных позволил выявить закономерности направленной деструкции плодово-ягодного сырья с целью повышения выхода пищевых и биологически ценных компонентов сырья, а также разработать научно-обоснованные

требования к составу ферментных систем для повышения выхода биологически функциональных ингредиентов (табл. 2).

Таблица 2

Состав ферментативных комплексов для гидролиза плодово-ягодного сырья при получении функциональных напитков

Сырье	Ферменты	
	Сок	Жмых
Яблоки	Пектиназа	Пектиназа Целлюлаза
	Протеаза	
	Бета-глюканаза	
Черная смородина	Пектиназа	Пектиназа Целлюлаза
	Бета-глюканаза	
Рябина красная	Полигалактуроназа, Целлюлаза	
Рябина черноплодная	Пектиназа, протеаза Целлюлаза	Пектиназа, протеаза Целлюлаза, липаза
Брусника	Полигалактуроназа, протеаза, целлюлаза	

Исследована остаточная ферментативная активность введенных ферментных препаратов в состав ферментализатов сока и жмыха, экспериментально выявлено, что полная инактивация ферментов происходит в результате пастеризации полученных ферментализатов при 60°C и времени экспозиции 20 минут. Таким образом, получены новые экспериментальные данные, позволившие оптимизировать параметры процесса и разработать процессуально-технологическую схему производства ферментализатов плодово-ягодного сырья, основанную на традиционной технологии, включающую стадию ферментной обработки плодово-ягодного сырья при периодическом перемешивании и дальнейшем разделении твердой и жидкой фракции с подбором оптимальных режимов процесса.

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-16-00100, <https://rscf.ru/project/22-16-00100>

Библиографический список

1. Серба Е.М. Актуальные направления пищевой биотехнологии для повышения качества и хранимоспособности продуктов питания. [электронный ресурс] URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/aktualnye-napravleniya-pischevoy-biotehnologii-dlya-povysheniya-kachestva-i-hranimosposobnosti-produktov-pitaniya> (дата обращения: 09.07.2024)
2. Поляков В.А., Погоржельская Н.С. Инновационное развитие пищевой биотехнологии // Индустрия питания. №4. 2017. С.6-14
3. Позняковский В.М. Вызовы и стратегические мегатренды современной нутрициологии // Индустрия питания. Т9. №2. 2024. С.5-12
4. Савельев, Ю. В. Биотехнологический потенциал лесных регионов России и технико-экономическое обоснование комплексной переработки лесного биотехнологического сырья / Ю. В. Савельев // Отходы и ресурсы. — 2022. — Т. 9. — № 1. — URL: <https://mir-nauki.com/PDF/02NZOR122.pdf> DOI: 10.15862/02NZOR122
5. Послание Президента РФ Федеральному Собранию от 18.03.2018г[электронный ресурс] www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71788764/?ysclid=lyfsv960yf953342013 (дата обращения 09.07.2024)
6. Об утверждении Стратегии повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года от 29 июня 2016г [электронный ресурс] docs.cntd.ru ((дата обращения 09.07.2024)

УДК 57.085.2:633.1

КАЛЛУСНЫЕ КУЛЬТУРЫ ЗЕРНОВЫХ НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ В СЕЛЕКЦИОННОЙ РАБОТЕ КРАСНИИСХ

В.Ю. Ступко, С.Ю. Луговцова, Н.А. Нешумаева, С.А. Герасимов, А.В. Сидоров

Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Российская Федерация

Методы культивирования каллусных тканей давно применяются в создании новых форм сельскохозяйственных культур как источники соматической изменчивости. Охарактеризованы результаты исследований по оптимизации методов работы с дедифференцированными тканями зерновых культур (ячмень, пшеница, овёс) для создания регенерантных линий с устойчивостью к эдафическим стрессовым факторам. Приведены другие направления использования данной технологии в работе КрасНИИСХ.

Ключевые слова: соматическая изменчивость, *in vitro*, ячмень, пшеница, овёс, эдафические стрессы

APPLICATION OF CALLUS CULTURES OF CEREALS UNDER SELECTIVE MEDIA IN THE BREEDING WORK OF KRASNOYARSK RESEARCH INSTITUTE OF AGRICULTURE

V.Yu. Stupko, S.Yu. Lugovtsova, N.A. Neshumaeva, S.A. Gerasimov, A.V. Sidorov

*“Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences”,
Krasnoyarsk Research Institute of Agriculture, Russia*

Methods of callus cultivation have long been used in the creation of new forms of agricultural crops as sources of somaclonal variability. The results of the investigations of optimize methods of manipulation with dedifferentiated tissues of grain crops (barley, wheat, oats) to create regenerant lines with resistance to edaphic stress factors are characterized. Other directions for application of this technology in the work of the Krasnoyarsk Research Institute of Agriculture are given.

Keywords: somaclonal variations, *in vitro*, barley, wheat, oats, edaphic stresses

Введение. Для расширения пула источников хозяйственно-полезных признаков при создании новых форм зерновых используются, помимо диких сородичей культурных растений [1], также и искусственно индуцированные изменения в имеющемся селекционном материале. Здесь можно упомянуть не только мутагенез [2], но и явление соматической изменчивости, имеющее место в дедифференцированных тканях растений *in vitro* при их массовой пролиферации [3]. Культивирование растительных тканей на питательных средах, имитирующих тот или иной стрессовый фактор, позволяет не только создавать новые формы, но и при определённых условиях проводить оценку уже имеющихся селекционных линий на устойчивость. Целью данной публикации является краткий обзор подходов, используемых в работе Красноярского НИИСХ в части внедрения биотехнологических методов в селекционный процесс.

Материалы и методы. В подготовке материала использованы данные библиографической базы Elibrary.

Создание новых форм зерновых культур. Внедрение методов работы с культурами изолированных тканей в процесс создания новых форм зерновых в Красноярском НИИСХ началось в конце 90-х гг. В качестве пилотной была выбрана культура ячменя ярового [4]. Затем работы были расширены за счёт яровой мягкой пшеницы [5] и ярового овса [6]. Основным направлением в данных исследованиях являлась оптимизация условий отбора соматоклональных вариантов на средах, имитирующих эдафический стресс (засуха, засоление, низкий pH), чуть позднее в исследованиях начали использовать и среды с фильтратом культуральной жидкости (ФКЖ) грибов рода *Fusarium*.

К настоящему времени выбраны наиболее отзывчивые типы эксплантов [7], оптимизированы составы сред, обеспечивающие высокую индукцию каллусогенеза и частоту регенерации растений, степень давления селективирующего фактора [8], в частности концентрации ФКЖ микромицетов р. *Fusarium* [9]. Особенностью подхода является использование в работе региональных штаммов фитопатогенов, коллекция которых насчитывает уже более 150 изолятов. В программах клеточной селекции зерновых используются наиболее агрессивные штаммы.

Результатом лабораторных исследований стала также технология создания форм зерновых культур на основе индуцированной в ходе процессов дедифференциации клеток соматоклональной изменчивости (рис. 1).

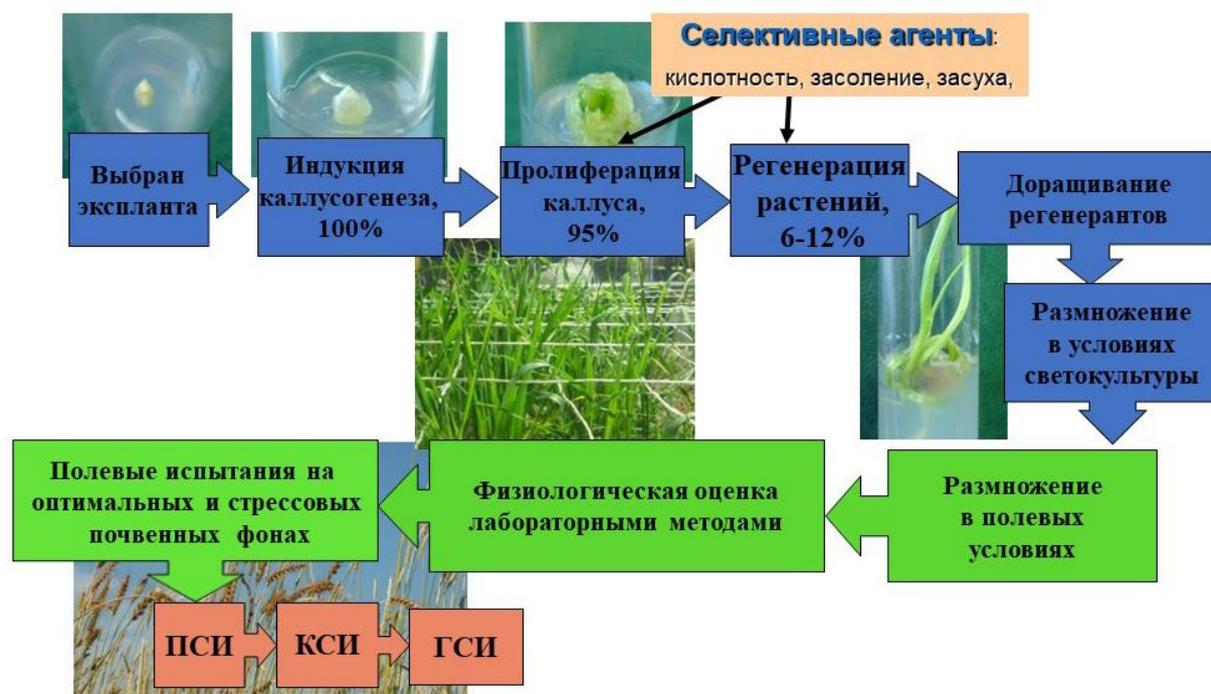


Рисунок 1. Схема получения регенерантных линий зерновых культур с устойчивостью к эдафическим стрессовым факторам.

Созданные в отделе оценки селекционного материала регенерантные линии ярового ячменя, яровой мягкой пшеницы и ярового овса были размножены в условиях светокультуры, а затем в полевых условиях. Оценка их урожайности в мелкоделяночных опытах продемонстрировала превосходство таких образцов по ряду параметров структуры урожая в годы с низким ГТК [10], а также на кислых почвах (Тюхтетский район) и засоленном фоне (Северо-Кулундинская СХОС) [11].

С использованием пакетов программ «Metan» и «Agrostab» для R 4.0.4 в среде разработки RStudio 1.4.1103 (2009–2021 RStudio, PBC) для всех трёх культур проведена оценка стабильности массы 1000 зерен. Установлено, что большинство регенерантных линий, полученных из

отобранных в условиях каллусной культуры соматональных вариаций, превосходили свои донорные генотипы по стабильности [12, 13, 14]. В исследованиях были задействованы параметрические (σ^2_{CACi} , b_i , s^2_{di}) и непараметрические (P_i , $S^{(1)}$, $S^{(3)}$, $NP^{(2)}$) индексы. При этом лишь отдельные регенерантные линии имели массу 1000 зерен ниже, чем их донорный генотип.

При анализе параметров стабильности урожайности в мелкоделяночных опытах была показана большая агрономическая стабильность линий пшеницы, полученных, например, от селекционной линии КС-1607 (рис. 2) – низкая s^2_d . В то время как линии, чьи донорными генотипами являлись сорта Минуса, Новосибирская 15 и Таежная, отнесены к образцам, хорошо переносящим неблагоприятные условия ($b_i < 0,7$).

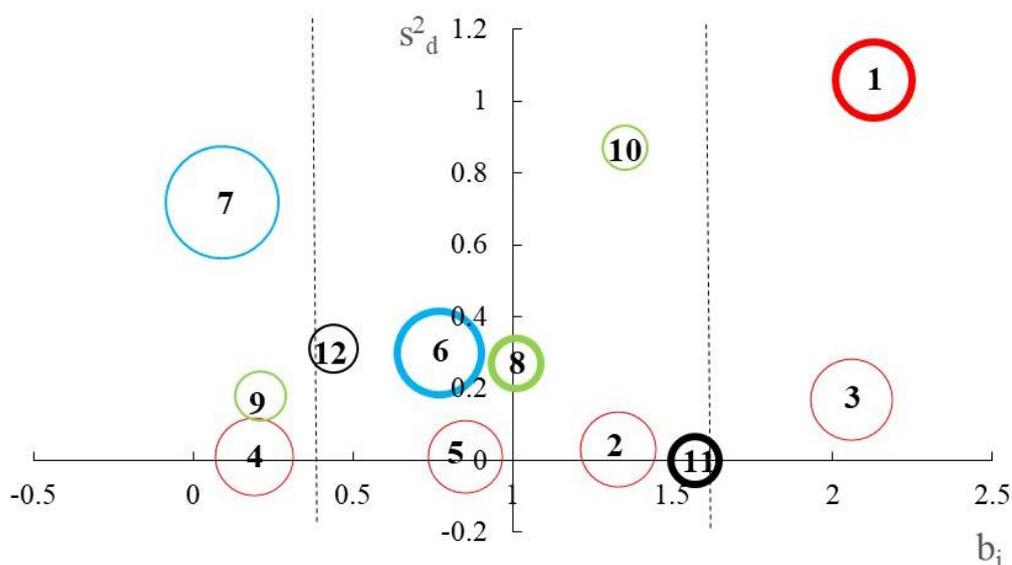


Рисунок 2. Характеристика стабильности донорных генотипов пшеницы (утолщенные линии) и их регенерантных линий (тонкие линии того же цвета) на основе данных линейной регрессии. Диаметр соответствует величине урожайности т/га. 1 – КС-1607, 2, 3, 4, 5 – линии от КС-1607, 6 – Минуса, 7 – линия от Минуса, 8 – Новосибирская 15, 9, 10 – линии от Новосибирская 15, 11 – Таежная, 12 – линия от Таежная.

Повышение фенотипической стабильности образцов в ходе отбора соматональных особей отмечено при изучении регенерантных линий голозерного овса [14].

Выделившиеся по результатам оценки на малых делянках (1 м²) регенерантные линии передаются в селекционные подразделения КрасНИИСХ. Они используются как источники устойчивости в гибридных комбинациях, так и в качестве самостоятельных селекционных образцов. Селекционный материал с участием регенерантных линий пшеницы, полученных на средах с имитацией засухи (например РЗ-79-2.7.16) и засоления (РС-Минуса-3.13), а также с нейтральной (РН-142-4.2.1) находится во всех селекционных питомниках. Созданная в условиях каллусной культуры на среде, имитирующей засуху, регенерантная линия овса от сорта Голец, превысила его по урожайности в среднем за 2022-2023 гг. на 0,38 т/га и оказалась скороспелее донорного генотипа на 4 дня. Также данный образец отличается от сорта Голец более коротким стеблем (рис. 3).

Каллусные культуры в оценке стрессоустойчивости. С использованием ПАМ-флуориметрии выявлены особенности фотосинтетической активности недифференцированных тканей зерновых культур *in vitro* в условиях индуцированного эдафического стресса [15]. На основе этих результатов разработан метод оценки засухоустойчивости пшеницы на основе данных флуоресценции хлорофилла каллусных культур, культивируемых на питательной среде,

имитирующей осмотический стресс [16]. Этот подход к скринингу генотипов показал свою состоятельность в работе селекционных подразделений [17].



Рисунок 3. Сорт Голец (слева) и регенерантная линия (справа) (ОПХ «Минино», КСИ, 2023 г.)

Определение пределов толерантности каллусных культур овса к ФКЖ грибов р. *Fusarium* позволило разработать методику оценки устойчивости селекционных образцов к данному патогену, основанную на комплексном учёте пролиферативной активности каллуса, частоты регенерации и некроза тканей. Технология внедрена и используется в мониторинге устойчивости перспективных линий в условиях КСИ.

Заключение. Итогом более чем 20-летних исследований в области культивирования изолированных тканей зерновых культур стал пул источников устойчивости, насчитывающий более 50 регенерантных линий, более половины из которых превосходят свои донорные генотипы по фенотипической стабильности, при сохранении массы 1000 зерен на уровне доноров. Применение методов оценки устойчивости селекционных линий к биотическим (корневые гнили) и абиотическим (засуха) факторам позволяет более комплексно подходить к процессу селекции.

Благодарности. Работы выполнены в рамках Государственного задания согласно тематическому плану по проектам №124012900555-6, №121052500127-8 и №АААА-А17-117110240003-2.

Библиографический список

1. Крупин П.Ю., Дивашук М.Е., Карлов Г.И. Использование генетического потенциала многолетних дикорастущих злаков в селекционном улучшении пшеницы (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2019. № 3. С. 409-425.
2. Агробиологические признаки яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) при обработке семян химическим мутагеном фосфемидом / Н.А. Боме [и др.] // Сельскохозяйственная биология. 2017. № 3. С. 570-579
3. Егорова Н.А., Ставцева И.В. Биотехнологические приемы получения форм шалфея, устойчивых к осмотическому стрессу *in vitro* // Экосистемы, их оптимизация и охрана. 2013. № 8. С. 93–100.

4. Конышева Е.Н., Зобова Н.В. Результативность получения растений-регенерантов ярового ячменя в культуре *in vitro* на селективных средах // Вестник КрасГАУ. 2006. № 10. С. 137-141.
5. Ступко В.Ю., Зобова Н.В., Сурин Н.А. Подбор условий для создания в культуре *in vitro* стрессоустойчивых форм мягкой яровой пшеницы // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2008. № 6. С. 20-26.
6. Зобова Н.В., Луговцова С.Ю., Ступко В.Ю. Условия обеспечения эффективных процессов регенерации в культуре изолированных зародышей ячменя, пшеницы и овса // Вестник КрасГАУ. 2011. № 12. С. 110-116.
7. Ступко В.Ю., Зобова Н.В., Терлецкая Н.В. Зрелые и незрелые зародыши пшеницы в исследованиях на каллусных культурах // Оптимизация селекционного процесса – фактор стабилизации и роста продукции растениеводства Сибири ОСП - 2019: материалы международной научной конференции. Красноярск. 2019. С. 66-68.
8. Stupko V.J., Zobova N.V. Callus culture technology of spring soft wheat stress tolerant varieties selection // Biochemistry and Biotechnology: Research and Development. 2012. P. 51-61.
9. Луговцова С.Ю., Ступко В.Ю., Нешумаева Н.А. Влияние культуральных фильтратов грибов рода *Fusarium* на каллусные культуры овса // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2023. № 10. С. 15-22.
10. Ступко, В.Ю., Луговцова С.Ю., Зобова Н.В. Полевая оценка результативности создания *in vitro* стрессоустойчивых форм ячменя и пшеницы // Достижения науки и техники АПК. 2014. № 6. С. 11-14.
11. Заболоцкий Е.В. Характеристика адаптивных свойств линий-регенерантов ярового ячменя, полученных на селективных средах: автореф. на соиск. ученой степ. канд. с.-х. наук: 03.00.16 – экология. Красноярск, 2006. 18 с.
12. Луговцова С.Ю., Ступко В.Ю. Оценка стабильности линий регенерантов ячменя в рамках текущего селекционного процесса // Зерновое хозяйство России. 2022. № 5. С. 26-32.
13. Ступко В.Ю., Сидоров А.В. Фенотипическая стабильность регенерантных линий яровой мягкой пшеницы // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2023. № 1. С. 144-153.
14. Ступко В. Ю., Луговцова С.Ю. Оценка стабильности регенерантных линий овса, сформировавшихся в условиях каллусной культуры *in vitro* // Достижения науки и техники АПК. 2023. № 3. С. 28-33
15. Ступко В.Ю., Зобова Н.В., Гаевский Н.А. Биофизические подходы в оценке стрессоустойчивости яровой пшеницы // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2013. № 1. С. 18-23.
16. Способ оценки засухоустойчивости генотипов пшеницы: пат. 2560580 Рос. Федерация. № 2014105956/10 / заявл. 18.02.2014 ; опубл. 20.08.2015, Бюл. №23. 6 с.
17. Перспективные способы оценки яровой мягкой пшеницы на чувствительность к эдафическим стрессам / В. Ю. Ступко [и др.] // Достижения науки и техники АПК. 2019. № 10. С. 45-50.

УДК 661.185.42

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ САХАРОЗЫ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ЕЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ СВОЙСТВ

С.А. Супоня, А.А. Батвинова, А.В. Протопопов

Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, г. Барнаул, Россия

В статье рассмотрены закономерности взаимодействия сахарозы с карбоновыми кислотами на примере аминокислотной кислоты, а также жирных кислот растительного масла. Образующиеся производные сахарозы обладают моющим эффектом и пенообразованием, характерным для ПАВ. Образование замещенных сахарозы доказано методом ИК-спектроскопии. Выявлены поверхностно-активные свойства растворов полученных производных сахарозы методом оптической спектроскопии.

Ключевые слова: ацилирование, сахароза, ПАВ на основе гликозидов, растительное масло

STUDY OF THE POSSIBILITY OF CHEMICAL MODIFICATION OF SUCROSE TO IMPROVE ITS SURFACE-ACTIVE PROPERTIES

S.A. Suponya, A.A. Batvinova, A.V. Protopopov

Polzunov Altai State Technical University, Barnaul, Russia

The article examines the patterns of interaction of sucrose with carboxylic acids using the example of aminoacetic acid, as well as fatty acids of vegetable oil. The resulting sucrose derivatives have a washing effect and foaming characteristic of surfactants. The formation of substituted sucrose was proven by IR spectroscopy. The surface-active properties of solutions of the obtained sucrose derivatives were revealed using optical spectroscopy.

Keywords: acylation, sucrose, surfactants based on glycosides, vegetable oil

Особые свойства, например совместимость и синергизм гликозидов делают молекулы сахаров очень популярными в исследованиях. Производные сахаров удовлетворяют растущий спрос на современные материалы с превосходными экологическими и эксплуатационными характеристиками в рамках текущих инициатив по устойчивому развитию. Первичная гидроксильная группа в головной группе гликозида выступает в качестве центра химической реакции. Некоторые исследования (1994-2005 гг.) [1 с.396] характеристик производных сахаров показали перспективность их разработки в качестве ПАВ и их применения в моющих средствах, средствах личной гигиены и промышленных процессах. Разработка и применение ПАВ на основе сахаров стали одной из горячих точек исследований, включая охрану окружающей среды, биологическую реабилитацию почв, очистку сточных вод, медицину, текстиль, функциональные материалы и биоинженерию (1996-2020 гг.).

В развитых странах в целом возобновляемые продукты принимаются при некоторых условиях, при которых продукт не наносит вред окружающей среде, а не сырью и не загрязняет окружающую среду в процессе производства. Между тем, потребность в поверхностно-активных веществах растет вместе с ростом промышленного развития. ПАВ нефти и газа могут загрязнять окружающую среду, поскольку после использования они превращаются в трудноразлагаемые отходы. По этой причине были изучены альтернативы легко разлагаемому поверхностно-активному веществу [2 с.107]. Сельскохозяйственные отходы содержат много углеводов, состоящих из целлюлозы (35–50 %), гемицеллюлозы (20–35 %) и лигнина (10–25 %), при этом целлюлоза может гидролизироваться до глюкозы.

За последние 10 лет было проведено множество исследований, касающихся производства поверхностно-активных веществ из углеводов. Это связано с тем, что поверхностно-активное вещество, содержащее углеводы в качестве сырья, является биоразлагаемым и нетоксичным. Углеводы становятся важным возобновляемым сырьем для промышленности поверхностно-активных веществ. Разработка поверхностно-активных веществ на основе углеводов и растительных масел является результатом концепции продукта, основанной на исключительном использовании природных ресурсов. Поверхностно-активные вещества на основе сахара привлекают повышенное внимание из-за преимуществ с точки зрения производительности, здоровья потребителя и экологической безопасности по сравнению с некоторыми стандартными продуктами.

Алкилполигликозид (APG) — неионогенное поверхностно-активное вещество, полученное из возобновляемого сырья, а именно глюкозы и жирного спирта. Ожидается, что такие продукты будут проявлять поверхностно-активные свойства благодаря наличию гидрофильного сахарного фрагмента и гидрофобных остатков жирных спиртов. Поверхностно-активное вещество – поверхностно-активное вещество, способствующее снижению поверхностного натяжения. Действие ПАВ обусловлено множеством характеристик его молекулы, состоящей из гидрофильных и липофильных групп. Гидрофильная часть является полярной, и это состояние может быть электрически положительно заряженным (катионное ПАВ), отрицательным (анионное ПАВ), нейтральным (неионное ПАВ); что касается липофильной части, то это алкил [3 с.73]. Эти две группы несут гидрофильный и липофильный баланс, который затем помогает определить, является ли поверхностно-активное вещество эмульгированным, смачивающим, растворителем, детергентом или пеногасителем.

Кирк (1998) провел реакцию асетализации глюкозы и хлорпропана, в которой асетализация происходит в положении гидроксильных групп С1 полуацетала с группой гидроксильных пропанола. Поверхностно-активное вещество трет-бутилгалактоцидазы посредством реакции асетализации галактозы и трет-бутанола было синтезировано с использованием катализатора р-TSA, и результат показывает ККМ 0,02% и гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) 3,93. Применение поверхностно-активного вещества обычно основывается на значении ГЛБ поверхностно-активного вещества; чем выше ГЛБ, тем более растворим в воде ПАВ; и наоборот, чем ниже ГЛБ, тем лучше он растворяется в масле. Полезность поверхностно-активного вещества зависит от значения ГЛБ, например, значение ГЛБ 1–3 для пеногасителя, ГЛБ 2–7 для типа эмульгатора В/М, ГЛБ 7–9 для смачивания, ГЛБ 8–18 для типа эмульгатора М/В, ГЛБ 13–15 для моющих средств и ГЛБ 15–18 для растворителя. ГЛБ – это число, которое указывает на соотношение гидрофильных и липофильных групп в поверхностно-активное вещество.

Добавление поверхностно-активного вещества в раствор приведет к уменьшению поверхностного натяжения. Как только оно достигнет определенной концентрации, поверхностное натяжение будет постоянным, даже если концентрация поверхностно-активного вещества увеличилась, когда поверхностно-активное вещество было добавлено сверх этой концентрации. концентрации поверхностно-активное вещество агрегирует с образованием мицелл. Концентрация образования мицелл называется критической концентрацией мицелл. Это обуславливает необходимость синтеза нового типа ПАВ ПНГ с использованием экологически чистого сырья, а именно трет-бутилгликозида (ТБГ), путем реакции глюкозы с трет-бутанолом с использованием катализатора п-TСК.

Цель состоит в том, чтобы найти рабочие условия (мольное соотношение, температуру и процент катализатора), которые могут обеспечить максимальный выход ТБГ, определить значение кинетики реакции и определить молекулярную структуру ТБГ. Специфические свойства поверхностно-активных веществ ТБГ позволяют использовать их в качестве эмульгаторов воды в нефтяных эмульсионных системах. В результате реакции образуется целевое соединение трет-бутилгликозида, которое несет группы эфира, гидроксила и алкила и имеет характеристики поверхностно-активного вещества [4 с.215, 280].

Нами исследован процесс получения аминозамещенных сахаров на примере взаимодействия сахарозы с аминокислотой в водной среде в присутствии гидроксида натрия при температурах 25⁰ и 45⁰С. Анализ на содержание связанной кислоты показал незначительную степень замещения в пределах 0,001-0,002, при этом на ИК-спектрах полученных продуктов не наблюдается прошедших изменений. В дальнейшем были проведены синтезы при 140⁰С в гетерогенной среде. Для проведения синтеза была получена суспензия сахарозы с аминокислотой с добавлением соли поливалентного металла в качестве катализатора, после высушивания полученная смесь выдерживалась при заданной температуре. Проведенный анализ на связанную аминокислоту показал степень замещения в сахарозе 0,07-0,1. На ИК-спектрах полученных продуктов (рис. 1) наличествуют изменения, в отличие от чистой сахарозы появляются полосы поглощения в области 3200 см⁻¹, характерные для аминогрупп, а также полосы поглощения в областях 1730 см⁻¹ и 1250 см⁻¹ характерных для колебаний сложноэфирных групп.

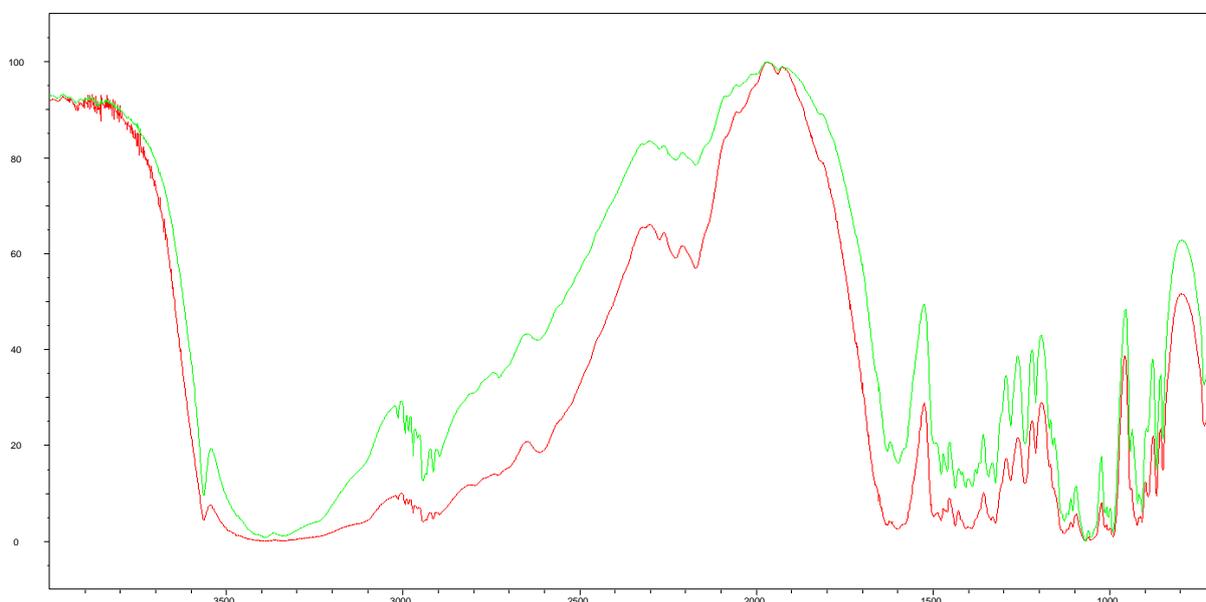


Рисунок 1. ИК-спектры продуктов взаимодействия сахарозы с аминокислотой

Полученные продукты отличаются повышенной растворимостью в холодной воде, однако для них отсутствует пенообразование полученных растворов.

В качестве повышения числа гидрофильно-липофильного баланса и увеличения разности полярностей в молекуле сахарозы было проведено взаимодействие с растительным маслом при температуре 140⁰С в присутствии катализатора. В этом случае происходит переэтерификация жирных кислот растительного масла и триглицерида в сложный эфир сахарозы. В случае взаимодействия с избытком растительного масла при соотношении к сахарозе 3:1 степень замещения в полученном продукте составляет 0,03, при этом наблюдается избыточное содержание триглицеридов и отсутствие пенообразования. В случае эквимольного соотношения триглицеридов растительного масла с сахарозой степень замещения увеличивается до 0,1. При этом продукт взаимодействия приобретает свойства ПАВ и обладает моющим эффектом и выраженной пенообразующей способностью.

Анализ методом ИК-спектроскопии (Рис. 2) показал большие изменения по сравнению с спектрами сахарозы и растительного масла, так в частности, происходит уменьшение колебаний водородных взаимодействий в области 3600 см⁻¹ появление колебаний, ответственных за сложноэфирные группы в областях 1730 см⁻¹ и 1250 см⁻¹.

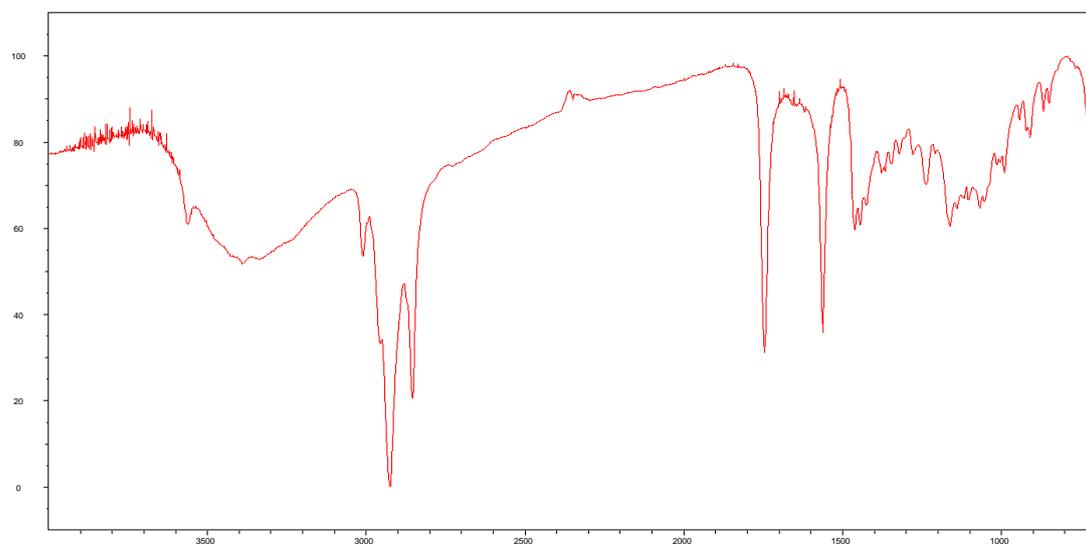


Рисунок 2. ИК-спектр продуктов взаимодействия сахарозы с жирными кислотами растительного масла

Для выявления поверхностно-активных свойств полученного ацилгликозида были проведены исследования растворов методом оптической спектроскопии (Рис. 3).

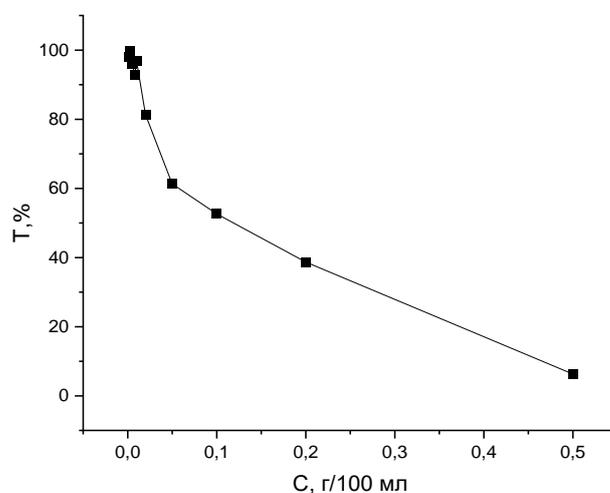


Рисунок 3. Зависимость светопропускания от концентрации растворов сложных эфиров сахарозы с жирными кислотами

Полученная зависимость светопропускания растворов ацилгликозидов от их концентрации показывает характерную зависимость для поверхностно-активных веществ. На зависимости наблюдается резкое изменение свойств при концентрации 0,002 г/мл, характеризующее начало мицеллообразования, что является хорошим значением для полученного продукта и позволяет сказать о его применимости в качестве использования мягкого неионогенного ПАВ, обладающего биоразлагаемыми свойствами и нераздражающим действием на организм человека, характерного для все жирсахаров.

Библиографический список

1. Ashokkumar R., Ramaswamy M. (2014), Phytochemical screening by FTIR spectroscopic analysis of leaf extracts of selected Indian Medical plants, *International Journal Current Microbiology and Applied Sciences*, 3 (1), pp. 395-406.
2. Forster T., Guckenbiehl B., Hensen H., Rybinski W.V. Physico-chemical basics of microemulsions with alkyl polyglycosides, *Prog. Polym. Sci.*, 1996, 101, 105-112.
3. Ryan L.D., Kaler E.W. Alkyl polyglucoside microemulsion phase behaviour, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 2001, 176, 69-83.
4. Balzer D. Alkylpolyglucoside - physikochemische Eigenschaften und Anwendung/Alkylpolyglucosides, their physico-chemical properties and their uses, *Tenside Surfactants Deterg.*, 1991, 28, 419.

РАЗВИТИЕ ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНЫХ ИННОВАЦИОННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ КАК ПРИОРИТЕТНОЕ НАПРАВЛЕНИЕ РАЗВИТИЯ ЭКОНОМИКИ И СОЦИАЛЬНОЙ СФЕРЫ РЕГИОНА

Сысоев И.С.

«Бриг-МВ», Группа компаний «НИИ Высоких Технологий», Россия, г. Владивосток

Биотехнология признана основной движущей силой в XXI веке. Опыт стран с развитой рыночной экономикой показывает, что наука, наукоемкие технологии, активная инновационная деятельность являются исходной движущей силой всей хозяйственной жизни развитых государств.

Ключевые слова: инновационное развитие, инновации, наукоемкие и высокотехнологичные технологии, высокотехнологичное производство, модернизация биологической промышленности, импортозамещение.

DEVELOPMENT OF HIGH-TECH INNOVATIVE BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTIONS AS A PRIORITY FOR THE DEVELOPMENT OF THE REGION'S ECONOMY AND SOCIAL SPHERE

Sysoev I. S.

LLC Brig-MV, Scientific Research Institute of High Tech Group, Russia, Vladivostok

Biotechnology is recognized as the main driving force in the 21st century. The experience of countries with developed market economies shows that science, high-tech technologies, and active innovation are the initial driving force of the entire economic life of developed countries

Keywords: innovative development, innovations, high-tech and high-tech technologies, high-tech production, modernization of the biological industry, import substitution.

Введение. Приоритетной задачей на данном этапе развития и применения промышленных биотехнологий для России является пересмотр и кардинальная смена факторов экономического развития отраслей промышленности, переход отраслей на инновационный путь развития посредством изменения структуры производств, приоритетного развития эффективных производств, ориентированных на выпуск продукции, базирующийся на инновационных разработках, перспективных технологических разработках [14]. Сфера биотехнологий, при всей ее перспективности и огромных потенциальных размерах новых рынков, пока не получила достаточного импульса для развития в России (за исключением биофармацевтики). Модернизация технологической базы современного промышленного производства невозможна без массового внедрения новых биотехнологий и биоэнергетики. Более того, для целого ряда отраслей (агропищевой сектор, лесной сектор, ряд подотраслей химической и нефтехимической промышленности и т.п.) модернизация и будет означать переход на биотехнологические методы и продукты. Из всех инновационных технологий, которые предстоит освоить нашей стране, биотехнологии могут обеспечить наибольшую занятость населения и улучшить социально-экономическую ситуацию в российских регионах [7].

Наукоемкая и высокотехнологичная промышленность считается локомотивами инновационного роста, поскольку для них характерны интенсивные инновационные процессы, активное взаимодействие в сфере международной торговли, освоение новых рынков, стимулирование развития смежных отраслей. Высокотехнологичные промышленные предприятия выполняют важные стратегические функции и способствуют достижению результатов в приоритетных направлениях науки и техники. В связи с этим особое значение придается инновационному развитию отраслей промышленности и разработке мер по их модернизации [8].

Что мешает развиваться биотехнологиям в российских регионах?

Проблема биотехнологической отрасли.

Основная проблема мировой и в том числе Российской биотехнологической отрасли, которую мы видим на примере Дальневосточного Федерального округа, это высокая затратность традиционных биотехнологических производств и, как следствие, отсутствие новых биотехнологических производств, за исключением фармацевтической отрасли. Сегодня же, когда во всём мире, в том числе и странах АТР: Корея, Китае и Японии биотехнологии становятся важнейшей экономической отраслью, в российских регионах, и даже в самых, казалось бы, развитых по биотехнологиям регионах – Белгородской области, Алтайском крае и других, они остаются в потенциально ожидающем положении технологического прорыва [11].

При этом «Болевая точка» мировой и Российской в том числе биотехнологической отрасли это технологическое решение - высокая затратность производства: дорогостоящее биотехнологическое оборудование, энергоёмкие технологии производства. К тому же, в конструировании биотехнологического оборудования сегодня наблюдается научный и производственный застой, стагнация, особенно это касается производства биологического оборудования для промышленного производства биопрепаратов. В этой сфере на данный момент нет или очень мало инновационных разработок, что сильно тормозит развитие биотехнологий из-за высокой капиталоемкости проектов внедрения биотехнологий, а следовательно, длительной окупаемости [11]. При этом в настоящее время доля отечественного биотехнологического оборудования на внутреннем рынке составляет порядка не более 20%.

Относительно технологического состояния России, то следует констатировать, что количество конструкторских бюро в РФ сократилось за последние 10 лет на 1/3: с 362 в 2010 г. до 233 в 2021 Россия потеряла 343 конструкторских бюро и НИИ со 117 тыс. сотрудников [13].

Создание конкурентоспособных наукоемких технологий для России является проблемой номер один.

Технологический прорыв биотехнологий может стать ключевым фактором в развитии территорий и решении многих современных вызовов, таких как продовольственная безопасность, экологическая устойчивость и борьба с болезнями. Поэтому необходимо сосредоточить усилия на развитии биотехнологий и создании благоприятного инновационного экосистемы для их внедрения [9]. На новом этапе развития в Российской Федерации сделан только первый шаг (2023 год):

Правительство утвердило Концепцию технологического развития РФ на период до 2030 г. (от 20 мая 2023 года N 1315-р). Реализация Концепции направлена на развитие высокотехнологичных отраслей экономики Российской Федерации, отраслевой документ стратегического планирования РФ. Указ Президента Российской Федерации от 02.11.2023 № 818 «О развитии природоподобных технологий в Российской Федерации», к которым в полной мере относятся биотехнологии.

Проблемы освоения результатов отечественных биотехнологических разработок.

«...Отечественная аграрная наука располагает разработками в области промышленной биотехнологии, как на уровне НИОКР, так и пилотных технологий. Причинами

незавершенности разработок и их замедленного внедрения является отсутствие в том числе, современных высокотехнологичных биопредприятий, размещенных в различных регионах страны с учетом экономической целесообразности и необходимого количества квалифицированных специалистов...» [6]. В виду того, что высокая затратность биотехнологий является одним из основных «тормозов» развития биотехнологии, в том числе и промышленной биотехнологии (Россия не исключение), ведущими учеными разработаны различные варианты концепций регионального развития биотехнологии, направленных на уменьшение фактора затратности: в том числе в формате перехода от моно крупномасштабного биопроизводства к созданию сети региональных (менее крупномасштабных) биозаводов.

При всей «инновационности», общим недостатком разработанных концепций является применение тех же традиционных методов и процессов биотехнологии с невысокой рентабельностью производства, что не решает вопрос затратности технологии биопроизводства и не способствуют применению их в решении задач развития региональных биотехнологий, что фактически и подтверждается сегодняшним низким уровнем внедрения и развития биотехнологий в регионах.

Приоритетная концепция развития региональных биотехнологических производств

Формирования инновационно-технологических конкурентных преимуществ в экономике России, как основы развития промышленного потенциала регионов, требует разработки дифференцированных инновационных стратегий, наиболее эффективно использующих имеющийся инновационный и производственно-технологический потенциал территории [5]. Приоритетной задачей в направлении широкого развития биотехнологий в регионах—переход отраслей на инновационный путь развития посредством изменения структуры производств, приоритетного развития эффективных производств, ориентированных на выпуск продукции, базирующийся на инновационных разработках, перспективных технологических разработках [14]. В современных условиях жизни инновации становятся фактором, определяющим конкурентоспособность экономики государства и его регионов

Создание и развитие высокотехнологичных инновационных биотехнологических производств на основе инновационных разработок и внедрения новых, конкурентоспособных, импортозамещающих, высокотехнологичных разработок позволяют изменить ситуацию в биотехнологической отрасли в направлении широкого развития биотехнологий в регионах что и является наиболее рациональным и экономически обоснованным путем модернизации биологической промышленности территории.

Для целого ряда отраслей (агропищевой сектор, лесной сектор, экология, ряд подотраслей химической и нефтехимической промышленности и т.п.) модернизация и будет означать переход на биотехнологические методы и продукты. Из всех инновационных технологий, которые предстоит освоить нашей стране,—биотехнологии могут обеспечить наибольшую занятость населения и улучшить социально-экономическую ситуацию в российских регионах [7].

Создание высокотехнологичных инновационных биотехнологических производств

Все возрастающая потребность отраслей народного хозяйства в продуктах микробиологического синтеза обуславливает разработку новых принципов подхода и к проектированию технологических линий микробиологических производств. Особенности такого подхода являются выяснение на этапе проектирования большого числа альтернативных вариантов технологических схем, возможных типов оборудования и формирование наиболее оптимальных из числа рассматриваемых схем.

Важнейшей задачей любого биотехнологического процесса является разработка и оптимизация научно-обоснованной технологии и аппаратуры для него [4]. В направлении технологического прорыва к перспективным инновационным технологиям биотехнологий относится разработка (технология) VBTech, которая позволяет разрешить вопрос затратности промышленной биотехнологии, а также дать импульс широкомасштабному

распространению биотехнологии от идеи до внедрения законченных разработок в промышленное производство. Биотехнологическое производство является в высшей степени наукоемким производством, а это значит, что его развитие влечет за собой существенное повышение эффективности экономики.

Разработку VBTech следует рассматривать как инновационную конструктивно-технологическую платформу, на основе которой в экспериментально-промышленном масштабе могут разрабатываться и применяться передовые отечественные технологии, перспективные конструкции биотехнологического оборудования, которые в дальнейшем предполагается тиражировать на других заводах создаваемой группы биотехнологических предприятий региона и на территориях других регионов России, в зарубежных странах.

В основе разработки лежит российский промышленный биореактор/ферментер VBTech нового типа (разработчики Сысоев И.С., Снычков А.Д., Дальневосточная Народная Академия Наук (ДВ НАН), который позволяет создать асептическое промышленное «Биотехнологическое производство в помещении размером с лабораторию». Конструкция промышленного биореактора/ферментера VBTech (НОУ-ХАУ) уникальна, в ней применяется прогрессивный способ выращивания микроорганизмов, а стерилизация проводится без применения пара.

Основным оборудованием биопроизводства является биореактор/ферментер. Именно от работы биореактора, его конструктивных особенностей зависят технико-экономические показатели процесса и качество производимой продукции. Производственная мощность с применением биореактора/ферментера VBTech соответствует крупнотоннажному промышленному биопроизводству. Он компактен, низкотратен – более, чем с 10-кратным преимуществом по затратам по сравнению с традиционным производством; с высокой рентабельностью производства; дает энергоэффективность, сравнимую с «малотоннажным» биопроизводством. Достоинства такой конструкции – крайняя простота и дешевизна, а также низкая себестоимость производства биопрепаратов [11]. Технология производства VBTech универсальна для производства аэробных микробных удобрений и препаратов, не имеет прямых аналогов на мировом рынке. Технология и готовая продукция (Азотное биоудобрение) прошли успешные испытания в России и других странах – в Китае, Белоруссии и Вьетнаме. Во Вьетнаме разработчики VBTech в 2012 году принимали участие в госпрограмме по восстановлению плодородия земель совместно с Няньчангским институтом технологических исследований и их применений. В г. Няньчанг было создано пилотное производство – база развития госпрограммы. В 2020 году проект стал резидентом Технопарка «Русский» (г. Владивосток), в 2021 г. проект был принят на сопровождение. «Инвестиционным Агентством Приморского края» [11].

Заключение. Создание конкурентоспособных наукоемких технологий для России является проблемой номер один. Накопленный в стране научно-технический потенциал и выполненные в промышленном масштабе проекты высокотехнологичных инновационных биотехнологических производств позволяют в ближайшие годы создать в регионах высокотехнологичные научно-производственные биотехнологические комплексы, что является наиболее рациональным и экономически обоснованным путем модернизации и развития биологической промышленности территории, приоритетным направлением развития экономики и социальной сферы регионов. Необходимо повысить эффективность и инвестиционную привлекательность агропромышленного и биотехнологического комплексов, а также региона в целом с привлечением прямых инвестиций из близлежащих стран Восточной Азии, способных обеспечить быстрое создание на территории региона передовых в организационном и техническом отношении производств, выпускающих качественную продукцию.

Библиографический список

1. Беляков С. А. Инструменты формирования биотехнологического сектора промышленности в регионе. Автореферат диссертации. Красноярск, 2020.
2. Биотехнология и пищевая промышленность. Современные тенденции развития науки и производства. - Кемерово; 2016 г. Часть 3.
3. Биотехнологии в пищевой и сельскохозяйственной промышленности: создание технологического суверенитета 2023
4. Войнов Н.А. Красноярск Современные проблемы и методы биотехнологии 2009
5. Зейналов Р.А. Влияние развития технологической базы на промышленный потенциал региона // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5;
6. «Концепция научного обеспечения создания и развития региональных биологических предприятий по производству препаратов для защиты животных, растений и средств, повышающих эффективность функционирования агропромышленного комплекса Российской Федерации» (ВНИТИБП)
7. Кудрявцева О.В. Типология биотехнологий и место в ней Российской биоэнергетической отрасли».
8. Проблемы и задачи инновационного развития высокотехнологичных промышленных предприятий России.
9. Развитие территорий: технологический прорыв биотехнологий 2022г: <https://pik-ingener.ru/biotexnologii-draiver-razvitiya-territorii>
10. Современные биотехнологии, используемые для охраны окружающей среды. <https://ecoportal.su/public/bio/view/1474.html>
11. Сысоев И.С. Развитие биотехнологических производств в Хабаровском крае - как приоритетное направление развития экономики и социальной сферы региона. Сборник. Органическое сельское хозяйство: от идеи до внедрения 2023 г.
12. Сысоев И.С. Внедрение в Алтайском крае инновационных биотехнологий VBTech в сфере сельского хозяйства и экологии. Сборник. Материалы III Международного биотехнологического симпозиума «БИО-АЗИЯ АЛТАЙ 2021»
13. Угроза анабиоза. <https://sovross.ru/2023/05/17/ugroza-anabioza/>
14. Шендрикова О.О. Перспективы применения биотехнологий на машиностроительных предприятиях. Организатор производства. 44, 2015. № 4.

УДК 574.24 579.26 579.64

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОДУКЦИИ БИОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ШТАММАМИ
PSEUDOMONAS PROTEGENS А-СМС-05 И *GORDONIA PARAFFINIVORANS* А-СМС-11
ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

А.Н. Сысоева^{1,2}, А.Л. Герасимчук¹, А.Е. Паталаха¹, Д.А. Ивасенко^{1,2}

¹Томский государственный университет, г. Томск, Российская Федерация

²ООО «Дарвин», г. Томск, Российская Федерация

В статье приведены результаты экспериментов по изучению биотехнологически значимых физиологических характеристик изолятов из сточных вод городских очистных сооружений *Pseudomonas protegens* и *Gordonia paraffinivorans*, включая ингибирование роста фитопатогенного гриба рода *Fusarium* и стимулирование ризогенеза у растений барбариса (*Berberis thunbergii* Aurea). Для штамма *P. protegens* А-СМС-05 выявлены более высокие показатели по всем исследованным характеристикам, таким как эффективность ингибирования фитопатогена и процент эксплантов с признаками ризогенеза.

Ключевые слова: Сельскохозяйственные биотехнологии, микроорганизмы – продуценты биоактивных веществ, *Pseudomonas protegens*, *Gordonia paraffinivorans*, антагонизм фитопатогенным микроорганизмам, стимулирование роста растений, ризогенез, *Berberis thunbergii* Aurea

STUDY OF BIOACTIVE SUBSTANCES PRODUCTION BY STRAINS *PSEUDOMONAS PROTEGENS* А-СМС-05 AND *GORDONIA PARAFFINIVORANS* А-СМС-11 FOR USE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

A.N. Sysoeva^{1,2}, A.L. Gerasimchuk¹, A.E. Patalakha¹, D.A. Ivashenko^{1,2}

¹Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

²Darwin LLC, Tomsk, Russian Federation

The article presents the experiments results to study biotechnologically significant physiological characteristics of isolates from municipal treatment plants wastewater *Pseudomonas protegens* and *Gordonia paraffinivorans*, including growth inhibition of phytopathogenic fungus of the genus *Fusarium* and rhizogenesis stimulation in barberry plants (*Berberis thunbergii* Aurea). *P. protegens* А-СМС-05 showed higher values for all studied characteristics, such as phytopathogen inhibition efficiency and percentage of explants with rhizogenesis signs.

Keywords: Agricultural biotechnology, microorganisms - producers of bioactive substances, *Pseudomonas protegens*, *Gordonia paraffinivorans*, antagonism to phytopathogens, plant growth stimulation, rhizogenesis, *Berberis thunbergii* Aurea

Введение. В настоящее время во всем мире сельскохозяйственная промышленность сталкивается с необходимостью производства всё большего количества продуктов питания для удовлетворения растущего спроса населения, а также проблемами последствий загрязнения окружающей среды, изменения климата и нехватки воды, которые снижают урожайность сельскохозяйственных культур. Чрезмерное использование химических удобрений привело к различным негативным последствиям, таким как накопление вредных элементов в почве,

загрязнение грунтовых, снижение содержания органического вещества в почве и ее плодородия вместе с ухудшением физических и химических свойств почвы [1, 2]. Таким образом, современное сельскохозяйственное производство в различных странах мира сталкивается с необходимостью решения сразу двух важнейших проблем, а именно защиты сельскохозяйственных культур от вредителей, болезней и сорняков и защиты окружающей среды от техногенного загрязнения.

В последние годы особое внимание уделяется промышленному потенциалу микроорганизмов для использования в качестве биологических удобрений, их способности улучшать доступность питательных веществ, усиливать рост и продуктивность растений и защищать окружающую среду от негативных воздействий [3].

В настоящем исследовании изучали ростостимулирующие и биопротекторные свойства штаммов *Pseudomonas protegens* A-СМС-05 и *Gordonia paraffinivorans* A-СМС-11, выделенных нами ранее из городских очистных сооружений г. Сурабая, Индонезия [4].

Методы исследования. Для культивирования штаммов бактерий использовали среду РСА (plate count agar), агаризованную или жидкую среду на основе гидролизата рыбной муки (ГРМ), а также минеральную среду [4] с добавлением 1 % пальмового масла в качестве источника углерода. Для определения оптимальных условий для культивирования штаммов проводили посеы при разных значениях рН (от 3 до 10) и температур (+4, +15, +28, +32, +35, +40 °С).

Количественное определение липолитической активности проводили по модифицированному методу Ота-Ямада с оливковым маслом в качестве субстрата [5].

Антагонистическую активность штаммов по отношению друг к другу определяли методом перекрестных штрихов. Чашки с агаризованной средой инокулировали бактериальным штаммом, нанося одну полоску в середине чашки, и инкубировали при 28°С в течение ночи. Затем засеивали чашку другим штаммом одной полоской, перпендикулярной выросшему бактериальному штамму. Появление зоны отсутствия роста будет свидетельствовать об ингибировании второго штамма первым.

Для выявления ингибирующего эффекта штаммов *P. protegens* A-СМС-05 и *G. paraffinivorans* A-СМС-11 на рост и развитие патогенных микроорганизмов выбран штамм фитопатогенного гриба *Fusarium* sp. D1. Эксперимент проводили на среде для грибов-микромикетов (МЭ – мальтозный экстракт), а также РСА. 0,1 мл свежей жидкой бактериальной культуры высевали чашки с агаризованной средой и равномерно распределяли по поверхности агара с помощью шпателя. Далее на инокулированные чашки помещали два фрагмента свежесвыращенного грибного мицелия на расстоянии друг от друга не менее 3 см. Культивирование проводили при 28°С в течении 5 суток. Ингибирующий эффект бактериальных штаммов определяли с помощью измерения диаметра зоны ингибирования роста патогенного штамма гриба и расчета по формуле, как описано ранее [6]. Эксперимент проводили отдельно для каждого бактериального штамма в трех независимых повторностях.

Для эксперимента по стимулированию корнеобразования штаммами *P. protegens* A-СМС-05 и *G. paraffinivorans* A-СМС-11 выбран барбарис Тунберга (*Berberis thunbergii* Aurea), для которого не удалось подобрать оптимальной питательной среды для ризогенеза. Экспланты барбариса, полученные микрочлональным размножением, без признаков ризогенеза были высажены в стерильную почву, обработанную раствором культуральной жидкости с концентрацией 10^8 кл/мл. Для каждого штамма проводили отдельный эксперимент. В каждом эксперименте использовали 66 эксплантов барбариса. В качестве контроля высаживали экспланты в стерильную почву без какой-либо обработки. Дополнительный контрольный эксперимент включал обработку нестерильной почвы регулятором роста растений (препарат «Корневин», содержащий индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) в качестве действующего вещества), а также внесение биопрепарата на основе гриба *Trichoderma* для подавления нежелательной микрофлоры. Общая продолжительность эксперимента составила 5 недель. Эксперимент проводился при комнатной температуре. Первые 2 недели экспланты находились

под герметичными прозрачными крышками для поддержания высокой влажности и адаптации эксплантов. В следующие 3 недели влажность постепенно снижали за счет нарушения герметичности крышек. Когда вся влага испарилась, растения были извлечены из почвы и проведен подсчет эксплантов с признаками ризогенеза. Статистическая обработка полученных данных проведена с применением t-критерия Стьюдента. Отличия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Представители *Pseudomonas* и *Gordonia* широко распространены в природе и активно изучаются благодаря своей способности разлагать, преобразовывать и синтезировать органические соединения [7-8]. *P. protegens* известен как стимулирующая рост растений ризобактерия [9]. Для *G. paraffinivorans* не обнаружено опубликованных данных об исследовании их потенциала в качестве стимуляторов роста растений или свойств биоконтроля, однако подобные работы есть для других представителей рода *Gordonia* [10].

Ранее нами для обоих штаммов были показаны липофильные свойства при культивировании на диагностической и селективной питательной среде [4], а также измерена продукция липаз ($24,1 \pm 6,2$ мкМ/ч*мл и $42,5 \pm 6,6$ мкМ/ч*мл для А-СМС-11 и А-СМС-05, соответственно), что свидетельствует о способности штаммов к эффективной деструкции жиросодержащих веществ.

На первом этапе изучали оптимальные условия для культивирования штаммов *P. protegens* А-СМС-05 и *G. paraffinivorans* А-СМС-11. Диапазон температур для роста составил 4 - 40 °С для А-СМС-11 и 4 - 35 °С для А-СМС-05 с оптимумом при 32-35°С и 28-32 °С, соответственно. Оба штамма росли в диапазоне значений рН от 4 до 10 с оптимумом 7,5 и 8-9 для А-СМС-11 и А-СМС-05, соответственно.

Далее исследовали ингибирующую активность штаммов по отношению к фитопатогенному грибу рода *Fusarium*. При совместном культивировании *Fusarium* D1 в присутствии каждого из бактериальных штаммов наблюдали изменение морфологии мицелия гриба и ингибирование зоны роста (рис. 1). Ингибирование роста мицелия составило от 9 до 29 % для штамма А-СМС-11 и не менее 66 % для штамма А-СМС-05.

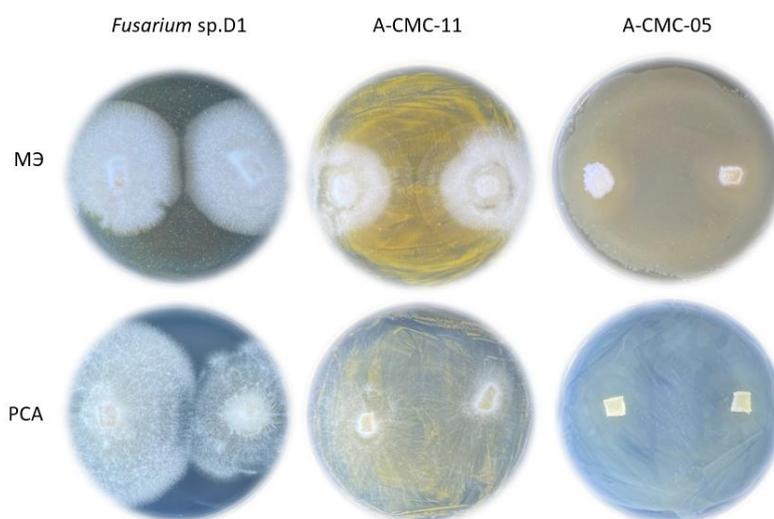


Рисунок 1. Подавление роста *Fusarium* sp. D1 при совместном культивировании со штаммами А-СМС-11 и А-СМС-05 при 28 °С в течении 5 сут. МЭ – мальтозный экстракт, РСА – plate count agar

Помимо исследования потенциала штаммов в качестве агентов биоконтроля путем оценки их способности ингибировать фитопатогенные грибы, проведен эксперимент по изучению

ростостимулирующих свойств, а именно синтезу биоактивных веществ, способствующих ризогенезу эксплантов барбариса (рис. 2, 3).



Рисунок 2. Экспланты барбариса Тунберга (*Berberis thunbergii* Aurea) в начале эксперимента (А), без признаков ризогенеза (Б) и с корнями (В), образованными в ходе эксперимента

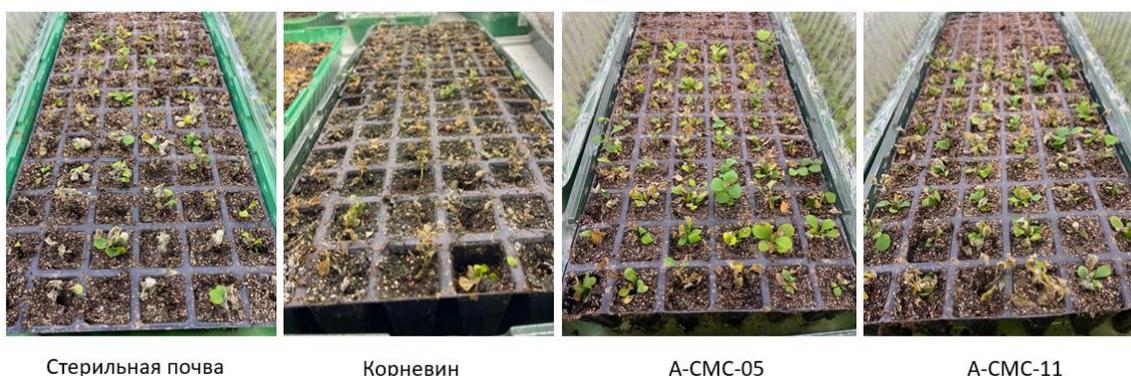


Рисунок 3. Внешний вид эксплантов барбариса Тунберга (*Berberis thunbergii* Aurea) по окончании эксперимента по стимулированию корнеобразования штаммами *Pseudomonas protegens* А-СМС-05 и *Gordonia paraffinivorans* А-СМС-11

В итоге у 8 из 66 эксплантов (12,1 %), высаженных в стерильную почву, обработанную раствором культуральной жидкости штамма А-СМС-05, наблюдали процессы ризогенеза. В эксперименте со штаммом А-СМС-11 образование корней выявлено у 5 эксплантов (7,5 %). В контрольном эксперименте с добавлением коммерческого препарата «Корневин» эффективность ризогенеза составила 15 % (10 эксплантов из 66 образовали корни в ходе эксперимента). Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что штамм А-СМС-05 обладает более выраженными свойствами, способствующими ризогенезу у использованных в качестве объекта исследования растений барбариса и его эффективность в стимулировании ризогенеза сравнима с эффективностью препарата на основе ИУК.

Следует отметить, что штаммы А-СМС-05 и А-СМС-11 не проявляют антагонистической активности в отношении друг друга и могут быть использованы в составе консорциума. Будущие исследования позволят оценить эффективность совместного использования штаммов для стимулирования ризогенеза, ингибирования фитопатогенов и т.д.

Заключение. Проведенные исследования продемонстрировали потенциал штаммов *P. protegens* А-СМС-05 и *G. paraffinivorans* А-СМС-11 в качестве агентов биоконтроля и стимуляторов роста растений. Штамм *P. protegens* А-СМС-05 показал более значимые результаты и является более перспективным агентом для дальнейших исследований ростостимулирующих и биопротекторных свойств.

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке Гранта No 075-15-2022-1152 (Постановление No 619 от 8 апреля 2022 г.).

Библиографический список

1. Sun Z., X. Duan, Y. Xie, et al. Nutrient supplying capacity of typical black soil and fertilizer use efficiency of soybean in Heilongjiang province Chin // *Agric. Sci. Bull.* 2012. V. 28 P. 46–51.
2. Fróna D., Szenderák J., Harangi-Rákos M. The Challenge of Feeding the World // *Sustainability.* 2019. V. 11. P. 5816.
3. Lee J.A., E.S.G. Cheah, S. Sethupathi, N.I.M. Ismail. Isolation and characterization of effective microorganisms from palm oil sludge for enhancement of spent bio-adsorbents from aquaculture wastewater treatment // *Materials Today: Proceedings.* 2023.
4. Герасимчук А.Л. Поиск и выделение липофильных бактерий для утилизации отходов производства пальмового масла / Герасимчук А.Л., Ивасенко Д.А., Трифионов А.А., Топилина Ю.С., Сысоева А.Н., Франк Ю.А. // *Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (25 сентября 2023, Москва).* 2023. Вып. 21. С. 112–113.
5. Демьянцева Е.Ю., Копнина Р.А. Ферментативный катализ в цдп: учебно - методическое пособие/СПбГТУРП. СПб., 2014. С. 1–47.
6. Whipps J.M. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi // *J New phytol.* 1987. V. 107(1). P. 127–142.
7. Afonso L., B. Gionco-Cano, A.S. Simionato, E.T.G. Niekawa, G.E.A. Pega et al. Chapter 3 - Microbial bioactive compounds in plant disease management / Editor(s): A. Kumar, S. Droby. *Food Security and Plant Disease Management*, Woodhead Publishing, 2021. P. 37–61.
8. Silva N.M., de Oliveira A.M.S.A., Pegorin S., Giusti C.E., Ferrari V.B., Barbosa D. et al. Characterization of novel hydrocarbon-degrading *Gordonia paraffinivorans* and *Gordonia sihwensis* strains isolated from composting // *PLoS ONE.* 2019. V. 14 (4). P. e0215396.
9. Yang Y. The antibiotic metabolites genes of *Pseudomonas fluorescens* // *China Biotechnol.* 2012. V. 32. P. 100–106.
10. Kayasth M., Kumar V., Gera R. *Gordonia* sp.: a salt tolerant bacterial inoculant for growth promotion of pearl millet under saline soil conditions // *3 Biotech.* 2014. V. 4(5). P. 553–557.

СОДЕРЖАНИЕ ГОРМОНОВ В ЭМБРИОГЕННОЙ КУЛЬТУРЕ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ

И.Н. Третьякова, М.Э. Пак, Н.С. Помыткин

*Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН
e-mail: culture@ksc.krasn.ru*

HORMONE CONTENT IN EMBRYOGENIC CULTURE OF SIBERIAN LARCH

I.N. Tretyakova, M.E. Pak, N.S. Pomytkin

*V.N. Sukachev Forest Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
e-mail: culture@ksc.krasn.ru*

Целью работы являлась оценка содержания гормонов: индолилуксусной кислоты (ИУК), цитокининов (зеатин, зеатин рибозид и зеатин нуклеотид) и абсцизовой кислоты (АБК) в клеточных линиях *Larix sibirica* различной длительности культивирования *in vitro*. Экспланты (незрелые зиготические зародыши), полученные от свободного и контролируемого опыления дерева-донора лиственницы сибирской А4, были введены в культуру *in vitro* на питательную среду АИ (патент 2456344; <https://www.freepatent.ru/patents/2456344>).

Данные иммуноферментного анализа пролиферирующих клеточных линий лиственницы сибирской показали, что эмбрионально-суспензорные массы (ЭСМ) содержат большое количество ИУК. Содержание ИУК в эмбриогенных культурах выше в 100 раз по сравнению с эксплантами (23 ± 5 нг/г сухой массы (с. м.)). А содержание цитокининов и АБК значительно ниже по сравнению с эксплантами (521 нг/г с. м. и 270 ± 24 нг/г с. м. соответственно (Tretyakova et al., 2019)). Высокая гормональная активность наблюдалась у клеточных линий лиственницы сибирской, культивируемых в течение 2-х лет. Содержание ИУК составило от 495 ± 43 до 2380 ± 220 нг/г с. м. Общее содержание цитокининов составило от 55 до 167 нг/г с. м. А содержание АБК было низким ($9-24$ нг/г с. м.).

Уровень гормональной активности в длительно пролиферирующих клеточных линиях (11–13 лет) так же было высоким. Содержание ИУК составило от 2969 ± 81 до 3687 ± 165 нг/г с. м. Общая сумма цитокининов составила от 181 до 213 нг/г с. м. Однако, содержание АБК было очень высоким от 301 ± 3 до 970 ± 67 нг/г с. м.

Таким образом, активно пролиферирующие клеточные линии лиственницы сибирской характеризуются высоким содержанием ИУК, сниженным содержанием цитокининов и низким содержанием АБК. С увеличением длительности пролиферации в клеточных линиях увеличивается содержание АБК, что приводит к снижению эмбриогенной способности культур.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности в рамках научного проекта № 22-14-20008.

Библиографический список

1. Tretyakova I. N. et al. Content and immunohistochemical localization of hormones during *in vitro* somatic embryogenesis in long-term proliferating *Larix sibirica* cultures // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2019. V. 136. pp. 511-522.

УДК 579.695

БАКТЕРИАЛЬНАЯ КОНВЕРСИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНИТЕЛЯ МЕЛОКСИКАМА

С.М. Тян

Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук (ПФИЦ УрО РАН), г. Пермь, Россия

*Пермский государственный национальный исследовательский университет,
г. Пермь, Россия*

Непрерывное использование нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) приводит к их широкому распространению в природных средах и вызывает негативные изменения в живых организмах на различных уровнях – от молекулярного до экосистемного. В связи с растущим интересом к биотехнологическим решениям в мировой биоэкономике, стрессоустойчивые актиномицеты (класс *Actinomycetes*) приобретают важное значение для решения проблемы фармацевтического загрязнения окружающей среды. Нами отобран штамм *Gordonia alkanivorans* ИЭГМ 1277, способный к биоконверсии мелоксикама, одного из наиболее часто обнаруживаемого НПВС в открытых экосистемах, с образованием гидроксиметил- и карбоксимелоксикама в сточных водах фармацевтического производства. Экспериментально обосновано, что метаболиты мелоксикама не токсичны в отношении позвоночных животных и тестовых бактериальных культур. С использованием высокочувствительных методов микро- и спектроскопии (АСМ, ПЭМ, ЭДС) установлено, что клетки гординий претерпевают выраженные адаптивные изменения – от модификации морфометрических характеристик (длина, ширина, объем и др.) и синтеза биосурфактантов до накопления внутриклеточных липидов и полифосфатов. Осуществлено полногеномное секвенирование штамма *G. alkanivorans* ИЭГМ 1277 для создания Каталога генов, кодирующих ферменты окисления мелоксикама.

Ключевые слова: актиномицеты, *Gordonia*, биоконверсия, фармполлутанты, мелоксикам, метаболиты

BACTERIAL CONVERSION OF THE PHARMACEUTICAL CONTAMINANT MELOXICAM

S.M. Tyan

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences –
Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences,
Perm, Russia*

Perm State National Research University, Perm, Russia

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are extensively used in natural habitats as a result of ongoing use, which negatively affects living things at many levels, from the molecular to the ecological. Stress-tolerant actinomycetes (class *Actinomycetes*) are increasingly relevant to address the issue of pharmaceutical environmental pollution as interest in biotechnology solutions in the global bioeconomy grows. We chose the strain of *Gordonia alkanivorans* IEGM 1277, which is able to bioconvert meloxicam, one of the most often found NSAIDs in open ecosystems, to hydroxymethyl- and carboxymeloxicam in wastewater from pharmaceutical manufacturing. Meloxicam metabolites have not been shown to be harmful to test bacterial cultures or vertebrates in experiments. It was determined that gordonium cells undergo marked adaptive changes using extremely sensitive micro- and spectroscopy

techniques (AFM, TEM-EDX). These changes ranged from the synthesis of biosurfactants and modification of morphometric properties (length, width, volume, etc.) to the accumulation of intracellular lipids and polyphosphates. The actinomycete *G. alkanivorans* IEGM 1277 underwent whole genome sequencing in order to provide a Catalog of genes encoding meloxicam oxidation enzymes.

Keywords: actinomycetes, *Gordonia*, bioconversion, pharmpollutants, meloxicam, metabolites

Введение.

Фармацевтическое загрязнение окружающей среды обуславливает появление новых и более опасных рисков для здоровья человека и состояния природы. На сегодняшний день в водных объектах 104 странах мира обнаружено более 1000 лекарственных химикатов на уровне пико-, нано- и микрограммов в почвах, водных экосистемах и даже в бутилированной питьевой воде. В природных средах наиболее часто обнаруживаются нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) [15]. Среди них особенно выделяется безрецептурный и широко применяемый в медицинской практике мелоксикам [7]. В литературе описано существенное неблагоприятное давление этого НПВС – от изменений в работе половой системы до нарушений в генетических конструкциях – на живые объекты практически всех уровней биологической организации [6, 12, 13].

Мелоксикам (Амелотекс®, Энтелокс®) является селективным ингибитором циклооксигеназы-2, обладает противовоспалительным, анальгезирующим и антипиретическим действиями [12]. Коэффициент распределения *n*-октанол-вода (3,43) указывает на липофильность мелоксикама, что свидетельствует о его способности адсорбироваться в почве, проникать через биологические мембраны и накапливаться в живых организмах, особенно в гидробиоте [4].

Основными источниками медикаментозного загрязнения природной окружающей среды являются интенсивное развитие фармацевтики, появление на рынке всё новых лекарственных препаратов, неполное удаление фармпрепаратов и их метаболитов в процессе очистки сточных вод, несовершенство способов утилизации фармотходов [15]. В связи с этим чрезвычайно актуальны разработка и внедрение альтернативных рентабельных стратегий очистки промышленных стоков, основанных на использовании ферментативной активности микроорганизмов.

Среди эколого-трофических групп бактерий, часто выявляемых в местах загрязнения и применяемых в биоремедиации, выделяются представители класса *Actinomycetes* (семейства *Nocardiaceae*). Доминирование в микробных сообществах загрязненных биотопов, метаболическая универсальность, способность разлагать широкий спектр устойчивых экотоксикантов в экстремальных условиях среды дают основание рассматривать актиномицетов в качестве идеальных агентов биоокисления фармацевтических загрязнителей [10, 14].

Материалы и методы.

Объектом исследования служил штамм актиномицета *Gordonia alkanivorans* ИЭГМ 1277 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, УНУ/ЦКП 73559/480868, номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур, <http://www.iegmcoll.ru>), отобранный в результате проведенного нами скрининга коллекционных культур на способность разлагать мелоксикам [3, 5].

В экспериментах по биодеградации применяли мелоксикамсодержащую сточную воду, полученную из цеха по производству таблеток мелоксикама Пермской фармкомпании «Медисорб» и разведенную фосфатно-щелочным буфером до исходной концентрации мелоксикама (10 мг/л). Для закрепления клеток в матрицу поливинилового спирта (ПВС) гординии предварительно выращивали в течение 72 ч при температуре 28°C в минеральной

среде в присутствии 3 об. % *n*-гексадекана (в качестве дополнительного источника углерода и энергии).

Бактериальную суспензию (ОП₆₀₀ 1,6) смешивали со стерильным раствором ПВС (12%) в соотношении 1:2 v/v [11]. Качественный контроль остаточного содержания мелоксикама в отходах (смывах с производственного оборудования) проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе *n*-гексан: этилацетат : ледяная уксусная кислота в соотношении 65:30:5 по объему. Детекцию химических соединений проводили обработкой хроматографических пластинок 15%-ной H₂SO₄, нагреванием при температуре 100–120°C в течение 2–3 мин и визуализацией при $\lambda = 365$ нм. Идентификацию полученных метаболитов проводили с помощью жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ/МС) [1].

Экотоксичность мелоксикама и продуктов его бактериальной декомпозиции рассчитывали с помощью компьютеризированной системы ECOSAR Ver. 1.11 (US EPA). Оценку биологического потенциала производных мелоксикама проводили методом двукратных серийных разведений с использованием бактериальных тест-культур (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* NCIMB 196, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas plecoglossicida* ИЭГМ 2044). Острую токсичность метаболитов в отношении белых нелинейных мышей определяли по методу Прозоровского [2].

Влияние мелоксикама на морфологию и рельеф поверхности бактериальных клеток оценивали с использованием атомно-силовой микроскопии (АСМ); ультраструктурные изменения регистрировали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ); картирование биоэлементов выполняли методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией (ЭДС) [8]. NGS-секвенирование ИЭГМ 1277 активного-биодеструктора мелоксикама проводили на базе биотехнологической компании CeGaT GmbH (Тюбинген, Германия) с использованием секвенатора NovaSeq (Illumina, США) и метода сборки генома SPAdes (v. 3.14.1).

Результаты.

По нашим данным, клетки *G. alkanivorans* ИЭГМ 1277, иммобилизованные в криогеле ПВС, трансформируют 93,75% исходного (10 мг/л) количества мелоксикама, присутствующего в сточных водах фармацевтического предприятия, в течение 7 сут.

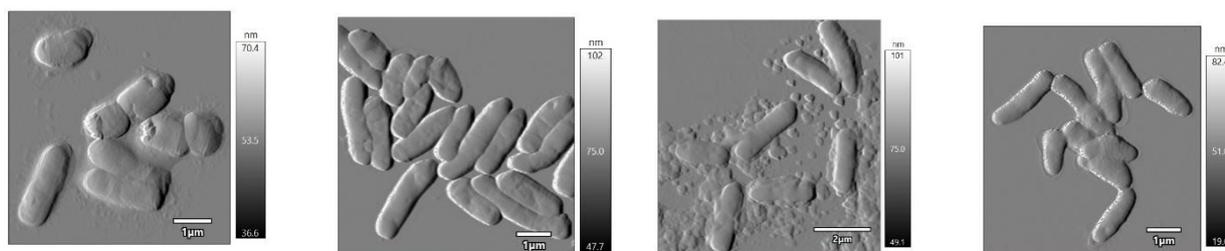
В то же время для достижения аналогичной степени биодеградации свободным клеткам требуется вдвое больший временной интервал – 14 сут. Процесс стабильной биоконверсии мелоксикама с использованием иммобилизованных гордоний регистрировали на протяжении 4-х циклов (1 цикл соответствует 1 нед использования) применения. В посткультуральной среде гордоний обнаружены молекулярные ионы с массами 368 и 382, принадлежащие протонированным метаболитам мелоксикама – гидроксиметил- и карбоксимелоксикам соответственно.

Показано, что процесс бактериальной деструкции мелоксикама сопровождается образованием метаболитов, характеризующихся сниженной токсичностью по сравнению с исходным соединением. По результатам проведенного прогнозного анализа, выполненного с применением программного обеспечения ECOSAR, мелоксикам относится ко II классу опасности по хронической токсичности для гидробионтов (дафний и зеленых водорослей), в то время как продукты его метаболизации проявляют менее выраженные токсические свойства, соответствующие III и IV классам опасности.

Установлено, что производные мелоксикама не ингибируют рост бактериальных тест-культур (МПК > 1 г/л) и, следовательно, попадание метаболитов в окружающую среду, по видимому, не будет иметь деструктивный характер.

В соответствии с ГОСТ 32419-2022 метаболиты мелоксикама относятся к III классу опасности, являются умеренно токсичными в отношении лабораторных животных (ЛД₅₀ > 200 мг/кг).

По данным АСМ (табл. 1, рис. 1), под действием мелоксикама на 7 сут эксперимента документировали достоверное повышение коэффициентов соотношения площади бактериальной клетки к её объему (S/V), что способствует более эффективному контакту бактериальных клеток с экотоксикантом. Этому также способствует выявленное образование внеклеточной жидкости, которая, по-видимому, представляет собой биосурфактант или смесь биосурфактанта с мелоксикамом.



А Б В Г

Рисунок 1 – АСМ-изображения клеток *Gordonia alkanivorans* ИЭГМ 1277: в присутствии 0,1 об. % *n*-гексадекана (биотический контроль) на 7 (А) и 14 (Б) сут; в присутствии 0,1 об. % *n*-гексадекана и 10 мг/л мелоксикама на 7 (В) и 14 (Г) сут.

Как известно [9], синтез биосурфактантов способствует увеличению площади контакта актиномицетов с гидрофобным субстратом и повышению его биодоступности. Обратная картина наблюдалась на 14 сут эксперимента, что связано с истощением мелоксикама из среды и накоплением метаболитов. Характерной особенностью гордоний в присутствии мелоксикама явилось увеличение показателя среднеквадратичной степени шероховатости клеточной поверхности.

Таблица 1

Морфометрические изменения клеток *G. alkanivorans* ИЭГМ 1277 под действием мелоксикама (10 мг/л)

Характеристика	7 сут		14 сут	
	Биотический контроль	Мелоксикам	Биотический контроль	Мелоксикам
Длина, мкм	1,83±0,530	1,79±0,280	1,65±0,490	1,60±0,350
Ширина, мкм	0,61±0,090	0,59±0,030	0,83±0,120	0,59±0,040
Площадь (S), мкм ²	37,00±4,400	53,50±3,100	39,70±3,500	14,50±1,400
Объем (V), мкм ³	1,36±0,011	1,23±0,002	1,72±0,015	1,21±0,003
S/V , мкм ⁻¹	27,07±2,700	43,49±2,120	22,69±2,290	12,24±1,160
Шероховатость, мкм	0,12±0,064	0,24±0,067	0,12±0,062	0,16±0,087

Согласно полученным результатам, воздействие мелоксикама на клетки ИЭГМ 1277 сопровождается снижением пулов фосфора, серы и ряда других элементов (табл. 2), что свидетельствует о проявлении цитотоксического эффекта и нарушении целостности клеточных мембран.

Повышенное содержание меди в клетках, по-видимому, связано с активностью металлозависимых ферментов, катализирующих реакции окисления фармацевтического поллютанта, и может рассматриваться как адаптивный ответ гордоний на воздействие токсиканта.

Таблица 2

Суммарный спектр биоэлементов клеток *G. alkanivorans* ИЭГМ 1277 в присутствии мелоксикама (10 мг/л)

Название спектра	C	O	Na	Mg	Si	P	S	Cl	K	Ca	Cu
Биотический контроль	69,55	8,49	5,6	0,55	0,68	1,78	0,34	4,79	1,94	0,79	5,43
Клетки в присутствии мелоксикама	81,78	6,02	0,43	0,12	0,65	0,48	0,12	0,01	0,8	0,24	9,3

Сравнительный анализ ультратонких срезов выявил накопление липидов в бактериальных клетках, о чем свидетельствует присутствие электронно-прозрачных включений (рис. 2 Б). Кроме того, зафиксировано накопление полифосфатов в виде электронно-непрозрачных включений (рис. 2 Б).

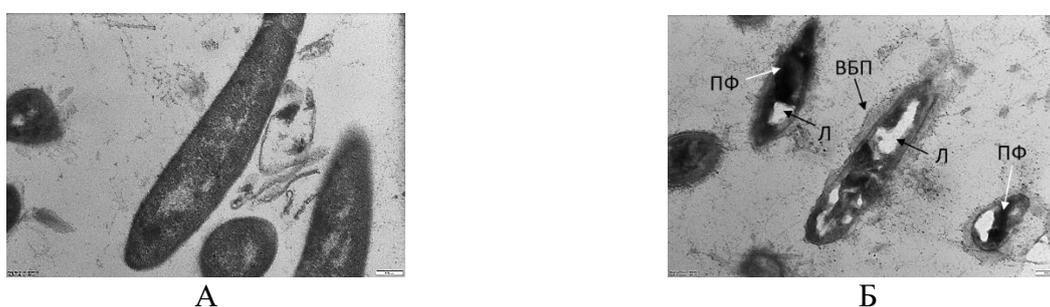


Рисунок 2. ПЭМ-изображения клеток *Gordonia alkanivorans* ИЭГМ 1277

А – в присутствии 0,1 об. % *n*-гексадекана (биотический контроль); Б – в присутствии 0,1 об. % *n*-гексадекана и 10 мг/л мелоксикама. ВБП, внеклеточные биополимер; Л, липидные включения; ПФ, включения полифосфатов.

Полногеномная последовательность штамма ИЭГМ 1277 доступна в базах данных DDBJ/ENA/GenBank под номерами JASIRQ010000001-JASIRQ010000143. Согласно NCBI, размер генома ИЭГМ 1277 составляет 5,1 Мб, а содержание GC находится на уровне 67,5%. Распределение генов с известной и неизвестной последовательностью составляло 20:80 соответственно. Методом геномного майнинга обнаружены генные кластеры синтеза P450-зависимых монооксигеназ, которые, вероятно, отвечают за начальное окисление молекулы мелоксикама.

Заключение.

Показано, что клетки *Gordonia alkanivorans* ИЭГМ 1277, иммобилизованные в криогеле ПВС, способны к эффективной биоконверсии (более 93%) мелоксикама в сточных водах фармацевтического предприятия в течение 7 сут. В настоящее время ведется работа по снижению продолжительности периода декомпозиции целевого НПВС. В результате проведенных исследований определены первичные метаболиты мелоксикама (гидроксиметил- и карбоксимелоксикам), образующиеся в процессе его бактериальной трансформации. Полученные соединения не токсичны в отношении позвоночных животных и тест-бактериальных культур. Установлено, что присутствие мелоксикама индуцирует морфометрические и ультраструктурные изменения бактериальных клеток. Полученные сведения рассматриваются как адаптационные механизмы, реализуемые гордониями в присутствии мелоксикама, и как стратегия повышения их устойчивости к токсическому действию фармполлютанта. С помощью полногеномного секвенирования выявлены основные особенности катаболизма мелоксикама.

Благодарности. Работа выполнена в рамках госзадания 124020500028-4 с использованием оборудования ЦКП «Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов» и «Исследование материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН.

Провсвечивающая электронная микроскопия и энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия проведены на базе ЦКП «Коллекция UNIQEM» Института микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН ФИЦ Биотехнологии РАН (рук. – д.б.н. Мулюкин А.Л.).

Библиографический список

1. Вихарева Е.В., Карпенко Ю.Н., Селянинов А.А., Бажутин Г.А., Тюмина Е.А. Хроматографический анализ мелоксикама и его метаболитов в процессе бактериальной деструкции // Известия Академии наук. Серия химическая. 2022. № 11. С. 2358–2364.
2. Прозоровский В.Б., Прозоровская М.П., Демченко В.М. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки // Фармакология и токсикология. 1978. № 41. С. 497–502.
3. Тянь С.М., Тюмина Е.А. Скрининг актинобактериальных штаммов – биодеструкторов мелоксикама. Микробиология: вчера, сегодня, завтра [Электронный ресурс]: тез. докл. Международной научной конференции, посвященной 100-летию основания кафедры микробиологии в Казанском университете, 20–21 декабря 2021 г., Казань: Изд-во Казанского университета, 2021. 77 с.
4. aus der Beek T., Weber F.A., Bergmann A., Hickmann S., Ebert I., Küster A.H.A. Pharmaceuticals in the environment. Global occurrences and perspectives // Environmental Toxicology and Chemistry. 2016. Vol. 35. P. 823–835.
5. Bazhutina G.A., Tymina E.A., Subbotina M.V., Tyun S.M. Biotransformation of ibuprofen and meloxicam by *Rhodococcus cerastii* IEGM 1243 and *Gordonia amicalis* IEGM 1277 cells. Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Химия. Экология. Урбанистика” (28–29 апреля 2022 г.). Пермь: Издательство Пермского национального исследовательского политехнического университета. 2022. Т. 2. С. 199–202.
6. da Silva J.C., Bigolin C., da Silva L.C., Saraiva T.E.S., Menezes J.M., Veiverberg A., Charão M.F., Betti A.H. Neurotoxicity evaluation of meloxicam in the alternative *in vivo* model, *Caenorhabditis elegans* // International Journal for Innovation Education and Research. 2020. Vol. 8. P. 319–325.
7. Herrero-Villar M., Velarde R., Camarero P.R., Taggart M.A., Bandeira V., Fonseca C., Marco I., Mateo R. NSAIDs detected in Iberian avian scavengers and carrion after diclofenac registration for veterinary use in Spain // Environmental Pollution. 2020. Vol. 266. P. 269–278.
8. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Litvinenko L.V., Golyshcheva A.A., Kostrikina N.A., Sorokind V.V., Mulyukin A.L. Bioaccumulation of molybdate ions by alkanotrophic *Rhodococcus* leads to significant alterations in cellular ultrastructure and physiology // Environmental Pollution. 2024. Vol. 274. Article 116190.
9. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Philp J.C., Christofi N. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 1998. Vol. 14. P. 711–717.
10. Ivshina I.B., Tyumina E.A., Kuzmina M.V., Vikhareva E.V. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346 // Scientific Reports. 2019. Vol. 9. Article 9159.
11. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Gavrin A.Yu., Podorozhko E.A., Lozinsky V.I., Jeffrey C., Philp J. Immobilization of hydrocarbon-oxidizing bacteria in poly (vinyl alcohol) cryogels hydrophobized using a biosurfactant // Journal of Microbiological Methods. 2006. Vol. 65. P. 596–603.
12. McCann N.C., Lynch T.J., Kim S.O., Duffy D.M. The COX-2 inhibitor meloxicam prevents pregnancy when administered as an emergency contraceptive to nonhuman primates // Contraception. 2013. Vol. 88. P. 744–748.
13. Sheikhlangi Z., Gharaei A., Harijani J.M., Davari S.A., Hassanein P., Rahdari A. Toxicological effects of meloxicam on physiological and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*) // Veterinary Medicine and Science. 2023. Vol. 9. P. 2085–2094.
14. Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F., van Sinderen D. Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2007. Vol. 71. P. 495–548.
15. Wilkinson J.L., Thornhill I., Oldenkamp R., Gachanja A., Busquets R. Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment: How can regions at risk be identified in the future? // Environmental Toxicology and Chemistry. 2024. Vol. 43. P. 575–588.

УДК 630*232

ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЯСЕНЯ ОБЫКНОВЕННОГО (*FRAXINUS EXCELSIOR*) *IN VITRO*

Р.В. Усачева

ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии», г. Воронеж, Россия

В настоящей статье приведены результаты культивирования регенерантов ясеня обыкновенного *Fraxinus excelsior*. В работе использовали верхушечные меристемы, побеги и незрелые зародыши со взрослых и молодых деревьев. Подобраны наиболее подходящие среды для асептического введения в культуру *in vitro*. Для изолированных зародышей ясеня обыкновенного рекомендуется питательная агаризованная среда Мурасиге и Скуга половинного состава с регулятором роста БАП (6-бензиламинопурина) в концентрации 3,0 мг/л среды. Для введения в культуру *in vitro* верхушечных меристем наилучшим образом подходит среда Мурасиге и Скуга половинного состава с регулятором роста БАП в концентрации 3,0 мг/л среды и ИМК (индолил-масляной кислоты) 0,1 мг/л. Для успешной регенерации *in vitro* побегов ясеня обыкновенного можно рекомендовать питательную агаризованную среду MS с БАП-4,0 + ИМК-0,1, для стимуляции роста междоузлий подходит среда WPM (Woody Plant Medium), с БАП-4,0 + ИМК-0,1.

Ключевые слова: микрочлониование, *Fraxinus excelsior*, *in vitro*, морфогенез, регенеранты, незрелые зародыши, апикальные меристемы.

Введение

Сохранение генетического разнообразия лесных древесных видов и экосистем является важной задачей современного этапа развития общества. Ясень обыкновенный (*Fraxinus excelsior*) представляет одну из самых ценных лиственных пород европейской части России. Это главная порода в защитных лесных полосах, для мелиоративного и ветрозащитного лесоразведения, а так же, за счет декоративного внешнего вида, в ландшафтном дизайне для озеленения в парках и городских садах. Древесина ясеня обыкновенного не уступает дубу по твердости, богатству текстуры и прочности, а по вязкости даже превосходит его. Ясень имеет богатый химический состав, содержащий эфирные масла, дубильные вещества, горечи, кумарины, камедь, смолы, флавоноиды, фенилпропаноиды и др., поэтому его можно широко применять в медицине [4].

Но в последнее время из-за поражения взрослых деревьев узкотелой ясеневой златкой, возникли трудности в воспроизводстве посадочного материала ясеня. Перспективным способом сохранить и воспроизвести ясень является использование культуры *in vitro*. Микроразмножение побегами и верхушечными меристемами, кроме сохранения ценных свойств отдельных деревьев, обладает также большой производительностью и не зависит от времени года.

Помимо быстрого размножения ценных генотипов, культура открывает возможности для проведения генетических манипуляций [1]. Не менее важным является направление использования эмбриокультуры растений *in vitro*, так как зародыш обладает всеми морфогенетическими потенциями взрослого организма [3], а также сходством морфогенетических реакций растений *in vivo* и эксплантов/регенерантов *in vitro* согласно принципу универсальности морфогенеза растений в естественных и экспериментальных условиях [2, 5].

Но, тем не менее, работ по микроразмножению ясеня относительно немного, поэтому **целью исследования** явилось изучение морфогенетического потенциала незрелых зародышей, верхушечных меристем и побегов ясеня обыкновенного и особенностей введения их в культуру *in vitro*.

Материалы и методы

В качестве исходного материала использовали незрелые зиготические зародыши, апикальные меристемы и верхушечные побеги длиной 2 - 4 см ясеня обыкновенного с деревьев, произрастающих в лесопарковом участке ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех».

Изолированные зародыши культивировали на питательной среде Мурасиге и Скуга (MS) с половинным составом минеральных солей, развитие стимулировали добавлением БАП (6-бензиламинопурина)- в концентрации от 2,0 до 3 мг/л, ИМК (индолил-масляной кислоты) 0,1 мг/л и абсцизовой кислоты (АБК) 6,0 мг/л. Апикальные меристемы вводили в культуру *in vitro* и культивировали на среде MS с половинным составом минеральных солей с добавлением БАП в концентрации от 1,0 до 3,0 мг/л, ИМК от 0,1 до 0,3 мг/л. Экспланты верхушечных побегов ясеня обыкновенного культивировали на питательных средах MS и WPM (Woody Plant Medium), с сахарозой 30 г/л, а также применяли БАП в концентрации 2,0 - 4,0 мг/л и 0,1 мг/л ИМК.

Результаты и обсуждение

На питательной среде MS с половинным составом минеральных солей с добавлением БАП в концентрации от 0,2 до 3 мг/л, достигнувшие в длину 1-3 мм зародыши, далее не созревают путем накопления массы зародыша и увеличения его линейных размеров, а спонтанно начинают прорастать. Так как цитокинины, помимо стимуляции клеточного деления и роста, инициируют дифференциацию клеток и гистогенез (рис. 1).



Рисунок 1. Прорастание незрелых зародышей на среде MS с половинным составом минеральных солей.

На среде MS с половинным составом минеральных солей со стимулированием развития БАП в концентрации от 2,0 до 3 мг/л и ИМК в концентрации 0,1 мг/л происходил как рост самого зародыша, так и его дифференциация (табл. 1). Такой зародыш способен самостоятельно дать начало полноценному растению в адекватных условиях *in vitro* и далее. Это позволяет получать регенеранты напрямую, минуя дополнительный этап формирования морфогенных каллусов

Таблица 1

Регенерация незрелых зародышей *Fraxinus excelsiorin vitro* в зависимости от состава питательных сред

№ варианта опыта	Минеральная основа	Регуляторы роста, мг/л среды	Кол-во проросших зародышей, %
1	MSc половинным составом минеральных солей	БАП-2,0	23
2		БАП-3,0	28
3		БАП-2,0 + ИМК-0,1	18
4		БАП-3,0 + ИМК-0,1	24
5		БАП-2,0 + АБК	14

Прорастание на фоне абсцизовой кислоты (АБК) начиналось на 4 - 5 суток позже, чем в первых двух вариантах, но не подавляло рост самого зародыша. Проростки по длине побега на средах с АБК на 14 – 16 сутки приближались к проросткам в первых двух вариантах. Также были отмечены случаи каллусогенеза.

Из анализа полученных результатов введения апикальных меристем в культуру *invitro* следует, что на среде MS с половинным составом минеральных солей с добавлением БАП в концентрации 2,0 - 3,0 мг/л частота каллусообразования составила 65-73 % (табл. 2).

Таблица 2

Регенерация апикальных меристем *Fraxinus excelsiorin vitro* в зависимости от состава питательных сред

№ варианта опыта	Минеральная основа	Регуляторы роста, мг/л среды	Образование каллуса, %	Морфогенез, %
1	MS с половинным составом минеральных солей	БАП-1,0	42	34
2		БАП-2,0	65	56
3		БАП-3,0	73	59
4		БАП-2,0 + ИМК-0,1	58	54
5		БАП-2,0 + ИМК-0,3	56	48
6		БАП-3,0 + ИМК-0,1	63	58
7		БАП-3,0 + ИМК-0,3	59	46

Каллус был плотный, морфогенный, и доля побегов, образовавшихся из каллусной ткани экспланта, была максимальной – 56-59 % (рис. 2 а). Но сами побеги, по сравнению с эксплантами на среде MS с половинным составом минеральных солей с добавлением БАП в концентрации 2,0 - 3,0 мг/л и ИМК 0,1-0,3 мг/л, были менее развиты (рис. 2 б). Увеличение концентрации как БАП, так и ИМК, угнетало развитие побегов из образовавшейся каллусной ткани.



Рисунок 2. Прорастание меристем на среде MS: а – на среде MS с добавлением БАП и ИМК; б – на среде MS с добавлением БАП.

Первичные экспланты верхушечных побегов ясеня обыкновенного вводили на среду MS с БАП с концентрацией 2,0 мг/л. На 8-12-е сутки культивирования у 68,0 % эксплантов начался процесс активизации развития микропобегов. Регенеранты, пересаженные через 3 недели на среду WPM с БАП 4,0 мг/л и ИМК 0,1 мг/л, показали лучшие варианты по длине побегов, а также по длине междоузлий (рис. 3).

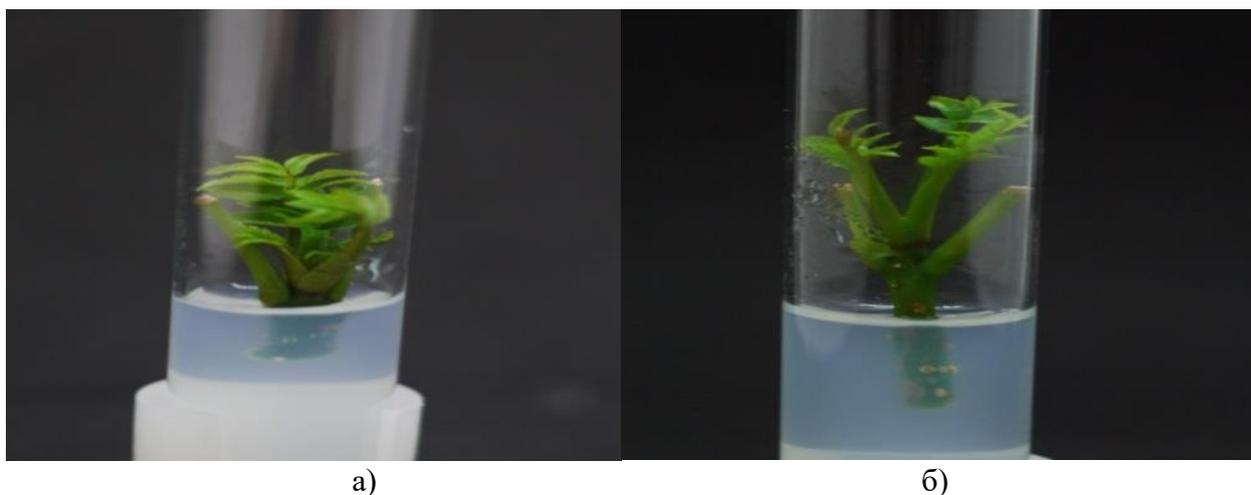


Рисунок 3. Регенеранты, культивируемые на средах: а) MS, с добавлением БАП в концентрации 4,0 мг/л; б) WPM с БАП 4,0 мг/л и ИМК 0,1.

Но коэффициент размножения здесь был ниже, чем в варианте со средой MS с добавлением БАП в концентрации 4,0 мг/л и ИМК 0,1 мг/л, и составил 3,6 – для побегов, взятых с молодых деревьев, и 2,4 – с взрослых деревьев (табл. 3).

Лучшее стимулирующее влияние на регенерацию побегов показала среда MS с концентрацией БАП 4,0 мг/л и ИМК с концентрацией 0,1 мг/л. Коэффициент размножения здесь был 4,8 - для побегов, взятых с молодых деревьев, и 2,9 – со взрослых. Добавление ИМК в среду MS существенно повлияло на длину междоузлий.

Укоренение побегов осуществляли на среде MS с добавлением нафтилуксусной кислоты. Существенного влияния культуральной среды для размножения эксплантов на последующее укоренение обнаружено не было. Эффективность ризогенеза составила 58 %.

Таблица 3.

Регенерация эксплантов побегов *Fraxinus excelsior* *in vitro* в зависимости от состава питательных сред

Минеральная основа	Регуляторы роста, мг/л	Коэффициент размножения	Длина междоузлий, мм
Побеги с молодых деревьев			
MS	БАП – 4,0	4,2	5,8
MS	БАП – 4,0+ ИМК – 0,1	4,8	7,5
WPM	БАП – 4,0	3,6	9,8
WPM	БАП – 4,0+ ИМК – 0,1	3,3	10,2
Побеги со взрослых деревьев			
MS	БАП – 4,0	2,6	5,4
MS	БАП – 4,0+ ИМК – 0,1	2,9	6,5
WPM	БАП – 4,0	2,4	9,4
WPM	БАП – 4,0+ ИМК – 0,1	2,3	9,6

Выводы

Изучены разные варианты биотехнологических приемов клонального микроразмножения *Fraxinus excelsior*, основанные на различном составе питательных сред и концентрации регуляторов роста в среде. Наиболее подходящей средой для индукции развития незрелых зародышей является вариант со средой MS с половинным составом минеральных солей с регулятором роста БАП в концентрации 3,0 мг/л.

Наилучшие результаты для культивирования верхушечных меристем показала среда MS с половинным составом минеральных солей с концентрацией БАП 3,0 мг/л, и БАП-3,0 + ИМК-0,1 мг/л. На регенерацию верхушечных побегов наибольшее влияние оказала среда MS с БАП-4,0 + ИМК-0,1, для стимуляции роста междоузлий подходит среда WPM с БАП-4,0 + ИМК-0,1.

Библиографический список

1. Браткова Л.Г. Введение в культуру *in vitro* меристемных эксплантов яблони разного генетического происхождения/ Л.Г. Браткова, Н.Н. Цаценко// Сельскохозяйственный журнал. – 2020. - № 1(13). – С.12 – 15.
2. Зинатуллина А.Е. Структурные особенности клеток эксплантов *in vitro* и формированиеморфогенных каллусов //Биомика. - 2021. – Т.13. - № 5. - С. 8 – 19.
3. Круглова Н.Н. Культура *in vitro* автономных зародышей, как модельная система для исследования стресс-устойчивости растений к абиотическим факторам // Н.Н.Круглова, А.Е. Зинатуллина и др. // Успехи современной биологии. - 2021. - Т. 141(5). - С.483-495.
4. Лебедев В.Г. Эффективный способ получения посадочного материала ясеня обыкновенного *in vitro* / В.Г. Лебедев, М.М. Шемякина, К.А. Шестибратов и др. // Лесной вестник. – 2010. - № 3. – С. 112 – 118.
5. Фирсова М.В. Особенности введения в культуру *in vitro* боярышника перстонарезанного / М.В. Фирсова, А.Ю. Набиева // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2014. - № 1 (111). – С. 58 – 62.

УДК 576.535.2: 581.144.3: 631.8

ВЛИЯНИЕ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *VISCHERIA PUNCTATA* И *SCENEDESMUS SP.* НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ГОРОХА ПОСЕВНОГО

А.В. Фунтикова, Т.А. Кузнецова

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
Санкт-Петербург, РФ*

Культивирование микроводорослей проводили в лабораторном биореакторе до фазы замедленного роста в течение шести суток. Концентрация клеток *Scenedesmus sp.* в суспензии достигала $57,5 \times 10^6$ клеток на мл, в *Vischeria punctata* – $41,4 \times 10^6$ клеток на мл. Для полива суспензию микроводорослей разбавляли водой до концентрации $5,1 \times 10^6$ клеток на мл суспензии. При проращивании семян гороха посевного сорта 'МАДРАС' на почвогрунте в лабораторных условиях было определено увеличение всхожести семян при поливе суспензией *Vischeria punctata* на 15,0%, при поливе суспензией *Scenedesmus sp.* на 16,7%. Полив суспензией микроводорослей оказывает стимулирующий эффект на рост побегов, способствует увеличению числа междоузлий побега. Полученная суммарная биомассы в варианте с применением *Vischeria punctata* превышала контроль на 41,0%, с применением *Scenedesmus sp.* на 55,3%. Таким образом, полив суспензией микроводорослей *Vischeria punctata* и *Scenedesmus sp.* в концентрации $5,1 \times 10^6$ клеток на мл, способствует повышению продуктивности гороха посевного.

Ключевые слова: альголизация почв, микроводоросли, *Vischeria punctata*, *Scenedesmus sp.*, *Pisum sativum*.

INFLUENCE OF MICROALGAE *VISCHERIA PUNCTATA* AND *SCENEDESMUS SP.* FOR THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF PEAS

A.V. Funtikova, T.A. Kuznetsova

*Peter the Great St.Petersburg Polytechnic University,
St. Petersburg, Russian Federation*

Cultivation of microalgae was carried out in a laboratory bioreactor until the slow growth phase for six days. Cell concentration of *Scenedesmus sp.* in suspension reached 57.5×10^6 cells per ml, in *Vischeria punctata* – 41×10^6 cells per ml. When germinating pea seeds of the 'MADRAS' variety on soil under laboratory conditions, an increase in seed germination when irrigated with a suspension of *Vischeria punctata* was determined by 15.0%, when irrigated with a suspension of *Scenedesmus sp.* by 16.7%. Watering with a suspension of microalgae has a stimulating effect on shoot growth and helps to increase the number of shoot internodes. The resulting total biomass in the variant with the use of *Vischeria punctata* exceeded the control by 41.0%, with the use of *Scenedesmus sp.* by 55.3%. Thus, irrigation with a suspension of microalgae *Vischeria punctata* and *Scenedesmus sp.* in a concentration of 5.1 million cells. per ml, helps to increase the productivity of peas.

Keywords: soil algolization, microalgae, *Vischeria punctata*, *Scenedesmus sp.*, *Pisum sativum*.

Введение.

В настоящее время актуальной проблемой остается обеспечение продовольственной безопасности населения. Одним из путей повышения плодородия почв связывают с ее альголизацией. Микроводоросли улучшают физико-химические показатели почвы,

способствуют накоплению органических веществ в ней, стимулируют микробиологическую активность [1]. Водорослевая биомасса обогащает почву азотом, фосфором, калием, йодом и значительным количеством микроэлементов [1, 2]. Микроводоросли вырабатывают значительное количество биологически активных соединений, которые могут быть использованы как регуляторы роста растений. К ним относятся фенольные и индольные соединения, стероиды, гиббереллиноподобные вещества, а также соединения с цитокининовой активностью [1, 3, 4]. Особенно интенсивное образование биологически активных соединений происходит на начальных этапах нарастания биомассы микроводорослей при их культивировании [3].

Актуальными вопросами сельскохозяйственной биотехнологии являются поиск наиболее продуктивных штаммов микроводорослей, разработка способов их культивирования, поиск технологий применения полученной биомассы микроводорослей для повышения продуктивности сельскохозяйственных культур. Для альголизации почвы чаще всего применяют зеленые микроводоросли из родов хлорелла (*Chlorella*) [4, 5], сценедесмус (*Scenedesmus*) [4, 5, 6], а также способные к фиксации атмосферного азота нетоксичные цианобактерии [2].

Ростостимулирующий эффект описан при замачивании семян огурца [6,7], зерновых [8, 9] и зернобобовых культур в суспензии микроводорослей [4]. При этом увеличивается энергия прорастания и всхожесть семян. Повышение всхожести семян огурца, кресс-салата было достигнуто в опытах с применением суспензии микроводорослей, после ферментативного гидролиза для замачивания семян [6]. Положительный эффект на продуктивность озимой пшеницы описан в опыте с применением культуральной жидкости микроводорослей для полива растений в различные фазы вегетации [8].

Vischeria punctata – почвенная микроводоросль [10], штаммы ее мало изучены. Она способна интенсивно расти в стрессовых условиях [11]. Содержание в биомассе *Vischeria punctata* ценных компонентов [11] делает ее перспективным объектом для промышленного культивирования и использования в сельском хозяйстве [12]. Настоящее исследование направлено на изучение влияния разбавленной водой суспензии микроводорослей *Scenedesmus sp.* и *Vischeria punctata* на рост гороха посевного сорта ‘МАДРАС’ на почвогрунте в лабораторных условиях. *Pisum sativum* является важнейшей сельскохозяйственной культурой, широко используемой в пищевой и кормовой промышленности.

Материалы и методы.

Образцы микроводорослей *Scenedesmus sp.* (штамм IPPAS С-44) и *Vischeria punctata* (штамм IPPAS Н-242) были получены из коллекции водорослей Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта. Маркировка Коллекции микроводорослей и цианобактерий IPPAS Н-242 (ИФР им. К.А. Тимирязева РАН) [12]. Маточную культуру хранили в холодильнике при температуре от 4 до 6 °С.

Культивирование микроводорослей проводили в лабораторном биореакторе на 500 мл. Для наращивания биомассы использовали рекомендованные в литературе питательные среды: среда Болда – *Vischeria punctata* [12], среда Тамия – *Scenedesmus sp.* [10]. Культивирование полупериодическое, после отбора аликвоты (10 мл) каждые сутки для определения концентрации клеток в суспензии добавляли питательную среду до 500 мл. Температура культивирования находилась в диапазоне от 18 до 20 °С. Перемешивание суспензии осуществлялось барботированием воздухом с помощью компрессора с регулятором SERA AIR 550R, пропускающего до 1,5 л воздуха в час. Освещение осуществлялось с помощью светодиодных ламп дневного света (ФАР), в режиме день – 16 часов, ночь – 8 часов. Интенсивность освещенности – 22 кЛк.

В качестве объекта исследования были выбраны семена гороха посевного сорта ‘МАДРАС’, урожай 2023 года (июль). Масса 1000 штук семян – 227,79 г.

Посев семян осуществляли в контейнеры для проращивания по 25 семян в каждый на расстоянии 2 см друг от друга, глубина посева – 1 см, использовали почвогрунт Terra Vita. Выращивание осуществляли 11 суток при освещенности 12 кЛк, температуре от 17 до 22 °С. Режим освещенности: световой день – 8 часов, ночь – 16 часов до стадии полегания.

Суспензию микроводорослей, полученную при культивировании до стадии замедленного роста, разбавляли водопроводной водой до концентрации $5,1 \times 10^6$ клеток на мл суспензии. Полив осуществляли один раз (по 60 мл на контейнер) за 48 часов. Контрольный вариант поливали водой, первый вариант – суспензией *Vischeria punctata*, второй вариант – суспензией *Scenedesmus sp.* Каждый вариант включал три контейнера (в сумме 75 семян на вариант). Определяли число проросших семян, производили измерение длины побега, подсчитывали количество сформированных междоузлий.

Результаты и обсуждение.

1. Получение суспензии микроводорослей.

Культивирование микроводорослей осуществляли до фазы замедленного роста, в течение 6 суток. Популяция *Scenedesmus sp.* достигает концентрации $57,5 \times 10^6$ клеток на мл, популяция *Vischeria punctata* – $41,4 \times 10^6$ клеток на мл.

Кривая культивирования *Scenedesmus sp.* отличалась выраженной лаг-фазой, которая длилась в течение суток. Фаза экспоненциального роста продолжалась до пятых суток культивирования, далее отмечали фазу замедленного роста. Кривая культивирования *Vischeria punctata* отличается невыраженной лаг-фазой, экспоненциальная фаза роста длилась до 5-6 суток культивирования. Популяция *Scenedesmus sp.* отличается более интенсивными темпами роста в фазу экспоненциального роста в отличие от *Vischeria punctata*. Таким образом, была получена суспензия микроводоросли, которая использовалась для дальнейшей работы.

2. Влияние суспензии микроводоросли *Vischeria punctata* и *Scenedesmus sp.* на рост и развитие гороха посевного.

Суспензия микроводорослей в высокой концентрации (более $41,0 \times 10^6$ клеток на мл) обладает некоторым ингибирующим эффектом на проращивание семян гороха, поэтому суспензию микроводоросли *Vischeria punctata* мы разбавляли водопроводной водой до концентрации $5,1 \times 10^6$ клеток на мл.

На одиннадцатые сутки роста гороха посевного наблюдалось прикорневое полегание растений, которое характеризуется изгибом растения у основания корня. Активное полегание может снизить эффективность фотосинтеза и затруднить доступ света к междоузльям, повысить вероятность поражения патогенной средой.

Полив суспензией микроводорослей способствует увеличению всхожести семян (табл. 1). Увеличение доли проросших семян происходит до 11 суток выращивания гороха посевного и в вариантах с поливом суспензией микроводорослей превышала контроль на 15,0% (*Vischeria punctata*) и 16,7% (*Scenedesmus sp.*).

Таблица 1

Влияние суспензии микроводорослей *Vischeria punctata* и *Scenedesmus sp.* на проращивание семян гороха посевного (%)

Сутки проращивания	Контроль	<i>Vischeria punctata</i>	<i>Scenedesmus sp.</i>
1	37,3±2,6	61,3±4,3	56,0±3,9
4	65,3±4,6	85,3±5,9	89,3±6,3
6	69,3±4,9	88,0±6,2	90,7±6,3
8	76,0±5,3	92,0±6,4	90,7±6,4
11	80,0±5,6	92,0±6,4	93,3±6,5

Максимальные значения доли проросших семян (92,0±6,4%) достигаются в варианте с внесением *Vischeria punctata* на восьмые сутки проращивания, а в варианте с *Scenedesmus sp.*

(93,33±6,53%) на одиннадцатые сутки. В контрольном варианте возрастание доли проросших семян идет до одиннадцатых суток и достигает 80,0±5,6%.

Анализ особенностей роста и развития побегов гороха посевного включал измерение длины побега, подсчет количества сформированных междоузлий. В течение всего периода проращивания гороха посевного наблюдается нарастание разницы между длиной побега в вариантах: применение суспензии микроводорослей для полива способствует увеличению длины побега (табл. 2). К восьмым суткам прорастания различия достоверные, в варианте с применением *Vischeria punctata* длина побегов больше, чем в контроле на 30,3%, с применением *Scenedesmus sp.* на 30,2%.

Таблица 2

Влияние суспензии микроводорослей *Vischeria punctata* и *Scenedesmus sp.* на формирование проростков гороха посевного

Сутки прорастания	Количество междоузлий, шт.			Длина побега, см		
	Контроль	<i>V. punctata</i>	<i>Scenedesmus</i>	Контроль	<i>V. punctata</i>	<i>Scenedesmus</i>
1	1,04±0,21	1,11±0,01	1,0±0,02	2,43±0,32	2,71±0,261	2,88±0,25
4	2,51±0,18	2,55±0,02	2,36±0,17	10,61±0,756	11,04±0,73	10,75±1,05
6	2,27±0,20	3,03±0,13*	2,72±0,15	12,41±1,04	15,60±0,70	15,36±0,80
8	2,42±0,17	3,12±0,13*	2,99±0,11*	14,09±1,07	18,36±0,732*	18,34±0,64*

Примечание: * – достоверные отличия средних по критерию Стьюдента.

Было определено достоверное увеличение количества междоузлий в вариантах с применением для полива суспензии микроводорослей *Vischeria punctata* и *Scenedesmus sp.* (табл. 2). В варианте с поливом суспензией *Vischeria punctata* разница достоверная на шестые, восьмые сутки культивирования, в варианте с поливом суспензией *Scenedesmus sp.* различия достоверные на восьмые сутки культивирования. На междоузлиях формируются листья, в которых в основном и происходит фотосинтез, поэтому количество междоузлий на растениях имеет большое значение для характеристики продуктивности растений.

На одиннадцатые сутки культивирования производили отделение побегов от корней. Побеги взвешивались на аналитических весах непосредственно после отделения. Масса одного растения достоверно выше в вариантах с применением для полива суспензии микроводорослей. В контроле средняя масса побега – 0,529±0,034 г, а в варианте с *Scenedesmus sp.* – 0,704±0,026 г, в варианте с *Vischeria punctata* – 0,648±0,027 г, различия достоверны. Полученная суммарная биомасса в вариантах превышала контроль на 41% в варианте с применением *Vischeria punctata* и на 55,3% в варианте с применением *Scenedesmus sp.*, что подтверждает существенный ростостимулирующий эффект микроводорослей на растения гороха посевного.

Выводы.

Таким образом, суспензия микроводоросли *Vischeria punctata*, также как и *Scenedesmus sp.*, способна оказывать положительный стимулирующий эффект на процент прорастания семян, на длину побегов, количество сформированных междоузлий в них, а также на массу полученных побегов.

Использование *Vischeria punctata* и *Scenedesmus sp.* для повышения продуктивности сельскохозяйственных культур перспективно, если принимать во внимание быстрые темпы роста популяций микроводорослей в лабораторном биореакторе. Разбавление полученной при культивировании биомассы позволяет получить большие объемы суспензии микроводорослей.

Библиографический список

1. Лукьянов, В. А. Прикладные аспекты применения микроводорослей в агроценозе / В. А. Лукьянов, А. И. Стифеев. – Курск: Издательство Курской государственной сельскохозяйственной академии, 2014. – 181с.

2. Alvarez A.L. Microalgae, Soil and Plants: A Critical Review of Microalgae as Renewable Resources for Agriculture / A. L. Alvarez, S. L. Weyers, H. M. Goemann, et al. // *Algal Research*. – 2021. – 54. – Article 102200.
3. Шалыго Н. В. Микроводоросли и цианобактерии как биоудобрение / Н. В. Шалыго // *Наука и инновации*. – 2019. – №. 3 (193). – С. 10-12.
4. Parmar P. Microalgae as next generation plant growth additives: Functions, applications, challenges and circular bioeconomy based solutions / P. Parmar, R. Kumar, Y. Neha and V. Srivatsan // *Front. Plant Sci*. – 2023. – 14:1073546.
5. Применение некоторых видов альгофлоры в растениеводстве / О. В. Сторожева, С. В. Дорохин, О. В. Мячина [и др.] // *Ресурсосберегающие технологии в агропромышленном комплексе России: Материалы IV международной научной конференции, Красноярск, 23–24 ноября 2023 г.* – Красноярск: Красноярский государственный аграрный университет, 2024. – С. 275-278.
6. Navarro-López E. Extraction of phytostimulant molecules from *Scenedesmus almeriensis* using different extractor systems / E. Navarro-López, J. Gallardo-Rodríguez, M. Cerón-García, et al. // *Journal of Applied Phycology*. – 2023. – № 2. – P. 701-711.
7. Вильданова Г.И. Использование суспензии водоросли *Chlorella vulgaris* при выращивании огурца посевным методом гидропоники / Г.И. Вильданова и др. // *Вестник Башкирского государственного педагогического университета им. М. Акмуллы*. – 2020. – №. S1 (54). – С. 20–24.
8. Лукьянов В. А. Рост и развитие озимой пшеницы с применением культуральной среды от микроводорослей / В. А. Лукьянов, С. Ю. Горбунова, А. И. Стифеев // *Инновации в АПК: проблемы и перспективы*. – 2018. – № 3(19). – С. 98-104.
9. Макарова Е. И. Прикладные аспекты применения микроводорослей-обитателей водных экосистем / Е.И. Макарова, И.П. Отурина, А.П. Сидякин // *Экосистемы*. – 2009. – №. 1 (20). – С. 120-133.
10. CCAU 887/3 *Vischeria punctata* // Culture Collection of Algae and Protozoa [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ccau.ac.uk/catalogue/strain-887-3> (Дата обращения: 07.03.2024)
11. Babich, O. Study of the Polysaccharide Production by the Microalga *Vischeria punctata* in Relation to Cultivation Conditions / O. Babich, E. Budenkova, E. Kashirskikh, et al. // *Life*. – 2022. – 12. – 1614.
12. Коллекция микроводорослей и цианобактерий IPPAS ИФР РАН (УНУ КМЦ IPPAS ИФР РАН) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://ippras.ru/nauka/unikalnye-nauchnye-ustanovki-unu-kollektsii/kollektsiya-mikrovodorosley-i-tsianobakteriy-ippas-ifr-ran-unu-kmts-ippas-ifr-ran/> (Дата обращения: 07.03.2024).

УДК 630*232.12

ПРОМЫШЛЕННОЕ ВЫРАЩИВАНИЕ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ОТСЕЛЕКТИРОВАННЫХ ТОПОЛЕЙ В УСЛОВИЯХ ЦЧР

В.А. Царев¹, А.А. Сергеев², А.П. Царев¹, Р.П. Царева¹, Е.Н. Милигула¹

¹ФГБУ “Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии”, г. Воронеж, Россия

²ГАУ “Куликовский лесхоз” Липецкого управления лесного хозяйства, с. Боровое Усманского района Липецкой области, Россия

Представлены результаты изучения укореняемости стеблевых черенков тополей, принадлежащих к различным секциям (белые, черные, бальзамические и группа межсекционных гибридов настоящих тополей). Показан выход стеблевых черенков на опытно-производственной маточной плантации, созданной в 2020 г. в Куликовском лесхозе Липецкого управления лесного хозяйства, продуцируемых на 1-но, 2-х, 3-х и 4-х летних корнях. Дана ранговая оценка репродуктивной способности тополей и выделены наиболее продуктивные клоны. Наибольшая репродуктивная способность отмечена у черных тополей ‘Сакрау-59’ и дельтовидного, и у межсекционных гибридов настоящих тополей ‘Версии’ и ‘Э.с.-38’, которые рекомендованы для создания промышленной маточной базы выращивания селекционно-улучшенного посадочного материала тополей. На 3-4-х летних корнях выход стеблевых черенков рекомендованных тополей составил 100-170 тыс. шт./га.

Ключевые слова: тополь, гибриды, маточная плантация, репродуктивная способность, выход стеблевых черенков, отбор.

INDUSTRIAL CULTIVATION OF PLANTING MATERIAL OF SELECTED POPLARS IN THE CONDITIONS OF THE CCR.

V.A. Tsarev¹, A.A. Sergeev², A.P. Tsarev¹, R.P. Tsareva¹, E.N. Miligula¹

¹FGBU “All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology”, Voronezh, Russia

²GAU “Kulikovsky Leskhov” of Lipetsk Forestry Department, village of Borovoye, Usmanskiy rayon, Russia. Borovoye, Usmanskiy district, Lipetsk region, Russia

The results of stem cuttings’ rootability of poplars belonging to different sections (white, black, balsamic and a group of intersectional hybrids of *eupopulus* L.) are presented. The yield of stem cuttings at the experimental production root-cuttings’ plantation established in 2020 at the Kulikovsky Forestry Enterprise of the Lipetsk Forestry Department, produced on 1, 2, 3 and 4-year-old roots, is shown. A rank assessment of the reproductive ability of poplars is given and the most productive ones are highlighted. The greatest reproductive ability was noted in black poplars ‘Sacrau-59’ and *P. deltoides* L., and in intersectional hybrids of *eupopulus* ‘Versiya’ and ‘E.s.-38’, which are recommended for creating an industrial reproductive base for growing of selectively improved poplar planting material. On 3-4-year-old roots, the yield of stem cuttings of recommended poplars was 100-170 thousand pieces/ha.

Keywords: poplar, hybrids, root-cuttings plantation, reproductive ability, stem cuttings yield, selection.

Введение

Для создания быстрорастущих лесных плантаций тополей, прежде всего, необходим селекционно-улучшенный высокопродуктивный посадочный материал. В тополеводстве в качестве посадочного материала чаще всего используются зимние стеблевые черенки, выращенные на маточных плантациях.

Промышленные маточные плантации с целью обеспечения механизированных уходов в междурядьях обычно создают по схемам размещения 3×0,5 м, 4×0,5 м и 4×1 м. Наиболее подходящими для выращивания тополевых плантаций являются незатопляемые пойменные долины рек, либо участки с неглубоким залеганием грунтовых вод с легкими супесчаными и суглинистыми хорошо аэрируемыми почвами.

Срок эксплуатации маточных плантаций тополей составляет 8-10 лет. Массовый выход стеблевых черенков начинается со 2-го года эксплуатации после срезки плантации на пень. Объем выхода черенков с единицы площади зависит от многих факторов и в первую очередь от сортовой принадлежности, соблюдения агротехники выращивания посадочного материала и правильного подбора земельных участков, соответствующих лесоводственно-биологическим особенностям тополей.

Ранее проведенные исследования показали, что средний выход стандартных стеблевых черенков тополей, отвечающих требованиям ГОСТ 17 267-71 [1] на 2-х летней плантации при размещении 3×0,5 м составлял 94 тыс. шт./га, на 3-х летней – 344 тыс. шт./га [3, 5]. На 6-летней плантации выход стандартных стеблевых черенков в среднем по секциям: у белых тополей был 67 тыс. шт./га, у бальзамических – 133 тыс. шт./га, у черных – 267 тыс. шт./га [2, 4]. Внутри секций наблюдались значительные колебания.

Целью данного исследования было изучить репродуктивную способность различных клонов тополей на маточной плантации, созданной в Куликовском лесхозе Липецкого управления лесного хозяйства и отобрать лучшие клоны, продуцирующие наибольшее количество стандартных стеблевых черенков.

Объект и методика исследований

Объектом исследования является маточная плантация тополей, созданная в 2020 г. на землях ГАУ “Куликовский лесхоз” Липецкого управления лесного хозяйства (с. Боровое, Усманский район Липецкой области). Координаты 52°12'43" СШ, 39°30'32" ВД, 109 м над ур. м. Размещение 3×0,5 м. Почва – пойменно-луговая легко суглинистая. В испытание включено 13 клонов тополей, в т.ч. 2 сорта белых тополей (‘Болид’ и ‘Ведуга’), 1 вид и 1 гибрид черных тополей отечественной селекции: дельтовидный и ‘Пирамидально-осокоревый Камышинский’ (‘ПОК’), 2 евро-американских гибрида черных тополей (‘Мариландика’ и ‘Сакрау-59’), 3 вида бальзамических (волосистоплодный, китайский и Максимовича) и 4 межсекционных гибрида настоящих тополей (‘Борей’, ‘Версия’, ‘Ивантеевский’ и ‘Э.с.-38’). Смешение рендомизированное. Посадка осуществлена стеблевыми черенками.

Выход стеблевых черенков тополей на 1 га определялся по формуле (1):

$$N = \frac{6667 \times S \times n}{100}, \quad (1)$$

где: 6 667 – количество кустов на 1 га при размещении 3×0,5 м; S – сохранность кустов в %; n – выход черенков с 1 куста.

Результаты исследований

Укореняемость стеблевых черенков в целом по участку была 73 % с вариацией от 28 % до 98 % (табл. 1).

Таблица 1

Средняя высота, укореняемость и выход стеблевых черенков тополей на 1-летней маточной плантации в Куликовском лесхозе при размещении 3×0,5 м

№№ п/п	Наименование тополя	Инв. №№	Высажено черенков, шт.	Укореняемость черенков		Средняя высота 1-летних растений	Ранг
				шт.	%		
I Белые тополя							
1	‘Болид’	27-10	50	14	28	123±17	7
2	‘Ведуга’	26-07	95	47	49	114±9	10
Итого и среднее по секции:			145	61	42	116±7	
II Черные тополя							
3	‘ПОК*’	91	50	85	98	111±5	11
4	‘Мариландика’	34	95	12	93	147±19	4
5	‘Сакрау-59’	50	50	26	79	107±6	12
6	дельтовидный	б/№	95	24	83	149±9	3
Итого и среднее по секции:			162	147	91	141±5	
III Бальзамические тополя							
7	волосистоплодный	84	56	47	84	183±12	1
8	китайский	85	17	15	88	133±10	5
9	Максимовича	86	49	36	73	78±5	13
Итого и среднее по секции:			122	98	80	137±6	
IV Межсекционные гибриды настоящих тополей							
10	‘Борей’	13-01	60	38	63	120±8	8
11	‘Версия’	22-08	47	40	85	115±6	9
12	‘Ивантеевский’	46	70	48	69	126±5	6
13	‘Э.с.-38’	94	158	132	84	157±5	2
Итого и среднее по секции:			335	258	77	139±4	
В целом по участку:			764	554	73	131±2	

Примечания:

*ПОК – Пирамидально-осокоревый Камышинский (гибрид А.В. Альбенского – ВНИАЛМИ)

Наибольшая укореняемость стеблевых черенков отмечена у бальзамических и черных тополей (80-91 %), наименьшая – у белых (28-49 %). Сохранность к концу первого года роста и в дальнейшем была около 70 %. Исключение составил бальзамический тополь Максимовича, который в 4-х летнем возрасте выпал полностью.

Средняя высота по участку в первый год роста составила 131 см с вариацией по отдельным клонам от 78 до 183 см (см. табл. 1). Стандартных значений по высоте, соответствующих ГОСТ 17 267-71 [1], растения достигли уже в 1-й год роста. Ранговая оценка роста тополей в первый год исследований показала, что в первую пятерку вошли тополя волосистоплодный, дельтовидный, ‘Мариландика’ и китайский (133-183 см). Существенно от них отставали по росту тополя ‘Ведуга’, ‘Пирамидально-осокоревый Камышинский’ (‘ПОК’), ‘Сакрау-59’ и Максимовича (78-114 см, ранги 10-13).

Выход стеблевых черенков по сортам в пересчете на 1 га зависел от сортовой принадлежности и в первый год варьировал от 3,5 до 12,1 тыс. шт./га. Самый низкий выход (до 4,0 тыс. шт./га) был в группе белых тополей, максимальный – у бальзамического тополя волосистоплодного (до 12,1 тыс. шт./га). Эта тенденция сохранялась и у растений на 2-х летних корнях – от 5,6 тыс. шт./га (‘Болид’) до 33,5 тыс. шт./га (волосистоплодный), а в среднем по участку выход стеблевых черенков составил 19,8 тыс. шт./га (табл. 2).

Таблица 2

Сохранность и выход стеблевых черенков тополей на маточной плантации в Куликовском лесхозе на 3-х и 4-х летних корнях при размещении 3×0,5 м

№№ п/п	Наименование тополя	Высажено, шт.	Сохранность кустов				Выход стеблевых черенков, тыс. шт./га			
			в 3 года		в 4 года		на 2-х летних корнях	на 3-х летних корнях	на 4-х летних корнях	Ранг в 4 года
			шт.	%	шт.	%				
I Белые тополя										
1	‘Болид’	50	8	16	8	16	5,6	19,3	29,3	9
2	‘Ведуга’	95	23	24	11	12	9,9	18,0	19,1	11
II Черные тополя										
3	‘ПОК*’	50	51	59	27	31	17,9	31,3	20,4	10
4	‘Мариландика’	95	11	85	11	85	20,5	144,5	104,2	4
5	‘Сакрау-59’	50	28	85	18	55	15,7	96,0	113,6	3
6	дельтовидный	95	19	66	19	66	21,1	122,9	105,5	2
III Бальзамические тополя										
7	волосистоплодный	56	35	63	27	48	33,5	111,8	63,4	6
8	китайский	17	13	77	9	53	17,6	64,1	4,3	12
9	Максимовича	49	8	16	0	0	4,9	0,5	выпал	13
IV Межсекционные гибриды настоящих тополей										
10	‘Борей’	60	15	42	17	28	16,8	10,6	44,4	7
11	‘Версия’	47	35	75	35	75	22,7	146,2	98,6	5
12	‘Ивантеевский’	70	35	50	30	43	13,7	32,5	25,8	8
13	‘Э.с.-38’	158	123	78	116	73	27,8	170,5	150,7	1
Итого и среднее:		764	414	54	328	43	19,8	74,5	91,4	

Примечания:

*ПОК – Пирамидально-осокоревый Камышинский (гибрид А.В. Альбенского – ВНИАЛМИ)

В 3-х летнем возрасте средние показатели репродукции черенков составили 74,5 тыс. шт./га, в 4 года – 91,4 тыс. шт./га. Максимальный выход стеблевых черенков в этом возрасте наблюдался у черных тополей и некоторых межсекционных гибридов. К примеру, в 4 года наибольшая репродуктивная способность отмечена у черных евро-американских гибридов ‘Мариландика’, ‘Сакрау-59’, у отечественного межсекционного гибрида ‘Версия’ и тополя дельтовидного (99-144 тыс. шт./га). Максимальный выход стеблевых черенков отмечен у отечественного сорта ‘Э.с.-38’ (150,7 тыс. шт./га).

Ранговая оценка выхода стеблевых черенков в пересчете на 1 га показала, что наибольшая репродуктивная способность в 1-й год проявилась у тополей ‘Мариландика’, ‘Сакрау-59’, дельтовидного, ‘Версии’, ‘Э.с.-38’ и волосистоплодного (20-33 тыс. шт./га) – ранги 1-6. Эта тенденция сохранялась и в последующие годы наблюдений. Исключение составили тополя волосистоплодный и ‘Сакрау-59’. Тополь волосистоплодный проявляет максимальный рост и выход стеблевых черенков в первые годы роста. Затем с возрастом у него темп роста снижается и выход стеблевых черенков сокращается. А у тополя ‘Сакрау-59’, наоборот, репродуктивная способность и рост побегов увеличиваются.

Заключение

Таким образом, наибольшая репродуктивная способность тополей с максимальным выходом посадочного материала (130-150 тыс. шт. стеблевых черенков на 1 га) на 3-4-х летних корнях в Куликовском лесхозе наблюдалась у тополей волосистоплодный, ‘Мариландика’, ‘Сакрау-59’, ‘Версия’, ‘Э.с.-38’ и дельтовидный.

Библиографический список

1. ГОСТ 17 267-71 Черенки тополя для лесостепной и степной зон: Государственный стандарт Союза ССР. – Группа С-91. – Разработан ВНИИЛМ. – Введен в действие Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 12 ноября 1971 г. – № 1861. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200025551> (дата обращения 10.06.2024).
2. Научный отчет: “Селекция, сортоизучение и сортоиспытание хозяйственно-ценных форм, гибридов и сортов быстрорастущих пород (промежуточный по теме 4.2.1.1. за 1993 г.)” / № Гос. регистр. ГР 01.9.10 0500091 / Руководитель темы А.П. Царев ; отв. исполнитель темы Р.П. Царева. – Воронеж: изд-во “НИИЛГиС”, 1994. – С. 155-162.
3. Царев А.П., Русин Н.С. Выращивание сортового посадочного материала тополей на маточных плантациях. Внедрено в Семилукском опытно-показательном питомнике ЦНИИЛГиС, г. Воронеж, 1972-1974 гг. // Информационный листок № 444-75. – Воронеж: Изд-во “Воронежский межотраслевой территориальный центр научно-технической информации и пропаганды”, 1975. – 4 с.
4. Царев В.А. Вегетативная репродукция и испытание тополя в Волгоградской области: Дисс. ... канд. с.-х. наук : 06.03.01. – Воронеж: ВГЛТА, 1995. – 231 с.
5. Царев В.А. Исследование репродуктивной способности тополей в лесостепной и степной зонах // Современная лесная наука: проблемы и перспективы: Всероссийская научно-практическая конференция (20-22 декабря 2017 г., ВНИИЛГИСбиотех) / отв. ред. М.А. Семенов. – Воронеж: ВНИИЛГИСбиотех, 2017. – С. 132-137.

УДК 631.53.01+58.085

ВЫРАЩИВАНИЕ СЕЛЕКЦИОННОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ГИБРИДОВ БЕЛЫХ ТОПОЛЕЙ НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ *IN VITRO*

Шабанова Е.А., Панова Е.Ю.

ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии», г. Воронеж, Россия

Представлены результаты микроразмножения и адаптации к почвенным условиям четырех гибридов белых тополей. Опытная партия микрорастений прошла двухэтапную адаптацию к условиям *ex vitro* в лаборатории и в теплице. Через год после высадки в теплицу сохранность растений составила 92-97%. Лучший рост побегов отмечен у линий гибрида тополя белого и осины 1/03с и тополя белого Е/с.

Ключевые слова: клональное микроразмножение, тополь белый, *in vitro*, *ex vitro*, посадочный материал

Тополь (*Populus L.*) относится к древесным породам, характеризующимся быстрым ростом, скороспелостью, экологической пластичностью. Применение культуры ткани *in vitro* ускоряет процесс селекции и позволяет в короткие сроки размножать необходимые генотипы. Внедрение результатов биотехнологии в практику лесного хозяйства обеспечит надежное воспроизводство ценного генофонда, позволит повысить качество посадочного материала, продуктивность и устойчивость создаваемых насаждений к неблагоприятным условиям среды [2].

В ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех» создана и поддерживается в длительной культуре (более 30 лет) коллекция *in vitro* ценных генотипов (продуктивных, быстрорастущих, устойчивых и др.) лиственных древесных растений, которая также является основой для выращивания элитного (сортового) посадочного материала. На основе методов клеточной и тканевой селекции разрабатываются технологии получения солеустойчивых древесных растений. Получены новые солеустойчивые линии различных видов березы и тополя. Ведутся исследования по оценке линий тополя, полученных с применением культуры изолированных пыльников *in vitro* [3, 7].

Целью данного исследования является оценка сохранности и роста новых линий гибридов тополя селекции ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех» в условиях *in vitro* и *ex vitro*.

В исследованиях по получению опытной партии посадочного материала тополя *in vitro* использовались линии клонов, полученные методом тканевой селекции в условиях *in vitro* с применением 1% NaCl (1/03с (*Populus. alba L. × P. tremula L.*), Е/с (*Populus. alba L.*), Тг/с (*Populus. alba L.*) или регенерацией из каллуса пыльничкового происхождения №26/10а (*Populus alba L. × P. bolleana Lauche*) [3, 5, 7, 9]. Исходные деревья характеризуются быстрым ростом, продуктивностью, засухоустойчивостью [6, 8].

Микрорастения хранились в Коллекции клонов *in vitro* ценных генотипов лиственных древесных растений ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех» на безгормональных питательных средах ½ WPM (Woody Plant Medium) или ½ WPM с добавлением 1,5% активированного угля при частоте субкультивирования 1 раз в 5-6 месяцев. Для тиражирования переходили на более частое субкультивирование – 1 раз в 1,5-2 месяца на средах ½ WPM или ½ WPM с добавлением 1% активированного угля [1, 4].

Для адаптации к почвенным условиям отбирались микрорастения с нормальной морфологией, хорошо выраженными междоузлиями и развитой корневой системой. Всего отобрано около 80 микрорастений тополя для адаптации к условиям грунта в лабораторных

условиях. Применялась двухэтапная адаптация: на первом этапе микрорастения высаживались в пластиковые контейнеры с грунтом на основе верхового торфа, и содержались в лабораторных условиях при комнатной температуре, освещенности 1,5-2 клк.

В течение первых двух недель микрорастения укрывали для поддержания высокой влажности (70-90 %). Через 10-14 дней укрытие снимали, постепенно переходя на более редкий полив.

Изучаемые линии имеют спонтанное укоренение (90-95%), высокую сохранность *in vitro* (85,0-93,3%), фактический коэффициент размножения за 2-месячный цикл размножения на безгормональной среде ½ WPM составляет от 4,5 до 7,0 (таблица 1). Средняя длина побега микрорастений опытной партии варьировала от 4 до 7 см, в среднем составила 5,7 см.

Таблица 1

Биотехнологические показатели микрорастений тополя опытной партии

Клон (линия)	Укореняемость микрочеренков, %	Сохранность <i>in vitro</i> , %	Длина побега, см	Коэффициент размножения
26/10а	90	85	5,4	4,5
1/03с	95	90	6,7	7,0
Е/с	95	90	5,5	7,0
Тг/с	95	93	5,2	6,5

В процессе адаптации в лабораторных условиях в условиях грунта прижилось от 85,7 до 96% микрорастений тополя, в среднем приживаемость составила 93,2%. За 1,5 месяца адаптации в лабораторных условиях в среднем прирост побега составил 8,7 см по сравнению с изначально высаживаемыми стерильными растениями.

После адаптации в лаборатории регенеранты высаживали в поликарбонатную летнюю теплицу. Пересадка производилась в конце июля-начале августа, что считается неоптимальным сроком для успешной адаптации микрорастений. Приживаемость регенерантов тополя, зарегистрированная в сентябре спустя 1,5 месяца адаптации в теплице, в среднем составила 98,5%. Длина побега варьировала от 13 до 22 см, в среднем составила 17,6 см (таблица 2).

К июню 2024 года сохранность растений составила 92-97% в зависимости от клона. Средняя длина побега – 42,1 см. Темпы роста анализируемых клонов тополя демонстрируют возможность получения стандартного посадочного материала к осенней посадке в сентябре-октябре 2024 г.

Таблица 2

Рост регенерантов клонов тополя в процессе адаптации к условиям *ex vitro*

№ клона	Вид (гибрид)	Длина побега <i>in vitro</i>	Длина побега после адаптации в контейнере (июль 2023)	Длина побега после адаптации в теплице (сентябрь 2023)	Длина побега после адаптации в теплице (июнь 2024)
26/10	<i>Populus alba</i> L. × <i>P. bolleana</i> Lauche	5,3±0,40	11,0±0,89	14,5±0,55	35,5±1,52
1/03с	<i>Populus. alba</i> L. × <i>P. tremula</i> L.	6,5±0,10	15,8±0,50	18,4±0,50	46,9±1,91
Е/с	<i>Populus alba</i> L.	5,3±0,19	15,2±0,54	18,5±0,56	44,1±1,99
Тг/с		5,7±0,14	15,5±0,58	19,1±0,55	42,1±1,77
Среднее		5,7±0,28	14,4±1,13	17,6±1,05	42,1±2,44

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального агентства лесного хозяйства. Рег. № НИОКТР 123040400004-8.

Библиографический список

1. Lloyd G., McCown D. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use shoot tip culture // Plant Propagators Soc. Comb. Proc, 1980 – P. 421-427.
2. Mashkina O. S. Amineva E. Yu. Assessment of the Ecological and Genetic Potential of Poplar Mixoploids in Voronezh Oblast // Contemporary Problems of Ecology. – 2023. – Vol. 16, No. 5. – P. 600-611.
3. Аминева Е. Ю., Табацкая Т. М., Машкина О. С. Оценка солеустойчивости *Populus L.* в условиях моделируемого стресса *in vitro* // Субтропическое и декоративное садоводство. – 2021. – № 79. – С. 60-66.
4. Корчагин О.М. Табацкая Т.М., Машкина О.С. Сохранение лесных генетических ресурсов на основе коллекции *in vitro*: состояние, перспективы, проблемы (аналитический обзор) // Лесохозяйственная информация. – 2023. – № 2. – С. 75-90.
5. Машкина О.С. Формирование диплоидной пыльцы у тополя под действием повышенной температуры // Известия АН СССР. — 1992. — №1. — С.66–78.
6. Машкина О.С., Табацкая Т.М. Опытные плантационные культуры лиственных древесных растений, созданные на основе клонального микроразмножения // Размножение лесных растений в культуре *in vitro* как основа плантационного лесовыращивания. – Йошкар-Ола, ПГТУ. – 2014. – С.87-93.
7. Табацкая Т.М., Машкина О.С., Шабанова Е.А., Гродецкая Т.А., Кондратьева А.М., Федулова Т.П. Хромосомный и микросателлитный анализ регенерантов тополя, полученных в культуре изолированных пыльников *in vitro* // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2021. – № 3. – С. 49-58.
8. Царев А.П., Царева Р.П., Царев В.А., Евлаков П.М. Гибридизация тополей. – Воронеж : Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова, 2021. – 289 с.
9. Шабанова Е.А., Внукова Н.И., Машкина О.С. Влияние модификаций состава питательных сред на эффективность длительного хранения *in vitro* клонов тополя и осины // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2020. – № 1. – С. 42-49.

УДК 664.286

ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ ЗАМЕЩЕНИЯ КРАХМАЛА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ЯБЛОЧНОЙ КИСЛОТОЙ, НА РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РАСТВОРА

Д.Е. Штепенко, А.В. Протопопов

Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, г. Барнаул, Россия

Крахмал, являющийся продуктом широкого применения, имеет ряд недостатков. Базируясь на основных проблемах, существует ряд различных методов модификации молекулы крахмала, решающих их. В представленной статье изложено изучение реакции крахмала с яблочной кислотой в условиях, описанных ниже. Полученные продукты исследовались методом ИК-спектроскопии, были рассчитаны на степень замещения и определены значения вязкости растворов модифицированного крахмала.

Ключевые слова: ацилирование, крахмал, химическая дериватизация, гелеобразование, сложный эфир крахмала.

EFFECT OF THE DEGREE OF SUBSTITUTION OF STARCH MODIFIED WITH MALIC ACID ON THE RHEOLOGICAL PROPERTIES OF THE SOLUTION

D.E. Shtepenko, A.V. Protopopov

Polzunov Altai State Technical University, Barnaul, Russia

Starch, which is a widely used product, has a number of disadvantages. Based on the basic problems, there are a number of different methods for modifying the starch molecule to solve them. This article describes the study of the reaction of starch with malic acid under the conditions described below. The resulting products were studied by IR spectroscopy, the degree of substitution was calculated, and the viscosity values of solutions of modified starch were determined.

Key words: acylation, starch, chemical derivatization, gelation, starch ester.

Крахмал – основная запасная форма углеводов, широко встречающаяся в стеблях, корнях, плодах, листьях и цветках высших растений [1, с. 576]. Это природный полимер, образованный α -D-глюкозой, связанной гликозидными связями, выраженными как $(C_6H_{10}O_5)_n$, где $C_6H_{10}O_5$ — ангидроглюкозная единица. Крахмал состоит из амилозы и амилопектина, а соотношение амилозы и амилопектина зависит от его источника. Нативный крахмал представляет собой частично кристаллический природный полимер, включающий кристаллы А-типа, В-типа и С-типа [2 с.377], [3 с.376], [4 с.7041].

Преимущество крахмала состоит в том, что он является возобновляемым, разлагаемым, недорогим, экологически чистым и имеет широкий источник происхождения. Он привлек всеобщее внимание и стал важным промышленным сырьем, широко используемым в пищевой, текстильной, медицинской и химической промышленности. Однако крахмал нерастворим в холодной воде или других обычных растворителях из-за высокой молекулярной массы, сильных водородных связей между молекулами и компактной структуры гранул. Кроме того, плохая перерабатывающая способность серьезно влияет на разработку и применение крахмала. Модификация крахмала с целью улучшения его свойств для конечного использования уже давно привлекла внимание исследователей.

Одним из старейших методов модификации крахмала является этерификация крахмала [5, с.1210]. Сложный эфир крахмала с длинноцепочечными жирными кислотами представляет

собой важный тип модифицированного крахмала, который имеет длину алифатической цепи C8 или более, такой как стеарат крахмала, пальмитат крахмала, лаурат крахмала, олеат крахмала и лаурилсукцинат крахмала, и обладает важными свойствами, такими как: нетоксичность и биоразлагаемость. Благодаря введению гидрофобных длинных цепей, эфиры крахмала с длинноцепочечными жирными кислотами обладают многими уникальными свойствами, например, эмульгирующими свойствами, термопластичностью, способностью к разложению, гидрофобностью и т. д., и могут использоваться в повседневных химикатах, продуктах питания, медицине, химической и другие поля. Оно привлекло большое внимание исследователей. Традиционные методы синтеза эфиров крахмала с длинной цепью жирных кислот в основном включают метод плавления, метод водной среды и метод органических растворителей. Затем на основе традиционного метода разрабатываются новые методы, такие как ферментативно-каталитический метод и метод ионной жидкости. Этерификация осуществляется при высокой температуре методом плавления. Он имеет высокую скорость реакции, низкую степень замещения (DS) и нелегко контролировать процесс реакции [6, с. 282].

В методе органических растворителей используются органические растворители, такие как ДМСО, N,N-диметилформамид, пиридин, четыреххлористый углерод или толуол. Более высокий DS сложного эфира крахмала с длинноцепочечными жирными кислотами можно получить методом органических растворителей, но органические растворители, используемые в больших количествах, вызывают проблемы с регенерацией растворителей и загрязнением окружающей среды. В 1984 г. Закс [7, с.91] обнаружил, что ферменты могут катализировать реакции в неводной фазе. Ферментативно-каталитический метод безводной фазы характеризуется мягкими условиями и легким контролем.

Ионные жидкости обладают хорошей растворяющей способностью, экологически безопасны, нелетучи, негорючи и т. д., но в то же время имеют недостатки синтеза, высокую стоимость, высокую вязкость и строгие условия хранения. Кроме того, использование органических растворителей запрещено в промышленных целях, особенно в пищевой промышленности. В методе водной среды в качестве среды используется вода [8, с.52]. Его преимущества заключаются в низкой стоимости, безопасности и экологичности, но эффективность реакции и степень замещения (DS) низкие.

Благодаря плотной кристаллической структуре и массивным внутри- и межмолекулярным водородным связям крахмал практически нерастворим в холодной воде. Даже реагентам с небольшой молекулой трудно проникнуть внутрь крахмальных гранул. Следовательно, синтез крахмального эфира карбоновых кислот методом водной среды имеет низкую реакционную способность и DS. Учитывая, что мочевины оказывают хорошее пластифицирующее действие на крахмал, а сильнощелочной раствор оказывает разрушающее действие на внутри- и межмолекулярные водородные связи ассоциации крахмала. Наша группа изучала растворение крахмала в растворах NaOH и добилась определенных успехов [9, с.210].

Взаимодействие крахмала с яблочной кислотой проводили при продолжительности синтеза 3 часа с варьированием температуры в водной среде в присутствии катализатора при соотношении крахмал к яблочной кислоте 1:0,5 и 1:1. Анализ на содержание связанной кислоты (рисунок 1) показал незначительное увеличение степени замещения при соотношении 1:0,5 которое практически совпадает со степенью замещения при проведении синтеза с соотношением 1:1 при температурах до 45 °С.

Исследование полученных продуктов методом ИК-спектроскопии (рис. 2) показало образование сложноэфирных связей, при этом в продукте взаимодействия наблюдается уменьшение полосы поглощения в области 3600 см⁻¹ в результате уменьшения количества свободных гидроксильных групп и увеличение полосы поглощения в области 1740 см⁻¹, характерной для колебаний сложноэфирной группы, что также свидетельствует о протекающем взаимодействии.

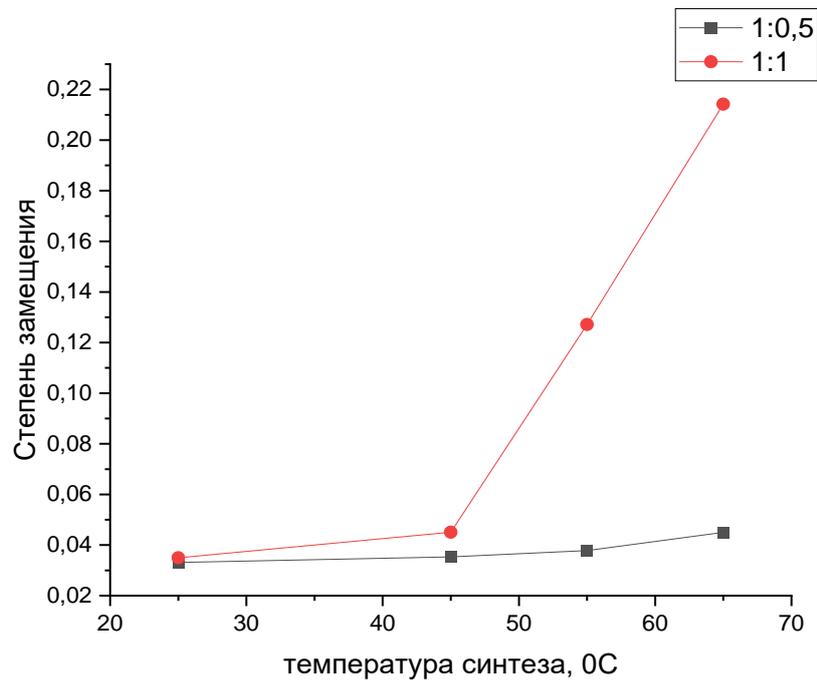


Рисунок 1. Степень замещения в полученных продуктах при различных температурах

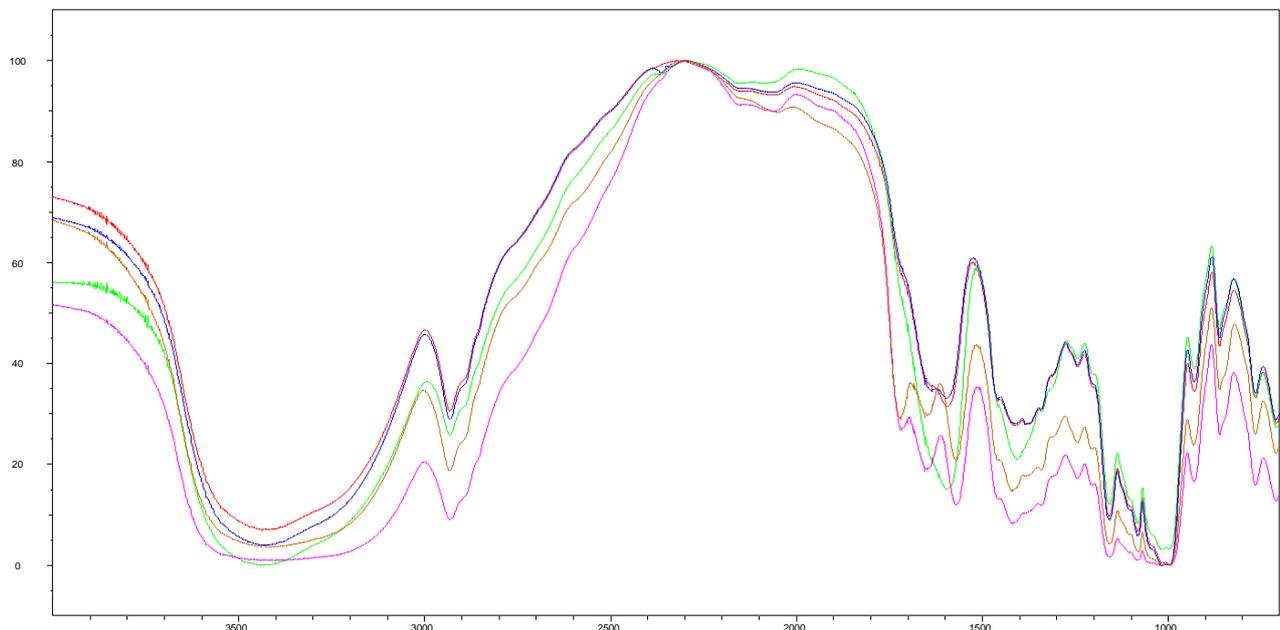


Рисунок 2. ИК-спектр продуктов взаимодействия древесины при 60 0C

При использовании крахмала в пищевом производстве необходимо учитывать его способность к растворению и клейстеризации при различных температурах, в частности для производства пищевых продуктов необходимо снижение точки растворения модифицированного крахмала. Полученные модифицированные крахмалы, замещенные яблочной кислотой были исследованы на реологические свойства при разных температурах,

зависимости относительной вязкости от температуры водного раствора модифицированного крахмала представлены на рисунках 3 для продуктов полученных при соотношении крахмал к яблочной кислоте 1:0,5 и рисунок 4 для соотношения крахмал к яблочной кислоте 1:1.

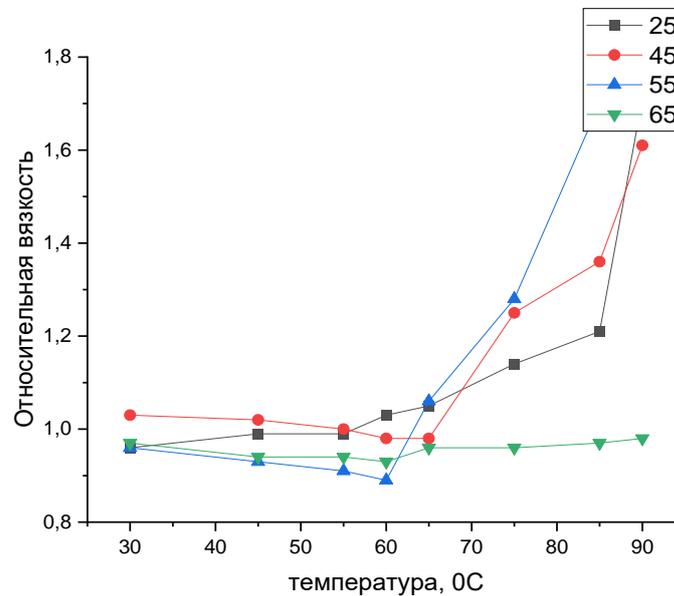


Рисунок 3. Зависимость относительной вязкости раствора модифицированного крахмала

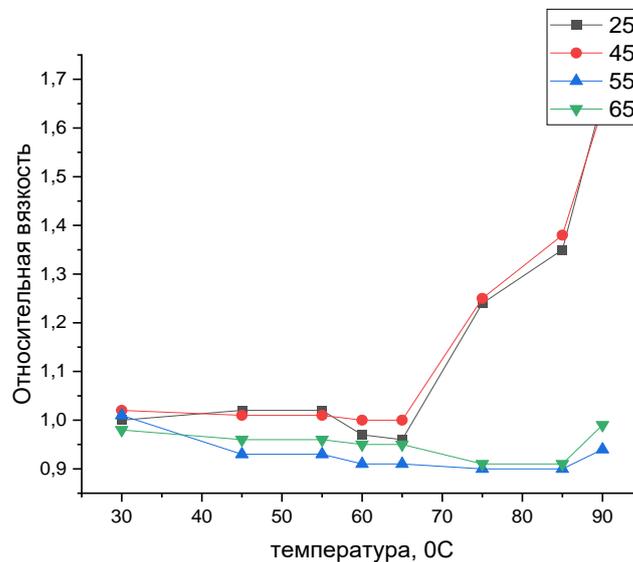


Рисунок 4. Зависимость относительной вязкости раствора модифицированного крахмала

Как показывают значения относительной вязкости, для продуктов крахмала, модифицированного яблочной кислотой, растворение и начало гелеобразования происходит при значениях температур около 65 °С для продуктов со степенью замещения от 0,04 до 0,05. При этом продукты с более низкой или более высокой степенью замещения проявляют себя в реологических свойствах скорее как нативный крахмал.

Библиографический список

1. Moore C.O., Tuschhoff J.V., Hastings C.W., Schanefelt R.V. Chapter XIX—applications of starches in foods *Starch Chem. Technol.*, 55 (3) (1984), pp. 575-591, [10.1002/9781118325018.ch25](https://doi.org/10.1002/9781118325018.ch25)
2. Oates C.G. Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis *Trends Food Sci. Technol.*, 8 (11) (1997), pp. 375-382, [10.1016/S0924-2244\(97\)01090-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01090-X)
3. Imberty A., Buléon A., Tran V., Péerez S. Recent advances in knowledge of starch structure *Starch*, 43 (10) (2010), pp. 375-384, [10.1002/star.19910431002](https://doi.org/10.1002/star.19910431002)
4. Gidley M.J., Bociek S.M. Molecular organization in starches: a carbon 13 CP/MAS NMR study *J. Am. Chem. Soc.*, 107 (24) (1985), pp. 7040-7044, [10.1021/ja00310a047](https://doi.org/10.1021/ja00310a047)
5. Mullen J.W., Pacsu E. Starch studies. Preparation and properties of starch trimesters *Ind. Eng. Chem.*, 34 (10) (1942), pp. 1209-1217, [10.1021/ie50394a016](https://doi.org/10.1021/ie50394a016)
6. Varavinit S., Chaokasem N., Shobsngob S. Studies of flavor encapsulation by agents produced from modified sago and tapioca starches *Starch*, 53 (6) (2015), pp. 281-287, [10.1002/1521-379x\(200106\)53:6<281::aid-star281>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/1521-379x(200106)53:6<281::aid-star281>3.0.co;2-r)
7. Tian Y., Zhang X., Sun B., Jin Z., Wu S. Starch sodium dodecanyl succinate prepared by one-step extrusion and its properties *Carbohydr. Polym.*, 133 (2015), pp. 90-93, [10.1016/j.carbpol.2015.06.085](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.085)
8. Miladinov V.D., Hanna M.A. Starch esterification by reactive extrusion *Ind. Crops Prod.*, 11 (1) (2000), pp. 51-57, [10.1016/S0926-6690\(99\)00033-3](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(99)00033-3)
9. Winkler H., Vorwerg W., Wetzel H. Synthesis and properties of fatty acid starch esters *Carbohydr. Polym.*, 98 (1) (2013), pp. 208-216, [10.1016/j.carbpol.2013.05.086](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.086)

УДК 571.27:632.4:632.938:633.11

ВЛИЯНИЕ НАНОКОМПОЗИТОВ ХИТОЗАН-СЕРЕБРО НА ЗАЩИТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ *SOLANUM TUBEROSUM*

**Л.Г. Яруллина¹, Е.А. Заикина^{*1}, Г.Ф. Бурханова¹, Е.А. Черепанова¹, А.В. Сорокань¹,
В.О. Цветков², И.С. Марданишин³, И.Я. Фаткуллин¹, Ж.Н. Калацкая⁴, К.С. Гилевская⁵**

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, 450054 Россия, Уфа, Проспект Октября, 71, *e-mail: evisheva@yandex.ru

²Уфимский университет науки и технологий, 450076 Россия, Уфа, ул. Заки Валиди, 32

³Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства УФИЦ РАН, 450059 Россия, Уфа, ул. Рихарда Зорге, 19

⁴Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, 220072 Беларусь, Минск, ул. Академическая, 27

⁵Институт химии новых материалов НАН Беларуси, 220141 Беларусь, Минск, ул. Ф. Скорины 36

Исследовали влияние новых наноконкомпозитов на основе серебросодержащего хитозана с массовым соотношением хитозан-серебро 100:1 (ХитAg 100:1) и 50:1 (ХитAg 50:1), на устойчивость картофеля к инфицированию возбудителем фитофтороза *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary и недостатку влаги в почве. Выявлено, что обработка наноконкомпозитом ХитAg 100:1 приводила к снижению степени проявления симптомов фитофтороза на листьях растений до 40% по сравнению с 95% в контроле, увеличивала в них содержание белка и активность антиоксидантных ферментов (каталазы и пероксидазы) при недостатке влаги. Вероятно, увеличение массового содержания хитозана в составе наноконкомпозита ХитAg способствует повышению иммуностимулирующих свойств на растения.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, наноконкомпозиты, хитозан, серебро, пероксид водорода, антиоксидантные ферменты, индуцированная устойчивость.

INFLUENCE OF CHITOSAN-SILVER NANOCOMPOSITES ON PROTECTIVE MECHANISMS OF *SOLANUM TUBEROSUM*

**L. Yarullina¹, E. Zaikina^{*1}, G. Burkhanova¹, E. Cherepanova¹, A. Sorokan¹, V. Tsvetkov²,
I. Mardanshin³, I. Fatkullin¹, J. Kalatskaya⁴, K. Gilevskaia⁵**

¹Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, 450054 Russia, Ufa, Prospekt Oktyabrya st., 71

²Ufa University of Science and Technology, 450074 Russia, Ufa, Z. Validi st., 32

³Bashkir Research Institute of Agriculture, 450059 Russia, Ufa, Zorge st., 19

⁴Institute of Experimental Botany named after V.F. Kuprevich, 220072 Belarus, Minsk, Akademicheskaya st., 27

⁵Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, 220141 Belarus, Minsk, F. Skorina st., 36

We investigated the effect of new nanocomposites based on silver-containing chitosan with a chitosan-silver mass ratio of 100:1 (ChitAg 100:1) and 50:1 (ChitAg 50:1) on the resistance of potatoes to infection by the late blight pathogen *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and lack of moisture in

the soil. It was revealed that treatment with the nanocomposite ChitAg 100:1 led to a decrease in the degree of manifestation of late blight symptoms on plant leaves by up to 40% compared to 95% in the control, and increased their protein content and the activity of antioxidant enzymes (catalase and peroxidase) under conditions of lack of moisture. Probably, an increase in the mass content of chitosan in the composition of the ChitAg nanocomposite contributes to an increase in the immunostimulating properties of plants.

Keywords: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, nanocomposites, chitosan, Ag, hydrogen peroxide, antioxidant enzymes, induced resistance.

Введение

Хитозан является природным полисахаридом, обладающим большим потенциалом применения в растениеводстве, поскольку может стимулировать рост растений, повышать их иммунный статус и устойчивость к биотическому и абиотическому стрессу [7]. Макромолекулы хитозана состоят из случайно связанных β -(1-4) D-глюкозаминовых звеньев и N-ацетил-D-глюкозамина. Элиситорные свойства хитозана обусловлены как специфическим связыванием остатков N-ацетилглюкозамина с рецепторами на поверхности растительных клеток, так и неспецифическим взаимодействием остатков глюкозамина за счет свободных аминогрупп с внешними и внутренними клеточными компонентами [9]. Биологическая активность хитозана во многом зависит от его молекулярной массы и степени ацетилирования. Модификация хитозана различными биологически активными веществами позволяет создавать новые полимерные материалы с улучшенными свойствами [8].

В настоящее время в связи с бурным развитием нанотехнологий начинают изучаться перспективы использования наночастиц металлов в сельском хозяйстве, среди которых особое внимание привлекают наночастицы серебра (НЧАг) из-за их способности стимулировать рост и урожайность различных сельскохозяйственных культур. Имеются сведения об иммуномодулирующей активности НЧАг, их фунгицидном и ростостимулирующем действии [6]. Влияние НЧАг на ростовые показатели растений определяется их дозировкой, которая может как усиливать, так и подавлять рост. Токсическое действие наночастиц серебра на растения включает снижение общей массы растений и подавление роста корней, уменьшение размеров стебля и побега, прерывание репликации ДНК и влияние на экспрессию генов [2]. Перспективным способом синтеза наночастиц серебра, снижающим их негативное воздействие на физиологические показатели растений, является химическое восстановление катионов Ag^+ полисахаридами. Следует отметить, что синтезируемые таким способом наноконпозиты полисахарид-Аг являются биосовместимыми и могут обладать свойствами, присущими каждому из компонентов, что позволяет говорить о перспективах разработки на их основе нового типа биопестицидов.

Цель работы – изучение влияния композитов хитозана с наночастицами серебра на формирование защитных механизмов у растений картофеля к инфицированию *Phytophthora infestans* и недостатку почвенной влаги.

Методы

Исследования проводили на растениях, выращенных из безвирусных мини клубней картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Удача башкирской селекции, полученных в Башкирском НИИСХ УФИЦ РАН (г. Уфа). Растения выращивали в климатической камере (световой период 16 ч, 20–22°C) спектр -15КР (Россия).

Для искусственного инфицирования изолированных листьев растений использовали зооспоры возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН. Патоген выращивали на картофельном агаре с декстрозой в течение 7 сут после повторного выделения из инфицированных мини-клубней картофеля для восстановления агрессивности патогена.

Поверхность колоний изолята *P. infestans* заливали дистиллированной водой и инкубировали при 4 °С в течение 30 мин. Концентрацию спорангиев оценивали с помощью камеры Фукса – Розенталя, суспензию спор разводили до титра 1×10^5 спор/мл.

Наноконпозиты хитозан-Ag (ХитAg) были получены в Институте химии новых материалов НАН Беларуси путем химического восстановления нитрата серебра хитозаном [4]. Для обработки растений использовали коллоидные растворы наноконпозитов с различным содержанием Ag. Наноконпозит №1 (ХитAg I, соотношение хитозан:Ag=100:1) и наноконпозит №2 (ХитAg II, соотношение хитозан: Ag =50:1). Концентрация хитозана в обоих гидрозолях была одинаковой и составляла 34,0 мг/мл.

Растения выращивали в условиях оптимального полива (80–85 % от влагоемкости почвогрунта) и при недостатке почвенной влаги (40–45% влагоемкости), которую создавали путем сокращения полива. Через 7 суток после обработки растений растворами Хит-Ag в разведении 1: 50 и 1:100, в них оценивали содержание H_2O_2 и пролина, активность каталазы, пероксидазы и степень пораженности изолированных листьев возбудителем фитофтороза *P. infestans*.

Для определения содержания H_2O_2 использовали метод, описанный в работе Jiang с соавт. [5] с модификациями. Концентрацию пероксида водорода определяли по предварительно построенной калибровочной кривой.

Для определения активности каталазы (КФ 1.11.1.6) использовали метод Hadwan и Abed [3] с модификациями. Активность каталазы рассчитывали по формуле: $U = (A_k - A_o) * K / (V * T)$, где A_k и A_o - абсорбция контрольных (содержащих воду вместо образца) и опытных образцов, соответственно, V – объем пробы, 0.1 мл, T – время инкубации, 600 с, K – коэффициент миллимолярного поглощения H_2O_2 , равный $22.2 * 10^3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Активность КАТ выражали в единицах на 1 мг белка.

Для определения активности пероксидазы (КФ 1.11.1.7, ПО) использовали метод Fornega и Walde [1] с модификациями, путем окисления субстрата 20 mM ортофенилендиамина 10 mM H_2O_2 , развитие окраски прекращали 4 н. H_2SO_4 . Оптическую плотность раствора измеряли при 490 нм на приборе Perkin Elmer LS 55 (США). Единица активности фермента соответствовала изменению оптической плотности раствора за 1 мин. Активность ПО выражали в единицах на 1 мг белка.

Для определения содержания пролина навеску растений заливали 2.5 мл стерильной дистиллированной воды. Пробирки помещали в водяную баню, которую затем доводили до кипения, после чего пробирки вынимали и охлаждали. Пробирки, содержащие 2 мл холодного образца, 2 мл реагента нингидрина и 2 мл ледяной уксусной кислоты, помещали на водяную баню и кипятили в течение часа, затем охлаждали. Оптическую плотность продуктов реакции измеряли на оборудовании En-Spire («Perkin Elmer», США) при длине волны 522 нм.

Опыты проводили в пятикратной биологической повторности. На гистограммах показаны выборочные средние, в качестве показателя погрешности показан 95%-ный доверительный интервал. Для оценки достоверности различий выборочных средних проводили дисперсионный анализ и последующий многограновый тест Дункана в программе Statistica 13 (уровень надежности 95 %).

Результаты и обсуждение

Исследовали устойчивость растений картофеля, обработанных наноконпозитами на основе серебросодержащего хитозана с массовым соотношением хитозан-Ag 100:1 (ХитAg I) и с массовым соотношением хитозан-Ag 50:1 (ХитAg II), использованных для обработки растений в разреждениях 1:50 и 1:100, через 45 дней после высадки мини клубней в контейнеры методом искусственного инфицирования изолированных листьев. Было показано, что через 5 суток после инфицирования площадь развития симптомов фитофтороза на листьях обработанных водой растений, растущих в условиях оптимальной увлажнённости, достигала 95-100% от всей листовой пластинки, конъюгатом ХитAg I в разведении 1:50 - чуть более 40% (рис. 1). Действие

ХитАг II (разведение 1:100) приводило к меньшему снижению степени проявления симптомов фитофтороза на листьях растений (60-65% листа). Другие варианты не были эффективны.

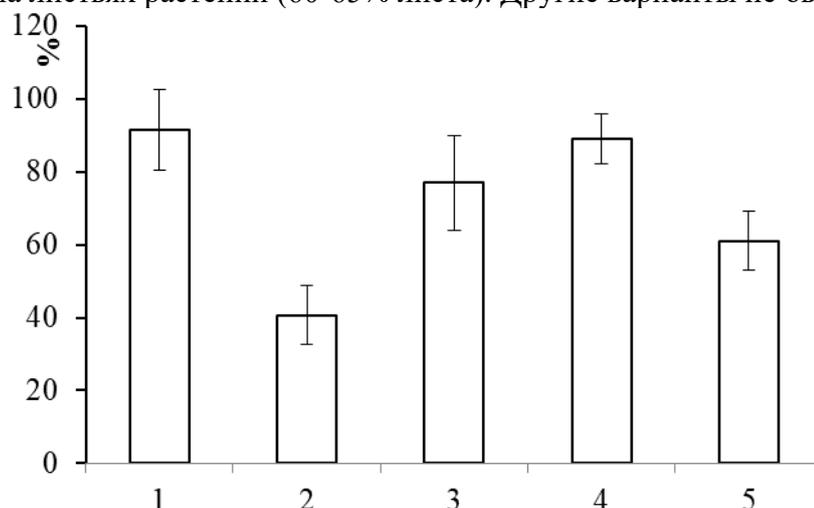


Рис. 1. Симптомы фитофтороза на листьях растений картофеля Удача, обработанных нанокompозитами хитозана с серебром (ХитАг I и ХитАг II) в разведении 50 и 100 раз через 5 суток после искусственного инфицирования *P. infestans*.

1 - контроль, 2 – ХитАг I (1:50), 3 – ХитАг II (1:50), 4 - ХитАг I (1:100), 5 - ХитАг II (1:100).

При анализе содержания пероксида водорода, пролина, активности каталазы и пероксидазы в растениях, растущих в нормальных условиях обеспечения почвенной влагой, было продемонстрировано отсутствие стрессового воздействия исследуемых серебросодержащих нанокompозитов хитозана. В условиях недостатка влаги обработка растений нанокompозитом ХитАг I увеличивала содержание белка и активность антиоксидантных ферментов (каталазы и пероксидазы). Обработка ХитАг I значительно снижала пероксидазную активность в нормальных условиях увлажнения, а в условиях дефицита влаги уровень ее активности значительно превышал все остальные варианты. Обработка композитами ХитАг способствовали увеличению концентрации пероксида водорода в растениях, как в нормальных условиях, так и при недостатке влаги. Возможно, повышение уровня H_2O_2 было связано со снижением активности каталазы под влиянием обработок ХитАг в исследуемых вариантах. Причем, при обработке растений ХитАг I снижение активности каталазы в условиях засухи было менее значительным, чем при обработке ХитАг II. Полученные данные свидетельствуют о связи между структурой нанокompозита и его биологической активностью: увеличение массового содержания хитозана в составе композита способствует повышению его иммуностимулирующих свойств на растения.

Благодарности. Работа выполнялась при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-16-00139

Библиографический список

1. Fornera S, Walde P. Spectrophotometric quantification of horseradish peroxidase with o-phenylenediamine. *Analytical Biochemistry* 2010, 407(2), 293-295. DOI: 10.1016/j.ab.2010.07.034.
2. Geisler-Lee J., Brooks M., Gerfen J.R. et al. Reproductive toxicity and life history study of silver nanoparticle effect, uptake and transport in *Arabidopsis thaliana* // *Nanomaterials*. – 2014. – Vol. 4, №. 2. – P. 301-318.
3. Hadwan M.H., Abed H.N. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data in Brief*. 2016, 6, 194-99. DOI: 10.1016/j.dib.2015.12.012.

4. Hileuskaya K.S., Mashkin M.E., Kraskouski A.N. et al. Hydrothermal Synthesis and Properties of Chitosan–Silver Nanocomposites // *Russian Journal of Inorganic Chemistry*. – 2021. – Vol. 66. – P. 1128-1134.
5. Jiang Z.Y., Woollard A.C.S., Wolff S.P. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett.*, 1990, 268, 69-71. DOI: 10.1006/abio.1999.4208.
6. Khan S., Zahoor M., Khan R.S. The impact of silver nanoparticles on the growth of plants: The agriculture applications // *Heliyon*. – 2023. – Vol. 8, Is. 6. – P. e16928.
7. Kou S. G., Peters L. M., Mucalo M. R. Chitosan: A review of sources and preparation methods // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – Vol. 169. – P. 85-94.
8. Kumaraswamy R.V., Kumari S., Choudhary R.C. et al. Engineered chitosan based nanomaterials: Bioactivities, mechanisms and perspectives in plant protection and growth // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2018. – Vol. 113. – P. 494-506.
9. Li K., Xing R., Liu S. et al. Chitin and chitosan fragments responsible for plant elicitor and growth stimulator // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2020. – Vol. 68, №. 44. – P. 12203-12211.

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТЕНИЙ**

УДК 633.853.52: 631.522:575:577.29

**АССОЦИАЦИЯ МЕЖДУ ДЛИНАМИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ И
ПРОЯВЛЕНИЕМ ЦЕННЫХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ У ДИКОЙ
СОИ****О.Н. Бондаренко, А.П. Галиченко, А.А. Блинова***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный научный центр
«Всероссийский научно-исследовательский институт сои», 675027, г. Благовещенск,
Игнатьевское шоссе, 19, Российская Федерация*

В данном исследовании были изучены связи между длинами микросателлитных локусов и проявлением ключевых сельскохозяйственных характеристик у дикой сои (*Glycine soja*). Объектом анализа послужили 46 коллекционных форм данной культуры, собранные из различных районов Амурской области, а также 2 формы из Китая, 1 из Приморского края и 1 из Хабаровского края. В ходе полевых экспериментов 2023 года проводились фенологические наблюдения за ростом и развитием растений, а также оценка хозяйственно ценных признаков на базе лаборатории селекции и первичного семеноводства (с. Садовое Тамбовского района). Проводили стандартную ПЦР на готовой реакционной смеси с использованием 20 пар праймеров. В ходе анализа простых последовательных повторов (SSR) установлены 11 маркеров, ассоциированных с локусами количественных признаков (QTLs), такими как вегетационный период, масса семян, содержание белка и масла в семенах сои. Корреляционный анализ проводили с помощью коэффициента взаимной сопряженности Пирсона. Результаты показали существование прямой умеренной связи между массой 1000 семян и локусом *Satt517* ($r_{xy}=0,39$). В то же время, установлена обратная зависимость между массой семян и локусом *Satt005* ($r_{xy}=-0,34$), что подчеркивает его влияние на снижение этого показателя. Анализ содержания белка в семенах выявил умеренную корреляцию с локусом *Satt431* ($r_{xy}=0,32$). Что касается содержания масла, только *Satt005* проявил обратную умеренную связь ($r_{xy}=-0,34$). Другие локусы, такие как *Satt002*, *Satt173*, *Satt234*, *Satt281*, *Satt373*, *Satt442*, *Satt556* и *Satt565*, продемонстрировали слабую корреляцию с хозяйственно-ценными признаками, что может ограничивать их использование в селекции сои. Микросателлиты представляют собой важный инструмент для изучения генетических свойств организмов, поскольку они могут выступать маркерами определённых фенотипических проявлений. Тем не менее, на сегодняшний день влияние этих маркеров на продуктивные качества ещё не установлено. Результаты текущего исследования, проведённого на ограниченной выборке и с использованием небольшого числа маркеров, требуют дальнейшей проверки. Для получения более точных и обширных данных необходимо провести масштабные исследования, такие как картирование связей или анализ больших популяций. Это позволит глубже понять роль микросателлитов в фенотипическом разнообразии.

Ключевые слова: дикая соя, генетическое разнообразие, ДНК-маркеры, микросателлитные локусы, урожайность, продуктивность

**ASSOCIATION BETWEEN THE LENGTHS OF MICROSATELLITE LOCI AND THE
MANIFESTATION OF VALUABLE AGRICULTURAL TRAITS IN WILD SOYBEANS****O.N. Bondarenko, A.P. Galichenko, A.A. Blinova***Federal State Budget Scientific Institution Federal Research Center "All-Russian Scientific Research
Institute of Soybean", 19, Ignatevsky highway, Blagoveshchensk, 675027, Russian Federation*

The relationships between the lengths of microsatellite loci and the manifestation of key agricultural characteristics in wild soybeans (*Glycine soja*) were studied. The object was 46 forms of this culture from various districts of the Amur Region, as well as 2 forms from China, 1 from the Primorsky Territory and 1 from the Khabarovsk Territory. In the field experiment (Sadovoye village, 2023), phenological observations were carried out, as well as an assessment of economically valuable signs. Standard PCR was performed on the finished reaction mixture using 20 pairs of primers. During the SSR analysis, 11 markers associated with QTLs were identified (9vegetation period, seed weight, protein and oil content in soybean seeds). The correlation analysis was performed using the Pearson coefficient of mutual conjugacy. The results showed the existence of a direct moderate relationship between the mass of 1000 seeds and the locus *Satt517* ($r_{xy}=0.39$). An inverse relationship has been established between the seed mass and the *Satt005* locus ($r_{xy}=-0.34$), which emphasizes its effect on reducing this indicator. Analysis of the protein content in the seeds revealed a moderate correlation with the *Satt431* locus ($r_{xy}=0.32$). *Satt005* showed an inverse moderate relationship with the oil content ($r_{xy}=-0.34$). Other loci *Satt002*, *Satt173*, *Satt234*, *Satt281*, *Satt373*, *Satt442*, *Satt556*, *Satt565* showed a weak correlation with economically valuable traits, which limits their use in soybean breeding. Microsatellites are an important tool for studying the genetic properties of organisms, but today the effect of these markers on productive qualities has not yet been established. The results of the current study, conducted on a limited sample and using a small number of markers, require further verification.

Keywords: wild soybeans, genetic diversity, DNA markers, microsatellite loci, yield, productivity

Введение. Дикие родственники сельскохозяйственных культур, несомненно, полезны для современного сельского хозяйства, предоставляя селекционерам потенциал полезных генетических ресурсов. Растет число случаев получения высокоурожайных производных гибридов, которые были созданы с использованием диких родственников, включая и сою, которые указывают на то, что дикие родственники культуры могут использоваться в качестве генного ресурса для повышения урожайности возделываемых культур посредством традиционной селекции или отбора с помощью молекулярных маркеров [1, 5, 8].

Достижения в области секвенирования генома и транскриптома позволяют обнаруживать у дикой сои аллели, связанные с желаемыми признаками, которые были утрачены при одомашнивании сои. Сбор, изучение *Glycine soja* и анализ ее геномных особенностей ускорят селекцию сои и будут способствовать устойчивому сельскому хозяйству и производству продуктов питания [4]. Для оценки генетического разнообразия дикой сои применяются микросателлитные маркеры, которые имеют высокую специфичность и полиморфизм. Некоторые участки не кодирующей ДНК могут влиять на сплайсинг, а также могут играть регуляторную роль, действуя как энхансеры или же сайленсеры [2, 3]. **Целью исследований** было определить корреляцию между хозяйственно-ценными признаками, идентифицированными у диких форм сои и длинами исследуемых микросателлитных локусов. Информация о наличии таких связей будет полезна для селекционной работы.

Условия, материалы и методы. Объектами исследования являлись 46 коллекционных форм *G. soja*, отобранных в различных районах Амурской области (Зейский, Тамбовский, Белогорский, Михайловский, Архаринский, Благовещенский), 2 формы из КНР, 1 из Приморского края и 1 из Хабаровского края. В качестве стандартов: сорт сои Лидия – культурного типа; форма дикой сои – КТ156.

Полевой опыт проводили в 2023 году на экспериментальном поле лаборатории селекции и первичного семеноводства ФНЦ ВНИИ сои (с. Садовое Тамбовского района Амурской области). В период вегетации проводили фенологические наблюдения, в период созревания – оценку по хозяйственно ценным признакам. Учет урожая и биометрический анализ проводили по каждому растению. Содержание белка и масла в семенах определяли методом диффузного отражения в ближайшей инфракрасной области в лаборатории переработки сельскохозяйственной продукции с использованием анализатора «Foss NIRSystem 5000» (Швеция). Лабораторный опыт проводили на базе лаборатории биотехнологии. Объектом исследования служили 20 пар SSR-праймеров, предложенных ранее коллективом авторов статьи в качестве предлагаемой маркерной системы для идентификации и паспортизации форм дикой сои [6]. Экстракцию

суммарной ДНК выполняли набором реагентов «ДНК-Экстран» из семян сои. Концентрацию и качество двухцепочечной ДНК измеряли с помощью нано-спектрофотометра EzDrop 1000 (Тайвань). ПЦР осуществляли в финальном объёме реакционной смеси 25 мкл с использованием реакционной смеси «БиоМастер» HS-Taq ПЦР-Color (2×). Амплификацию выделенных фрагментов ДНК сои проводили с помощью амплификатора CFX96 (США) при подобранных ранее температурных режимах [11]. Продукты реакции разделяли методом электрофореза в 2 %-м агарозном геле окрашенном бромистым этидием, в 0,5×TBE с использованием камеры для горизонтального электрофореза SE-1 (ООО «Компания Хеликон», Россия) в течение 1,5...2 часов (сила тока 50 мА, напряжение 90–100 В). Размер фрагментов определяли относительно маркера молекулярной массы 50bp DNA Ladder. Визуализация осуществлена с использованием гель-документирующей системы GelDoc EZ (США). Идентификацию и определение размеров аллелей локусов проводили с использованием программы Image Lab Version 6.0.14 Standard Edition. Выявленные аллели по каждому локусу обозначали соответственно молекулярному весу в п. н. Тесноту взаимосвязи между хозяйственно ценными признаками сопоставляли и длинами последовательностей локусов по коэффициенту корреляции с использованием программы Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение. Продуктивность играет решающую роль в оценке сельскохозяйственных культур, особенно сои. Главные показатели продуктивности включают массу семян с растения, массу 1000 семян и количество бобов/семян на каждом растении. Однако, кроме урожайности, для селекционного отбора сортов сои важны и другие факторы. К ним относится продолжительность вегетационного периода, которая влияет на сроки сбора урожая, а также содержание питательных веществ, таких как белок и масло в семенах. Эти характеристики имеют значение для повышения качества и конкурентоспособности продуктов. Результаты полевого опыта и оценка указанных характеристик форм дикой сои были ранее изложены в работе коллектива авторов [7].

Из исследуемых 20 пар праймеров те, что фланкировали локусы *Satt236*, *Satt590* не гибридизировались с матричной ДНК. Локусы *Satt453*, *Satt268*, *Satt571* и *Satt022* оказались мономорфными. Кроме того, биоинформатический поиск ассоциаций показал, что не все локусы из 20 маркеров могут быть использованы для генотипирования определенных качеств, которые сцеплены с находящимися рядом участками (QTLs), ассоциированных с необходимыми признаками. Таким образом, полностью пригодными для дальнейшего исследования имеющихся генотипов сои оказались только 11 SSR-локусов (табл. 1).

Таблица 1.

Локусы SSRs и их ассоциации с QTL исследуемых признаков дикой сои

Локус	Ассоциированные QTLs	Локус	Ассоциированные QTLs
<i>Satt002</i>	Масса семян с растения Масса 1000 семян	<i>Satt556</i>	Период вегетации Масло семян
<i>Satt565</i>	Количество бобов с растения Белок семян Масса 1000 семян	<i>Satt431</i>	Масло семян Белок семян Масса семян с растения
<i>Satt281</i>	Белок семян Масса семян Масса 1000 семян	<i>Satt234</i>	Количество бобов с растения Количество семян с растения Масса семян на растении
<i>Satt005</i>	Высота растения Масло семян Масса 1000 семян	<i>Satt173</i>	Количество бобов с растения Масло семян Белок семян Масса 1000 семян
<i>Satt442</i>	Период вегетации Масло семян Белок семян	<i>Satt373</i>	Количество бобов с растения Период вегетации Масло семян Белок семян Масса семян с растения
<i>Satt517</i>	Масса 1000 семян		

После того как были отобраны локусы, подходящие под задачи исследования, был проведен корреляционный анализ между длинами ампликонов, полученных после проведения ПЦР, и показателями хозяйственно-ценных признаков (табл. 2).

Таблица 2.

Сила корреляционной связи (абсолютное значение r_{xy}) между признаком и длиной SSR локуса

Локус	Наименование признака						
	Период вегетации	Масса 1000 семян	Масса семян с растения	Количество бобов с растения	Количество семян с растения	Белок семян	Масло семян
<i>Satt002</i>		0,27	0,26				
<i>Satt005</i>			-0,34				-0,34
<i>Satt173</i>		-0,06		0,15		0,05	-0,10
<i>Satt234</i>			-0,14	-0,10	-0,11		
<i>Satt281</i>		0,04	0,21			-0,18	
<i>Satt373</i>	-0,28		0,14	-0,02		-0,24	0,21
<i>Satt431</i>			-0,26			0,32	-0,06
<i>Satt442</i>	-0,17					0,24	0,00
<i>Satt517</i>		0,39					
<i>Satt556</i>	0,12						-0,29
<i>Satt565</i>		-0,10		0,12		-0,01	

Примечание: где теснота (сила) корреляционной связи менее 0,3 – слабая; от 0,3 до 0,5 – умеренная; от 0,5 до 0,7 – заметная; от 0,7 до 0,9 – высокая; более 0,9 – весьма высокая.

Была выявлена прямая взаимосвязь умеренной силы массы 1000 семян с локусом *Satt517* ($r_{xy}=0,39$). Обратная умеренная зависимость была выявлена между показателем массы семян с растения с локусом *Satt005* ($r_{xy}=-0,34$). Разнонаправленная корреляция между содержанием белка в семенах была отмечена с разными локусами, в том числе умеренная прямая – с локусом *Satt431* ($r_{xy}=0,32$). Среди локусов, ассоциированных с содержанием уровня масла в семенах сои, только с локусом *Satt005* ($r_{xy}=-0,34$) обнаружили обратную взаимосвязь умеренной силы. Анализ корреляции микросателлитов *Satt002*, *Satt173*, *Satt234*, *Satt281*, *Satt373*, *Satt442*, *Satt556*, *Satt565* с хозяйственно-ценными признаками показал, что каждый из них имел слабую корреляционной связь с признаком ($r_{xy} \leq 0,3$).

Заключение. В результате проведенного исследования было обнаружено, что *Satt002*, *Satt005* и *Satt517*, имеют некоторую связь с такими признаками, как масса 1000 семян, масса семян с растения, уровень содержания белка и масла в семенах сои. *Satt005* же имеет связь сразу с двумя, показывая идентичную отрицательную корреляцию умеренной силы разными признаками. Это указывает на то, что микросателлиты возможно могут выступать в роли маркеров определенных признаков или обладать регуляторной функцией, влияя на уровни экспрессии некоторых генов. Микросателлиты представляют собой важный инструмент для изучения генетических свойств организмов, поскольку они могут выступать маркерами определённых фенотипических проявлений. Тем не менее, на сегодняшний день влияние этих маркеров на продуктивные качества ещё недостаточно изучено. Результаты текущего исследования, проведённого на ограниченной выборке и с использованием небольшого числа маркеров, требуют дальнейшей проверки. Для получения более точных и обширных данных необходимо провести масштабные исследования, такие как картирование связей или анализ больших популяций. Это позволит глубже понять роль микросателлитов в фенотипическом разнообразии.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00076, <https://rscf.ru/project/23-26-00076/>

Библиографический список

1. Hu Z, Zhang D, Zhang G, Kan G, Hong D, Yu D. Association mapping of yield-related traits and SSR markers in wild soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) // *Breed Sci.* – 2014. – №63(5). – P. 441-449. –doi:10.1270/jsbbs.63.441.
2. Maeda R.K, Karch F. Gene expression in time and space: additive vs hierarchical organization of cis-regulatory regions // *Curr Opin Genet Dev.* – 2011. – №21. – P.187-193.
3. Perenthaler, E., Yousefi, S., Niggel, E., & Barakat, T. S. Beyond the exome: the non-coding genome and enhancers in neurodevelopmental disorders and malformations of cortical development // *Frontiers in cellular neuroscience.* – 2019. – Vol.13(352). – P. 1-20. –<https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00352/>
4. Zhuang Y, Li X, Hu J, Xu R, Zhang D. Expanding the gene pool for soybean improvement with its wild relatives // *aBIOTECH.* – 2022. – №3(2). – P. 115-125. – doi: 10.1007/s42994-022-00072-7.
5. Бондаренко О. Н. К вопросу о микросателлитных ассоциациях культурной сои Амурской области с сельскохозяйственными признаками / О.Н. Бондаренко, П.Д. Тимкин, Л.Е. Иваченко, А.А. Блинова, А.А. Пензин // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.* – 2023. – Т. 13, № 3(46). – С. 425-433. – DOI 10.21285/2227-2925-2023-13-3-425-433.
6. Бондаренко, О. Н. Комбинированный метод оптимизации условий ПЦР для скрининга дикой сои / О. Н. Бондаренко, С. И. Лаврентьева // *Пермский аграрный вестник.* – 2023. – № 4(44). – С. 34-43. – DOI 10.47737/2307-2873_2023_44_34.
7. Галиченко А.П. Оценка генофонда коллекционных форм *Glycine soja* по хозяйственно ценным признакам / А.П. Галиченко, О. Н. Бондаренко, А.А. Блинова // *Пермский аграрный вестник.* – 2024. – № 2(46). – С. 38-44. – doi: 10.47737/2307-2873_2024_46_38
8. Пензин, А. А. Корреляционный анализ длин микросателлитных локусов с хозяйственно ценными признаками диких форм сои / А. А. Пензин, П. Д. Тимкин // *Биотехнология: взгляд в будущее: МАТЕРИАЛЫ IX МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ*, Ставрополь, 30 марта 2023 года. – Ставрополь: Изд-во СтГМУ, 2023. – С. 80-82.

УДК 57.577.29:58.582.912

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОТИПОВ ГИБРИДНЫХ ФОРМ РОДОДЕНДРОНОВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VIVO* И *IN VITRO*.

О.Г. Васильева¹, А.А. Криницына², О.А. Чурикова²

¹ГБС РАН, Россия, г. Москва

²МГУ имени М.В. Ломоносова

Формирование живых коллекций растений *in vivo* и *in vitro* позволяет сохранять ценные генотипы, размножать растения, проводить целый комплекс фундаментальных и прикладных исследований, получать оздоровленный материал для использования в селекционной работе. Создание таких коллекций обуславливает необходимость проведения исследований, подтверждающих идентичность исходных образцов и полученных в асептической культуре регенерантов. Особое значение такие исследования имеют для видов, легко скрещивающихся между собой с образованием гибридных форм. В работе показана возможность и целесообразность использования ядерных и хлоропластных молекулярных маркеров для идентификации генотипов гибридных форм рододендронов при культивировании их *in vivo* и *in vitro*, с достаточно высокой степенью достоверности полученных результатов, что является важнейшим условием при депонировании растений в живые коллекции.

Ключевые слова: рододендрон, молекулярные маркеры, генотип, культивирование *in vivo* и *in vitro*

Последнее время большое внимание уделяется созданию коллекций живых организмов, в том числе и живых растений. Одним из удобных способов их создания является депонирование растений в стерильной культуре. Формирование таких коллекций позволяет не только сохранять ценные генотипы, но и, при необходимости, размножать растения, проводить целый комплекс фундаментальных и прикладных исследований, получать оздоровленный материал для использования в селекционной работе. Один из важных моментов – прослеживаемость генотипической идентичности получаемых растений исходным образцам. Особенно это касается растений, родиной которых являются отдаленные от места создания коллекции регионы, что приводит к необходимости использовать в качестве маточных растений интродуцированные экземпляры, растущие в коллекциях ботанических садов или частных собраниях. Особое внимание необходимо уделять родам, виды которых легко скрещиваются между собой с образованием гибридных форм. Для них важно разрабатывать схемы, позволяющие проследить генотипическую идентичность маточных растений и регенерантов в стерильной культуре.

Одним из таких родов является род *Rhododendron* (сем. *Ericaceae*). Для растений этого рода свойственна естественная гибридизация, особенно для видов, произрастающих на ограниченных территориях. Например, в подроде *Rhododendron* subg. *Hymenantes* (Blume) K. Koch, насчитывающем в своем составе около 225 видов, на территории восточных Гималаев и в провинции Юннань (Китай) было выявлено более 15 естественных гибридов [5, 7].

Способность к межвидовой гибридизации также активно используется для получения новых эффектных форм рододендронов, сочетающих в себе высокую декоративность с признаками адаптации к различным условиям среды. На сегодня получено более 1000 культурных гибридных форм, которые активно используются в озеленении. Одна из таких гибридных форм, отличающаяся высокодекоративными свойствами и хорошей зимостойкостью, в единственном экземпляре выращивается в коллекции лаборатории дендрологии ГБС РАН им. Н.В. Цицина на экспозиции «Вересковый сад» с начала 2000-х годов.

Для определения генетической стабильности растений, в том числе, получаемых в стерильной культуре, используют такие маркерные системы, как RAPD, ISSR и другие, каждая из которых показала неплохие результаты для разных видов рододендронов. Дополнительно

используют информацию о структуре участков ядерных и хлоропластных геномов. В частности, последовательность нуклеотидов внутреннего транскрибируемого спейсера между генами, кодирующими 18S и 25S рРНК, включающий ген 5.8S рРНК, а также некоторые участки пластомной ДНК, такие как часть гена, кодирующего матуразу К и/или межгенный спейсер *trnK-matK*, участок пластома *trnL-trnF*. Гибриды, как правило, сочетают в себе морфологические признаки обоих родителей, а по молекулярным данным демонстрируют несоответствие филогении по ядерным и хлоропластными участкам.

Целью работы была оценка возможности использования ядерных и пластомных маркерных последовательностей для подтверждения идентичности генотипов маточных растений, особенно в случае отсутствия достоверной информации об их происхождении, и растений, полученных в стерильной культуре.

Для работы была выбрана гибридная форма из открытого грунта, произрастающая в «Вересковом саду» и растения из стерильной культуры на стадии размножения после 6 пассажей, полученные в результате микроклонального размножения указанной формы в лаборатории биотехнологии растений ГБС им. Н.В. Цицина РАН. Молекулярно-биологические исследования проводили в лаборатории биологии развития растений каф. Высших растений биологического факультета МГУ.

Методика биотехнологических исследований основывалась на общепринятых классических приемах работы с культурами изолированных тканей и органов растений, а также методиках, разработанных в лаборатории биотехнологии растений [1, 3]. Для индукции культуры в качестве первичных эксплантов использовали терминальные вегетативные почки активно растущих побегов текущего года (последняя декада мая – начало июня) с небольшим участком стебля, которые после стерилизационной обработки помещали на питательную среду Андерсона [4] с добавлением ИУК и 2iP в соотношении 1:5 (1 и 5 мг/л соответственно). При дальнейшем культивировании на стадии, собственно, микроразмножения увеличивали концентрацию гормонов до 4 и 15 мг/л соответственно. Культивирование *in vitro* проводили в условиях люминостатной комнаты при 16-часовом фотопериоде, освещенности 2000 лк, температуре 23-25°C и влажности воздуха 70%.

ДНК выделяли из листьев растений рододендрона из открытого грунта и стерильной культуры с использованием СТАВ-метода с модификациями [2], качественную и количественную оценку проводили при помощи спектрофотометрического и флуориметрического методов, соответственно. Для определения генотипа по rDNA, а также хлоропластных гаплотипов использовали участки (1) ITS, (2) *trnK-matK*, (3) *matK*, (4) *trnL-trnF*. ПЦР с праймерами на указанные области проводили с использованием набора реактивов для проведения ПЦР с HS-Taq (+MgCl₂) (Биолабмикс, Россия) по программам 95°C - 5 мин, 35 циклов 95°C - 15 сек, 55°C - 20 сек, 72°C - 30 сек, 72°C - 5 мин (для амплификации участка ITS) и 95°C - 5 мин, 35 циклов 94°C - 60 сек, 50°C - 1 мин с увеличением температуры на 0.3°C/с; 65°C - 5 мин, 65°C - 5 мин; 65°C - 5 мин (для амплификации участков хлоропластной ДНК).

Для оценки генетической стабильности растений использовали праймеры UBC807, 808, 810 и NB12, амплификацию проводили по программе 94°C - 5 мин, 38 циклов 94°C - 15 сек, 58°C - 20 сек, 72°C - 2 мин, финальная элонгация 72°C - 10 мин.

Детекцию продуктов амплификации проводили в 1,8% агарозном геле в буфере TBE с последующим окрашиванием бромистым этидием. Очистку продуктов амплификации для последующего секвенирования по Сэнгеру проводили при помощи набора Cleanup-mini (Евроген, Россия). Секвенирование по Сэнгеру осуществляли в компании Евроген с уникальными праймерами. Анализ данных секвенирования проводили с использованием программ BioEdit и MEGAX, базы данных NCBI. Результаты ПЦР вносили в бинарную матрицу для проведения дальнейшего анализа при помощи макроса GenAlEx 6.41 [6].

В результате анализа данных секвенирования маркерных последовательностей маточного растения и растений-регенерантов было показано, что и ядерные (ITS1-ITS2), и хлоропластные участки (*matK*, *trnL-trnF* и межгенный спейсер *trnK*) имеют 100% идентичность друг с другом. Несмотря на то, что взятый в работу образец имеет гибридное происхождение, исследуемый участок ядерного генома не имеет ни одной полиморфной позиции. На филогенетических

деревьях, построенных с использованием метода Maximum Likelihood, хлоропластные участки объединяются в один кластер с высоким уровнем поддержки. Кроме того, в этот же кластер попадают и последовательности вида, который, скорее всего, принимал участие в формировании исследуемой гибридной формы. Похожая картина была получена и при анализе последовательностей ITS.

При проведении амплификации с использованием 4 ISSR праймеров были получены суммарно 53 фрагмента, размер которых находился в диапазоне 200-1200 п.н. Анализ генетической однородности исходного растения и двух растений-регенерантов также показал 100% их сходство между собой. На полученной дендрограмме образец исходного растения и образцы растений-регенерантов из стерильной культуры объединились в один обособленный кластер.

Таким образом, проведенные исследования показали возможность использования ядерных и хлоропластных молекулярных маркеров, в том числе, для идентификации и подтверждения идентичности генотипов гибридных форм рододендронов при культивировании их *in vivo* и *in vitro*. Изучение участков геномов, которые используют при баркодинге и видовой идентификации, позволяет провести дополнительную верификацию систематической принадлежности растения, которое депонируется в живую коллекцию. Такой подход, на наш взгляд, позволяет получить результаты достаточно высокой степени достоверности, что является важнейшим условием для создания живых коллекций растений.

Благодарности. Работа выполнена в рамках ГЗ МГУ имени М.В. Ломоносова №121032500082-2 и ГЗ ГБС РАН № 122042700002-6

Авторы выражают благодарность научному сотруднику лаборатории дендрологии ГБС РАН им. Н.В. Цицина к.б.н. И.О. Яценко за предоставленный материал из коллекции открытого грунта.

Библиографический список

1. Васильева О.Г. Биолого-морфологические основы клонального микроразмножения некоторых представителей рода *Rhododendron* L. Автореферат дисс. канд. биол. наук. М.: ГБС РАН, 2009, 22 с.
2. Криницына А.А., Меркушкин Д.С., Чурикова О.А. Возможность использования системы SRAP для молекулярной паспортизации сортов сирени в сборнике Всероссийской конференции «Коллекции как основа изучения генетических ресурсов растений и грибов» (в рамках первого научного форума «Генетические ресурсы России», 21–24 июня 2022 г.). Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург, тезисы, с. 26.
3. Молканова О.И., Королева О.В., Стахеева Т.С., Крахмалева И.Л., Мелещук Е.А. Совершенствование технологии клонального микроразмножения ценных плодовых и ягодных культур для производственных условий. Достижения науки и техники АПК. – 2018. – Т.32. – № 9. – С. 66 – 69.
4. Anderson W.C. A revised tissue cultured medium for shoot multiplication of rhododendron. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 1984. – Vol. 109. – P. 343-347.
5. Chamberlain D.F. A revision of *Rhododendron* II: subgenus *Hyemantes*. Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh. – 1982. – Vol. 39. - P. 209 – 486.
6. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes. – 2006. – Vol. 6. – P. 288-295.
7. Zhang J.L., Zhang C.Q., Gao L.M. et al. Natural hybridization origin of *Rhododendron agastum* (Ericaceae) in Yunnan, China: inferred from morphological and molecular evidence. J Plant Res. – 2007. – Vol. 120. – P.457-463

УДК 573.6*595.796*57.017.642

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФОРМ МУРАВЬЕВ

*А.А. Власова, О.Е. Липатова, М.М. Моргунова, В.Н. Шелковникова М.Е. Дмитриева,
Т.Ю. Тельнова, Е.И. Мартынова, Е.В. Малыгина, Н.А. Имидоева, А.Ю. Бельшенко, С.С.
Шашкина, Т.Н. Вавилина, А.А. Баталова, А.С. Листопад, Д.В. Аксёнов-Грибанов*
Иркутский государственный университет, Россия

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF ANT EMBRYONIC FORMS

*A.A. Vlasova, O.E. Lipatova, M.M. Morgunova, V.N. Shelkovnikova, M.E. Dmitrieva, T.Y.
Telnova, E.I. Martynova, E.V. Malygina, N.A. Imidoeva, A.Y. Belyshenko, S.S. Shashkina, T.N.
Vavilina, A.A. Batalova, A.S. Listopad, D.V. Axenov-Gribanov*
Irkutsk State University

В ходе проведенного исследования выявлено, что экстракты яиц муравьев содержат циклические дипептиды, которые обладают антимикробной активностью в отношении некоторых штаммов микроорганизмов. Предполагается, что яйца муравьев представляют большой интерес с точки зрения содержания биологически активных веществ.

Ключевые слова: экстракты, яйца, муравьи, природные соединения, биотехнология

Муравьи (Formicidae) являются социальными насекомыми, которые живут большими колониями. На всех стадиях жизненного цикла насекомым угрожает множество хищников, паразитов и патогенов [4,14]. Чтобы противостоять этим угрозам, насекомые выработали механическую, химическую и поведенческую защиту, а также сложную иммунную систему. Физиологические и биохимические механизмы защиты включают фагоцитоз, коагуляцию, выработку антимикробных пептидов и пр. [2,11]. Известно, что у муравьев большое число экзокринных желез, которые используются для защиты от патогенов. В научной литературе чаще всего упоминаются метаплевральные, мандибулярные, ядовитые железы и железы Дюфура [5]. В настоящее время проводятся исследования, направленные на изучение химического состава и антибиотической активности железистых выделений муравьев [1,9]. При этом предполагается, что биотехнологическим потенциалом могут обладать не только муравьи, но и их яйца, поскольку яйца, так же, как и взрослые особи, могут содержать биологически активные природные соединения. Яйца, личинки и куколки насекомых развиваются в почве и являются богатыми источниками питательных веществ и подвержены заражению различными природными патогенами. Для муравьев известно, что их яйца обладают конститутивной защитой от микробной инфекции, которая включает иммуноревалентные белки и антимикробные пептиды [7]. Принимая во внимание низкую степень изученности объекта исследования и такую медицинскую проблему как антибиотикорезистентность, целью настоящей работы являлась оценка состава природных соединений и изучение антимикробной активности экстрактов яиц муравьев.

Экстракцию яиц муравьев проводили трехкратно с использованием метанола и 10% трихлоруксусной кислоты. Полученные экстракты переносили в хроматографические вials. Анализ проводили на газовом хромато-масс-спектрометре GCMS-QP2010 Ultra («Shimadzu», Япония) с электронной ионизацией. Энергия ионизации составляла 70эВ. Для разделения природных соединений экстрактов использовали колонку GsBP-5MS с геометрическими размерами 0,25 мкм × 0,25 мм × 30 м. Условия хроматографической системы представлены градиентом температур от 45 до 270°C. Скорость подъема температуры составляла 13,0°C/мин. Длительность изотермы составляла 30 мин. Полученные хроматограммы обрабатывали с

помощью программного обеспечения AMDIS. Идентификацию природных соединений выполняли с использованием библиотек масс-спектров Wiley, NIST14.

Оценку антимикробной активности проводили с применением диско-диффузионного метода в отношении 18 модельных тест-культур [11]. Для этого метанольный экстракт яиц муравьев наносили на бумажные диски и высушивали. Далее диски переносили на твердые питательные среды с бактериальными и грибными тест-культурами, чашки Петри помещали в термостат (СПУ ТС-1/20, СКТБ СПУ, Россия) и инкубировали в течение суток

С использованием газовой хроматографии и масс-спектрометрии была проведена оценка состава природных соединений, содержащихся в яйцах муравьев. В экстрактах яиц муравьев были идентифицированы циклические дипептиды и жирные кислоты. Из циклических дипептидов были обнаружены следующие: Цикло(-Про-Ала) со временем удерживания 19,1657, Цикло(-Про-Вал) - 20,3743, Цикло(-Про-Лей) - 21,6557, Цикло(-Иле-Про) - 21,456 и Цикло(-Фен-Про) - 25,8167. Среди жирных кислот были обнаружены пальмитиновая и стеариновая жирные кислоты со временами удерживания 21,9613 и 24,1627, соответственно.

Известно, что циклические дипептиды применяются как противоопухолевые, противовирусные, антибактериальные, противовоспалительные, антигипергликемические средства [11]. Ранее показано, что бактерии рода *Streptomyces* sp. способны продуцировать соединения, которые подавляют активность микотоксигенных грибов, а в составе бактериальных экстрактов присутствуют циклические дипептиды, такие как цикло(-Про-Тир) и цикло(-Про-Вал) [3,10]. В исследовании Yang et al 2020 показано, что *Talaromyces wortmannii* синтезирует множество биологически активных вторичных метаболитов, включая алкалоиды, лактоны и дипептиды цикло(-Про-Лей) [12].

При оценке антимикробной активности экстрактов выявлено, что полученные экстракты обладают антибактериальной активностью в отношении бактерий *Pseudomonas putida* B-4589, *Kocuria rhizophila* B-5389, *Escherichia coli* B-6645, *Escherichia coli* tolC KanR. Поскольку идентифицированные циклические дипептиды обладают антимикробной активностью, предположено, что именно данные молекулы ответственны за антимикробную активность экстрактов яиц муравьев.

Устойчивость к антибиотикам является одной из самых больших угроз для здоровья человека, тогда как антимикробные пептиды обладают большими перспективами для практического внедрения, поскольку их использование не приводит к развитию устойчивости [8]. Известно, что защита яиц от микробных инфекций может обеспечиваться самими яйцами. Например, известно, что свежееотложенные яйца *Manduca sexta* экспрессируют гены, связанные с иммунным ответом и синтезом антимикробных пептидов [6]. В нашем исследовании показано, что экстракты яиц муравьев обладают антимикробной активностью в отношении некоторых модельных штаммов микроорганизмов, и предположено, что антимикробная активность может быть связана с наличием циклических дипептидов. Принимая во внимание значимость и перспективу изучения антимикробных пептидов, предположено, что яйца муравьев могут стать новым источником для скрининговых исследований в области физиологически активных веществ.

Благодарности. Исследование проведено при поддержке проектов Минобрнауки России (Проекты FZZE 2024-0011 и FZZE 2024-0003).

Библиографический список

1. Assessment of nutrients of escamoles ant eggs *Limotepum apiculatum* M. by spectroscopy methods / V. Melo-Ruiz [et al.] // Journal of Chemistry and Chemical Engineering. 2013. V. 7. №. 12. P. 1181.
2. De Roode J.C., Lefèvre T. Behavioral Immunity in Insects // Insects. 2012. V.3 №3. P. 789-820.
3. Efficacy of metabolites of a *Streptomyces* strain (AS1) to control growth and mycotoxin production by *Penicillium verrucosum*, *Fusarium verticillioides* and *Aspergillus fumigatus* in culture / A.M. Danial [et al.] // Mycotoxin Research. 2020. V. 36. № 2. С. 225-234.
4. External immunity in ant societies: sociality and colony size do not predict investment in antimicrobials / C. Penick [et al.] // Royal Society Open Science. 2018. V. 5. P. 1-8.

5. Guarda C., Lutinski J.A. Glandular secretions of ants (Hymenoptera: Formicidae): A review on extraction, chemical characterization and antibiotic potential // *Sociobiology*. 2020. V. 67. № 1. P.13–25.
6. Hilker M., Salem H., Fatouros N. E. Adaptive plasticity of insect eggs in response to environmental challenges // *Annual Review of Entomology*. 2023. V. 68. №. 1. P. 451-469.
7. Kaltenpoth M., Engl T. Defensive microbial symbionts in Hymenoptera // *Functional Ecology*. 2014. V. 28. №. 2. P. 315-327.
8. Kumar P., Kizhakkedathu J.N., Straus S.K. Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo // *Biomolecules*. 2018.V. 8. №. 1. P. 4.
9. Melo G.M., Fortich M.R.O. Actividad antibacterial de extractos de hormigas de los géneros *Crematogaster* *Solenopsis* // *Revista Colombiana de Ciencias Químico- Farmacéuticas*. 2013. V. 42. P. 42-55.
10. Profiling of gene expression in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in response to cyclo-(L-Val-L-Pro) and chloramphenicol isolated from *Streptomyces* sp., SUK 25 reveals gene downregulation in multiple biological targets / N.M. Zin [*et al.*] // *Archives of Microbiology*. 2020. V. 202. №8. P. 2083-2092.
11. Ruangpan L. Minimal inhibitory concentration (MIC) test and determination of antimicrobial resistant bacteria. Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment.: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center, 2004. 31-55pp.
12. Secondary metabolites of the endophytic fungi *Talaromyces wortmannii* cultivated in maize medium and their bioactivity / B. Yang [*et al.*] // *Chemistry of Natural Compounds*. 2020. V. 56. C. 1143-1145.
13. Starr A.M., Zabet-Moghaddam M., San Francisco M. Identification of a novel secreted metabolite cyclo (phenylalanyl-prolyl) from *Batrachochytrium dendrobatidis* and its effect on *Galleria mellonella* // *BMC microbiology*. 2022. V. 22. №. 1. P. 293.
14. Tranter C., Fernandez-Marin A., Hughes W.O. Quality and quantity: transitions in antimicrobial gland use for parasite defense // *Ecology and Evolution*. 2015. V. 5. P. 5857-5868.

УДК 631.46: 631.461.5

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПОЧВЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ*И.А. Дегтярева, Ш.З. Валидов*

*Лаборатория молекулярно-генетических и микробиологических методов Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук»,
Казань, Россия*

Выделение автохтонных штаммов для создания на их основе микробных препаратов при выращивании сельскохозяйственных культур является экологически целесообразным приемом для получения высококачественной конкурентоспособной растениеводческой продукции, сохранения плодородия почвы и окружающей среды. Для эффективного применения биопрепаратов необходимы глубокие исследования взаимоотношений в системе почва – микроорганизмы – растение с учетом экологических законов ее функционирования. Лаборатория молекулярно-генетических и микробиологических методов Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», имея современное высокоточное оборудование, ориентирована на решение проблем эффективности биопрепаратов при их использовании в открытом грунте, а также внедрении молекулярно-генетических методов для анализа консорциумов микроорганизмов, характеристике наиболее перспективных штаммов и разработке систем мониторинга фитопатогенов в решении проблем защиты растений. Детально изучается микрофлора культурных растений (более шести тысяч бактериальных изолятов) и создаются консорциумы, состоящие из полезных и совместимых между собой автохтонных микроорганизмов. В модельных системах выделяются новые штаммы – агенты биологической защиты растений. Штаммы бактерий, прошедшие все этапы отбора (определение различных типов ферментативных активностей, исключение повторов и патогенов, проверка антагонистических и колонизирующих свойств, способности к синтезу индол-3-уксусной кислоты (ИУК)), представлены четырьмя условными группами: (1) бактерии, способные колонизировать корневую систему растений; (2) бактерии – антагонисты фитопатогенных грибов; (3) бактерии – продуценты ИУК; (4) бактерии, стимулирующие рост растений за счет своих ферментативных активностей. Конкретный консорциум собирается из четырех штаммов (по одному из каждой группы) для проверки совместимости. Поэтапная экспресс-диагностика перспективных штаммов позволяет сократить сроки работ по выделению агентов биозащиты растений без потери качества выделяемых штаммов. ДНК-фингерпринтинг изолятов с помощью ВОХ-ПЦР значительно сокращает количество изолятов без потери штаммового разнообразия, удаляя клоны одного и того же штамма в пробе. При идентификации можно избавиться от потенциально патогенных штаммов, применение которых нежелательно. В процессе исследований выявлены биосинтетические гены и кластеры генов, задействованные в продукции широкого ряда вторичных метаболитов и ферментов, что подтверждает обоснованность выбора данных штаммов как потенциальных биоконтрольных агентов и их дальнейшее исследование для создания биопрепаратов. Созданы образцы биопрепаратов комплексного действия, эффективность которых экспериментально доказана в модельных системах.

Ключевые слова: почва, микроорганизмы, ферментативная активность, генотипирование, фунгистатический эффект, биологическая защита растений

Введение. Одним из основных и определяющих факторов почвенного плодородия является изучение почвенной и ризосферной микрофлоры. Именно состав микробных сообществ определяет функционирование почвенной экосистемы в соответствии с биогеохимическими процессами и позволяет оценить ее состояние [1, 2]. Почва является уникальной биологической мембраной, главным природным банком при поиске микроорганизмов с любыми необходимыми свойствами [3-5].-

Лаборатория молекулярно-генетических и микробиологических методов ФИЦ КазНЦ РАН, имея современное высокоточное оборудование, ориентирована на решение проблем эффективности биопрепаратов при их использовании в открытом грунте, а также внедрении молекулярно-генетических методов для анализа консорциумов микроорганизмов, характеристике наиболее перспективных штаммов и разработке систем мониторинга фитопатогенов в решении проблем защиты растений. Детально изучается микрофлора культурных растений и создаются консорциумы, состоящие из полезных и совместимых между собой автохтонных микроорганизмов. В модельных системах выделяются новые штаммы – агенты биологической защиты растений.

В перечне значимых этапов после выделения автохтонных штаммов из почв различных типов и ризосферы важнейших сельскохозяйственных культур является их отбор по полифункциональным свойствам с последующей идентификацией. Среди выявляемых характеристик важной является проверка ферментативной активности микроорганизмов, связанная с их функциональными характеристиками. Этот показатель относится к способности бактерий производить различные ферменты (протеолитические, амилолитические, хитинолитические и др.), играющие ключевую роль в различных биохимических процессах. Изучение ферментативной активности, для проверки которой используют различные методы (химический, спектрофотометрия, изучение продуктов ферментативной реакции, электрофорез), позволяет понять потенциал бактерий для различных биотехнологических приложений (средства биозащиты, очистка сточных вод, производство пищевых продуктов, медицинское применение и другие области) [6-8].

Важным этапом является генотипирование, позволяющее определить молекулярно-генетические характеристики каждого штамма. Современные методы генотипирования бактерий разделяют на три основные категории: методы, основанные на фрагментном анализе (DNA banding pattern), секвенирование и гибридизация ДНК. Наиболее быстрым и технологичным способом идентификации микроорганизмов является сравнительный анализ генов 16S рРНК у эубактерий и анализ межгенных спейсеров ITS1, ITS2 у эукариотических микроорганизмов. Необходимым является и полногеномное секвенирование новых штаммов.

В дальнейшем специальные методики позволяют выявить совместимые штаммы и использовать их в виде консорциума с комплексным положительным действием на растение. Перечисленные методы имеют важное значение для идентификации и классификации бактерий, а также их депонирования с целью их дальнейшего использования на практике. Алгоритм для быстрого и качественного выявления эффективных штаммов для целей биозащиты позволяет не только сократить время для выделения сельскохозяйственно значимых автохтонных штаммов и оценить их биотехнологический потенциал, но и в дальнейшем использовать наиболее перспективные из них в качестве основы создаваемых биопрепаратов.

Цель исследований – создание алгоритма конструирования консорциумов на основе эффективных автохтонных штаммов для создания биопрепаратов в растениеводстве.

Описание методов и методик проводимого исследования. Отбор и учет количества аэробных ассоциаций микроорганизмов проводили по методике О.И. Колешко [9]. Спектр различных активностей бактериальных изолятов включал определение: способности к гидролизу крахмала за счет продукции внеклеточных амилаз – на модифицированной среде ААМ (amylase activity medium) [10]; внеклеточных липаз – на среде с добавлением среды Tween 80 (полиоксиэтилен сорбитан моноолеат) как аналога высокомолекулярных жирных кислот [11]; способности к азотфиксации – на среде Йенсена [12]; протеаз и хитиназ – на модифицированной среде ВМ (basal medium) с добавлением 1% сухого обезжиренного молока [13] и 1% хитина соответственно [14]; целлюлаз и фитаз – на среде ВМ с добавлением 1% карбоксиметилцеллюлазы натриевой соли [15] и среде PSM (phytase screening medium) [16] соответственно. Антагонистическую активность выделенных бактерий против патогенных микроорганизмов определяли, внося в чашку Петри со средой PDA (potato dextrose agar) в равноудаленном расстоянии друг от друга 3 мкл суспензии изолятов бактерий и 2 мкл суспензии фитопатогенного гриба. Количественное определение индол-3-уксусной кислоты (ИУК) проводили колориметрическим методом по S.A. Gordon и R.P. Weber [17]. Стерильные

гнотобиотические системы использовали для изучения макроорганизмов, свободных от воздействия других организмов [18]. Статистический анализ проводили с использованием пакета программ OriginLab pro SR1 b9.5.1.195. Достоверную разницу между группами проверяли с использованием одностороннего ANOVA и апостериорного теста Тьюки на достоверно значимую разницу при $p < 0,05$.

Полученные результаты и их обсуждение. Из различных почв Республики Татарстан выделено более шести тысяч бактериальных изолятов – непосредственно из почв различных типов и ризосферы важнейших сельскохозяйственных культур (озимая и яровая пшеница, рапс, подсолнечник, кукуруза, ячмень). В качестве первичных селективных параметров проанализирована способность изолятов к мобилизации основных неорганических элементов (азота и фосфора), способность к разложению сложных органических соединений (целлюлозы, крахмала, липидов) и предрасположенность к антагонистической активности, а именно наиболее предпочтительные в случае биоконтрольных агентов ферментативных активностей (амилазная, липазная, протеиназная, фитазная и др.).

Так, амилазная активность детектирована при гидролизе крахмала в среде по образованию зон просветления при окраске среды раствором Люголя. Внеклеточная липазная активность у бактериальных изолятов выявлена по наличию вокруг колоний непрозрачной зоны кальциевых солей жирных кислот, освобожденных из Tween 80. Штаммы, растущие на среде Йенсена, отобраны как способные фиксировать атмосферный азот. Вокруг колоний бактериальных изолятов, обладающих протеиназной активностью, отмечены зоны просветления, образуемые в результате гидролиза казеина в среде. Штаммы, проявляющие протеолитическую и хитиназную активности, образуют зоны просветления вокруг колоний. Целлюлолитическая активность идентифицирована методом детекции зон просветления (желтого цвета) вокруг колонии после окрашивания конго красным, образующимся в связи с разрушением целлюлозы и образованием ее комплексов с красителем. О наличии антагонистической активности свидетельствуют зоны подавления.

Впоследствии штаммы бактерий, прошедшие все этапы отбора (определение различных типов ферментативных активностей, исключение повторов и патогенов, проверка антагонистических и колонизирующих свойств, способности к синтезу ИУК), разделены на четыре условные группы: (1) бактерии, способные колонизировать корневую систему растений; (2) бактерии – антагонисты фитопатогенных грибов; (3) бактерии – продуценты ИУК; (4) бактерии, стимулирующие рост растений за счет своих ферментативных активностей. Конкретный консорциум собирается из четырех штаммов (по одному из каждой группы) для проверки совместимости. При отсутствии возможности совместимости штаммов внутри консорциума в данной системе образуются зоны подавления различной величины. Метод совмещения штаммов позволяет получить консорциумы, эффективность которых экспериментально доказана и в модельных системах [19]. Эксперименты на совместимость подходят только как первичный скрининг бактериального консорциума. Питательные среды, как правило, не моделируют условия голодания, синтеза некоторых метаболитов, антитоксинов и иных веществ, которые могут образовываться при взаимодействии с растением и играют значимую роль в формировании и функционировании консорциума.

Дальнейшие исследования бактериального консорциума, полученного методом подбора совместимых штаммов, включают удержание изолятов в прикорневой зоне. Поэтапная экспресс-диагностика перспективных штаммов позволяет сократить сроки работ по выделению агентов биозащиты растений без потери качества выделяемых штаммов. ДНК-фингерпринтинг изолятов с помощью ВОХ-ПЦР значительно сокращает количество изолятов без потери штаммового разнообразия, удаляя клоны одного и того же штамма в пробе. При идентификации можно избавиться от потенциально патогенных штаммов, применение которых нежелательно. Проводится полногеномное секвенирование отобранных потенциальных биоконтрольных штаммов и предоставляется полная характеристика данных штаммов на уровне генома. В процессе исследований выявлены биосинтетические гены и кластеры генов, задействованные в продукции широкого ряда вторичных метаболитов и ферментов, что подтверждает

обоснованность выбора данных штаммов как потенциальных биоконтрольных агентов и их дальнейшее исследование для создания биопрепаратов.

Выводы. Таким образом, выделение автохтонных штаммов для создания на их основе микробных препаратов при выращивании сельскохозяйственных культур является экологически целесообразным приемом для получения высококачественной конкурентоспособной растениеводческой продукции, сохранения плодородия почвы и окружающей среды. Для эффективного применения биопрепаратов необходимы глубокие исследования взаимоотношений в системе почва – микроорганизмы – растение с учетом экологических законов ее функционирования. Изучение почвенных микроорганизмов является важным направлением в науке о почве, которое может принести значительные экономические и экологические выгоды.

Считаем, что междисциплинарные фундаментальные и прикладные исследования в микробиологии, генетике, молекулярной биологии, биоинженерии по проблеме автохтонных штаммов, создаваемых на их основе эффективных консорциумов и биопрепаратов, способствуют решению приоритетного направления развития науки, технологий и техники в Российской Федерации, а именно проблеме рационального природопользования.

Благодарности. Работа выполнена в рамках Государственного задания № FMEG-2021-0003, регистрационный номер 121021600147-1.

Библиографический список

1. Cookson W.R., Murphy D.V., Roper M.M. Characterizing the relationships between soil organic matter components and microbial function and composition along a tillage disturbance gradient // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2008. – № 40. – P. 763-777. DOI:10.1016/j.soilbio.2007.10.011.
2. Griffiths B.S., Philippot L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2012. – № 37. – P. 112-129. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00343.x.
3. Умаров М.М., Кураков А.В., Степанов Л.А. Микробиологическая трансформация азота в почве. – М.: ГЕОС, 2007. – 138 с.
4. Дегтярева И.А., Яппаров Д.А., Хидиятуллина А.Я., Зарипова С.К. Оценка эффективности жидких форм биопрепаратов // *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана*. – 2013. – Т. 215. – С. 96-100.
5. Дегтярева И.А., Бабынин Э.В., Сироткин А.С., Яппаров И.А. Биоремедиация почв: методы и подходы. Учебно-методическое пособие. – Казань: Изд-во КНИТУ, 2018. – 100 с.
6. Bergmeyer H.U. *Methods of enzymatic analysis*. – Elsevier, 2012. – 1088 p.
7. Hooff G.P., Van Kapmen J., Mesteers R.J.V., Van Belkum A. et al. Characterization of β -lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry // *Journal of proteome research*. – 2012. – Vol. 11. – № 1. – P. 79-84. DOI:10.1021/pr200858r.
8. Šebela M. The use of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in enzyme activity assays and its position in the context of other available methods // *Mass Spectrometry Reviews*. – 2023. – Vol. 42. – № 3. – P. 1008-1031. DOI:10.1002/mas.21733.
9. Колешко О.И. Экология микроорганизмов почвы. Лабораторный практикум // Минск: Высшая школа, 1981. – 175 с.
10. Nimisha P., Moksha S., Gangawane A.K. Amylase activity of starch degrading bacteria isolated from soil // *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. – 2019. – Vol. 8. – № 4. – P. 659-671. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijemas.2019.804.071>.
11. Kumar D., Kumar L., Nagar S., Raina C., Parshad R., Gupta V.K. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions // *Archives of Applied Science Research*. – 2012. – Vol. 4. – № 4. – P. 1763-1770.
12. Zebua A.C., Guchi H., Sembiring M. Isolation of non-symbiotic Nitrogen-fixing bacteria on andisol land affected by Sinabung eruption // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – IOP Publishing, 2020. – Vol. 454. – № 1. – P. 012167. DOI: 10.1088/1755-1315/454/1/012167.

13. Sharma A.K., Sharma V., Saxena J., Yadav B., Alam A., Prakash A. Isolation and screening of extracellular protease enzyme from bacterial and fungal isolates of soil // *International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences*. – 2015. – Vol. 3. – № 9. – P. 334-340. DOI:10.12983/ijres-2015-p0334-0340.
14. Krithika S., Chellaram C. Isolation, screening, and characterization of chitinase producing bacteria from marine wastes // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2016. – Vol. 8. – № 5. – P. 34-36.
15. Islam F., Roy N. Screening, purification and characterization of cellulase producing bacteria in molasses // *BMC research notes*. – 2018. – Vol. 11. – № 1. – P. 1-6. DOI:10.1186/s13104-018-3558-4.
16. Singh N.K., Joshi D.K., Gupta R.K. Isolation of phytase producing bacteria and optimization of phytase production parameters // *Jundishapur Journal of Microbiology*. – 2013. – Vol. 6. – № 5. <https://doi.org/10.5812/jjm.6419>.
17. Gordon S.A., Weber R.P. Colorimetric estimation of indole-3-acetic acid // *Plant physiology*. – 1951. – Vol. 26. – № 1. – P. 192. DOI:10.1104/PP.26.1.192.
18. Luckey T. *Germfree life and gnotobiology*. – Elsevier, 2012. – 536 p.
19. Diabankana R.G.C., Shulga E.U., Validov S.Z., Afordoanyi, D.M. Genetic characteristics and enzymatic activities of *Bacillus velezensis* KS04AU as a stable biocontrol agent against phytopathogens // *International Journal of Plant Biology*. – 2022. – Vol. 13. – № 3. – P. 201-222. <https://doi.org/10.3390/ijpb13030018>.

УДК 632.911.2

ПРОТЕОМНЫЙ И ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ПОДХОДЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОВ "УСТОЙЧИВОСТИ" У ГОРОХА

А.М. Егорова

*Казанский институт биохимии и биофизики - структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр Российской академии наук", Казань, 420111 Россия
egorova@kibb.knc.ru*

Проведен анализ экспрессии генов и синтеза белков, индуцируемых ключевыми факторами фитоиммунитета – салициловой и жасмоновой кислотами в корнях гороха. Показано, что наиболее сильно индуцируемыми белками являются не общепринятые маркерные белки характерные для каждого фитогормона. Салициловая кислота наиболее значительно индуцирует хитиназа-подобные белки в корнях гороха, тогда как жасмонат-зависимыми белками являются ингибиторы протеиназ типа Куница.

Ключевые слова: фитоиммунитет, салициловая кислота, жасмоновая кислота, маркерные гены, устойчивость растений

PROTEOME AND TRANSCRIPTOME APPROACHES FOR THE IDENTIFICATION OF "RESISTANCE" GENES IN PEA

A.M. Egorova

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, P.O. Box 30, Kazan, 420111, Russia

Analysis of gene expression and protein synthesis induced by key phytoimmunity factors – salicylic and jasmonic acids in pea roots was carried out. It was shown that the most strongly induced proteins are not the generally accepted marker proteins characteristic of each phytohormone. Salicylic acid most significantly induces chitinase-like proteins in pea roots, while jasmonate-dependent proteins are Kunitz-type proteinases inhibitors.

Keywords: phytoimmunity, salicylic acid, jasmonic acid, marker genes, plant resistance

Фитогормоны участвуют во всех процессах роста и развития растений. Защитные реакции растений в ответ на действие патогенных микроорганизмов, неблагоприятных факторов среды так же регулируются фитогормонами [1]. Стрессовые фитогормоны, включающие этилен, абсцизовую, салициловую и жасмоновую кислоты, участвуют как в процессах нормального роста и развития растений, но их основная роль связана с защитными реакциями растений при действии абиотических и биотических стрессовых факторов. Ключевыми факторами фитоиммунитета в растениях являются салициловая (СК) и жасмоновая кислоты (ЖК). Считается, что СК участвует в реализации защитного ответа при действии биотрофных и полубиотрофных патогенов, питающихся живыми тканями растений, тогда как ЖК участвует, главным образом, в защите о некротрофных патогенов и травоядных насекомых. Атака патогенов приводит к образованию сигнальных молекул и активации сигнальных путей, активируемых тем или иным фитогормоном. В зависимости от того, какой сигнальный путь активируется будет отличаться и ответ растения на патогены. Активация сигнального каскада приводит к изменению экспрессии генов и синтеза белков. Среди этих белков есть как белки с прямым антипатогенным действием, так и участников синтеза защитных соединений.

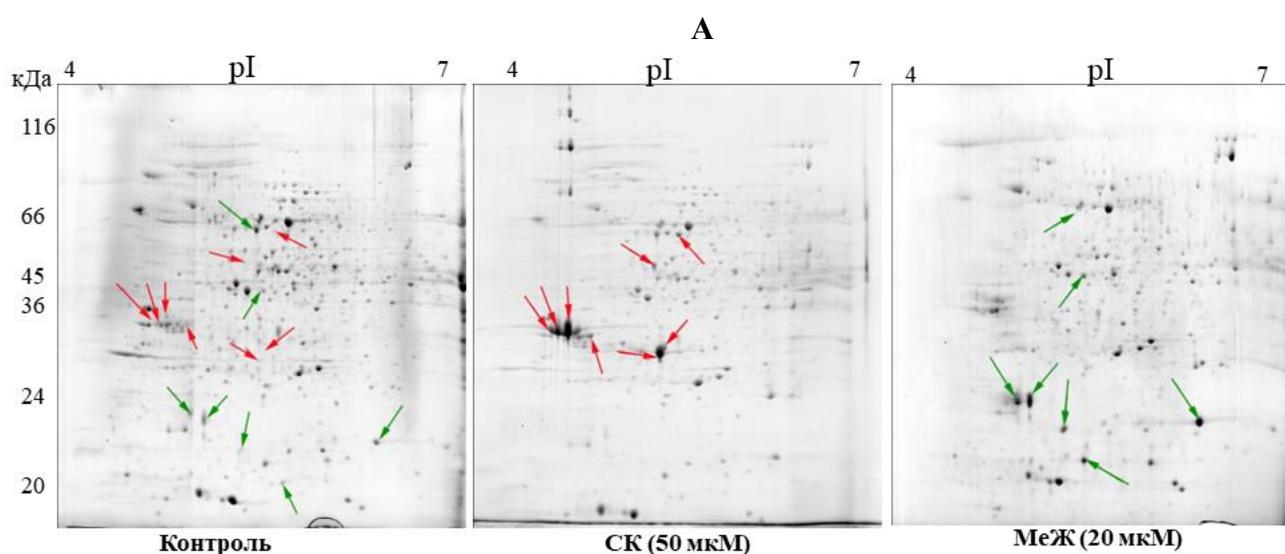
Активация того или иного фитогормон-зависимого сигнального пути в растениях часто оценивается по анализу экспрессии так называемых «маркерных» генов. В основном, эти гены

выявлены и охарактеризованы на модельных растениях - Арабидопсисе, рисе, сое и в основном, на надземных органах. Но не всегда результаты, полученные на модельных растениях, могут безоговорочно применяться относительно всех видов растений. В этой связи, выявление особенностей, характерных для того или иного вида растения, причем наиболее важно это в отношении сельскохозяйственных культур, может предоставить дополнительную информацию об особенностях их защитных реакций.

Анализ и идентификация белков, изменяющихся под влиянием фитогормонов позволяет расшифровать механизм и защитную стратегию растений. Ключевыми подходами для анализа изменения экспрессии генов является транскриптомный подход, позволяющий проанализировать всю совокупность экспрессирующихся в растении генов и изменение их экспрессии при изменении условий. Другим мощным инструментом анализа белков является протеомный подход, позволяющий проанализировать изменение содержания белков и провести их идентификацию.

В последние годы все большее внимание уделяется процессам, происходящим в ризосфере, от которых зависит урожай сельскохозяйственных растений. Отмечается скудная информация о взаимоотношениях населения ризосферы с корнями, с выделяемыми ими соединениями, в том числе с антипатогенными. Так, в нашей лаборатории активно изучается влияние ключевых факторов фитоиммунитета – салициловой, жасмоновой кислот, и других участников фитоиммунитета – азелаиновой кислоты и NO на изменение экспрессии генов и содержания белков. Основное внимание уделяется корням растений, поскольку по сравнению с надземными органами их реакция и защитные ответы менее изучены. Кроме того, корни находятся в постоянном контакте с обитателями почвы, отличающимися от «надземных» патогенов, что может являться причиной различий в реализации защитных ответов в листьях и корнях [2]. Объектом наших исследований является горох, поскольку он занимает значительные площади посевов в регионе, кроме того, является важным источником белка как для корма животных, так и в рационе людей. Был идентифицирован целый ряд белков.

Салицилат-зависимые защитные реакции характеризуются активацией белков, связанных с патогенезом (PR proteins). Показано, что гены относящиеся к PR1, PR2 PR5 являются СК-зависимыми и их экспрессия регулируется СК. PR1 охарактеризован как цистенин-обогащенный секреторный белок [3], PR2 белки – это β -1,3-глюканызы, относящиеся к гликозид гидролазам сем. 17 [4] к PR5 относится к тауматинам [5]. Так же к числу СК-индуцируемых белков относятся хитиназы, разрушающие хитин клеточных стенок патогенных грибов и бактерий.



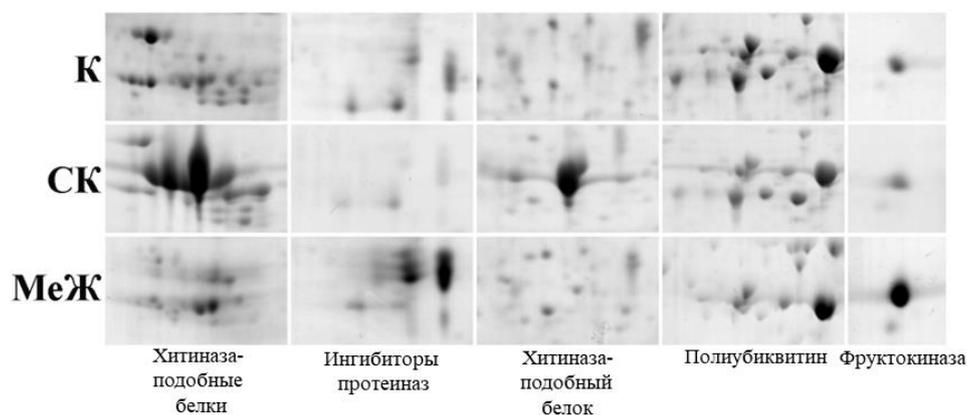


Рис. 1. Двумерные электрофореграммы растворимых белков корней гороха (А) контрольного, обработанных салициловой кислотой (50 мкМ, 72 ч) и метилжасмонатом (20 мкМ, 72 ч). Стрелками указаны белки, содержание которых наиболее значительно изменяется под влиянием фитогормонов. (Б) – фрагменты двумерных электрофореграмм с выделенными салицилат- и жасмонат- индуцируемыми белками. Разделение белков по изоэлектрической точке проводилось на стрипах с иммобилизованным градиентом рН 4-7 (BioRad, США). Разделение по молекулярным массам проводилось в 12,5% ДДС-ПАГЭ, на стрипы нанесено 550 мкг белка.

Проведенный нами протеомный анализ растворимых белков корней гороха обработанных СК (50 мкМ) позволил выявить группу белков, содержание которых наиболее значительно повышалось в корнях гороха (Рис. 1). Эти белки были идентифицированы как хитиназа-подобные белки. На двумерных электрофореграммах выявлено повышение содержания четырех изоформ хитиназа-подобных белков. По сравнению с активными хитиназами они не способны расщеплять хитин (статья в печати). Транскриптомный анализ показал, в корнях гороха повышается экспрессия пяти генов, кодирующих хитиназа-подобные белки, кодируемых генами Psat1g147600, Psat1g147560, Psat1g149120, Psat1g149040, Psat1g148600. Именно эти белки являются наиболее сильно индуцируемыми при действии СК в корнях гороха. В контрольном варианте хитиназа-подобные белки практически не экспрессируются, и их экспрессия повышается в тысячи раз уже через 12 ч действия СК (Рис.2). Активация у растений гороха хитиназа-подобных белков может являться одним из способов «обхитрить» патогены и иметь в своем арсенале дополнительный защитный механизм, поскольку в отношении активных хитиназ патогены выработали способы их инактивации [6]. Структурная схожесть хитиназа-подобных белков с активными хитиназами позволило ускорить приобретение этого нового механизма и их индукция под влиянием одного из ключевых факторов фитоиммунитета – СК, может говорить об их роли во взаимоотношениях с патогенными микроорганизмами.

Кроме того, в корнях гороха мы не обнаружили значительного повышения содержания активных хитиназ, β -1,3-глюканаз повышение содержания которых характерно для листьев гороха [7]. В тоже время, транскриптомный анализ показал, что мажорная хитиназа, аннотированная как эндохитиназа и относящаяся к гликозид гидролазам 19 сем. повышается в первые 12 часов действия СК. К третьим суткам действия СК уровень ее экспрессии возвращается к контрольным значениям. Таким образом, один лишь протеомный подход не всегда позволяет выявить изменение содержания белка, если не поводить анализ в динамике. Так же и транскриптомный подход наиболее информативен при изучении нескольких временных точек для выявления более целостной картины.

Кроме того, протеомный анализ показал изменение содержания белков, участвующих в метаболизме белков, нуклеиновых кислот, сигналинге, фенольном метаболизме [7].

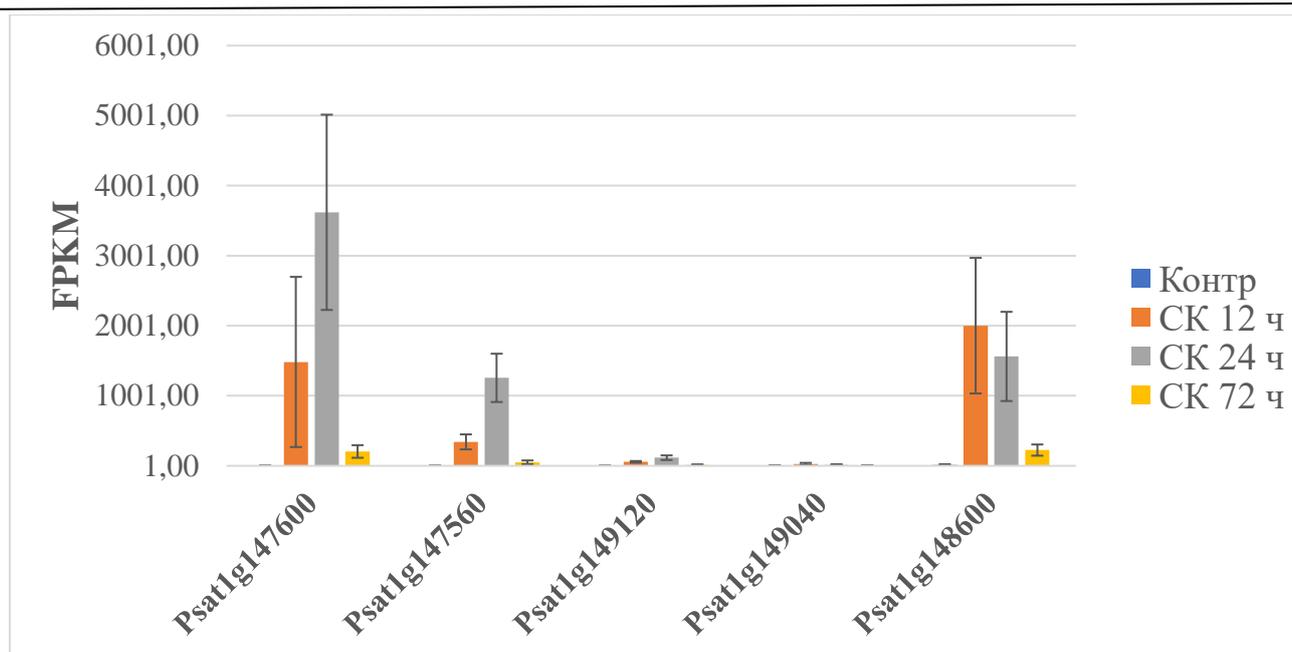


Рисунок 2. Транскриптомный анализ экспрессии генов хитиназа-подобных белков в корнях гороха при действии СК (50 мкМ) в течение 12 ч, 24 ч и 72 ч. FPKM – выровненные значения экспрессии генов (количество фрагментов на килобазу на миллион отображенных фрагментов).

Маркерными белками, характерными для активации жасмонатного сигналинга являются дефенсины (PDF1.2), вегетативные запасные белки (VSP1). Протеомный анализ белков корней гороха обработанных метилжасмонатом (МеЖ) – производным ЖК показал, что ответ корней отличается от той картины, которая наблюдалась при действии СК (Рис. 1). Обработка метилжасмонатом (МеЖ) приводила к повышению содержания ингибиторов протеиназ, ингибитора трипсина типа Куница, дефенсина, фруктоиназы [8].

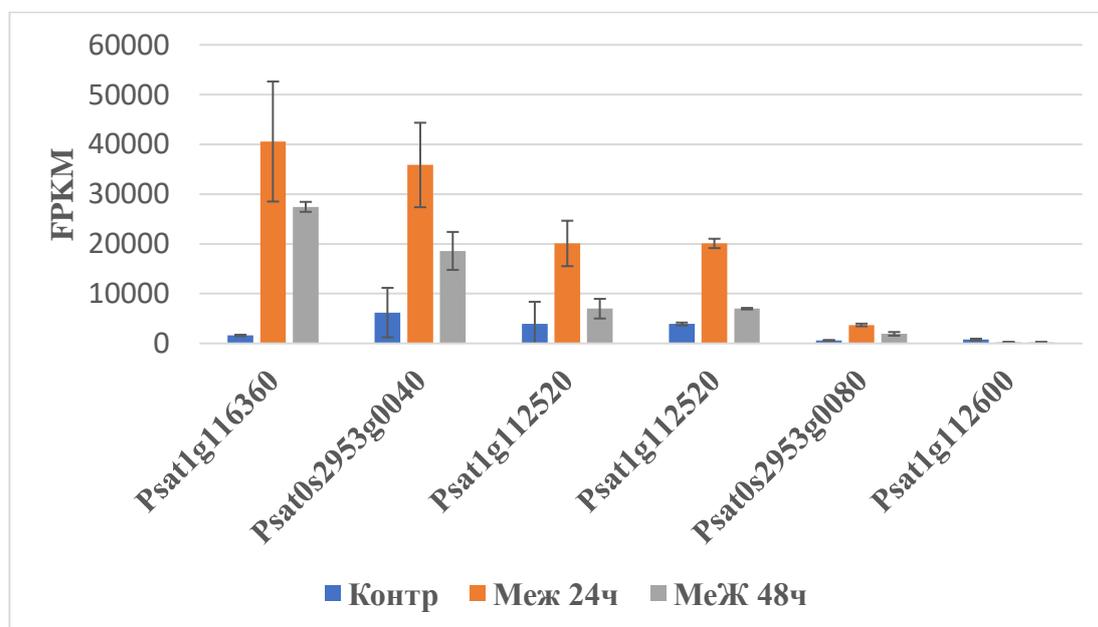


Рисунок 3. Транскриптомный анализ экспрессии генов ингибиторов протеиназ типа Куница в корнях гороха при действии МеЖ (20 мкМ) в течение 24 ч и 72 ч. FPKM – выровненные значения экспрессии генов (количество арагментов на килобазу на миллион отображенных фрагментов).

Наиболее сильно активировалось несколько изоформ ингибиторов протеиназ типа Куница, их содержание повышалось в 4-9 раз при действии МеЖ. Ингибиторы протеиназ являются защитными белками, проявляющими антибактериальную и антигрибную активности, но не

являются маркерными белками для действия жасмоната [9]. Транскриптомный анализ показал, что в корнях гороха экспрессируется шесть изоформ ингибиторов протеиназ, кодируемых генами Psat1g116360, Psat0s2953g0040, Psat1g112520, Psat0s2953g0080, Psat0s2953g0080, Psat1g112600. Экспрессия пяти из них повышалась через 24 ч и 72 ч действия МеЖ (Рис. 3).

Таким образом, приведенные в работе данные позволяют заключить, что не всегда маркерные гены являются теми же самыми генами, которые непосредственно участвуют в реализации защитного ответа, опосредованного тем или иным фитогормоном. Маркерный ген позволяет оценить активацию фитогормон-зависимого сигнального пути. Использование транскриптомного и протеомного подходов позволяет выявить активируемые фитогормонами защитных гены и белки, характерные для конкретного вида и, соответственно, участвующие в реализации защитного ответа при атаке патогенов. Эти особенности могут быть использованы в селекции этих видов в качестве маркеров устойчивых сортов, при разработке подходов для их защиты уже с учетом особенностей реализации защитного ответа и других агробιοтехнологических мероприятиях.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке гранта Академии наук Республики Татарстан и РФФ № 24-26-20123

Библиографический список

1. Pieterse C.M., Van der Does D., Zamioudis C., Leon-Reyes A., Van Wees S.C. Hormonal modulation of plant immunity // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2012. V. 28. P. 489-521.
2. Chuberre C., Plancot B., Driouich A., Moore J.P., Bardor M., Gügi B., Viché M. Plant immunity is compartmentalized and specialized in roots // *Front Plant Sci.* 2018. V. 9. 1692.
3. Gibbs G.M., Roelants K., O'Bryan M.K. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins—roles in reproduction, cancer, and immune defense // *Endocrine Reviews.* 2008. V. 29. P. 865–897.
4. Higa-Nishiyama A., Ohsato S., Banno S., Woo S.H., Fujimura M., Yamaguchi I., Kimura M. Cloning and characterization of six highly similar endo-1,3- β -glucanase genes in hexaploid wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006. 44, P. 666–673.
5. Petre B., Major I., Rouhier N., Duplessis S. Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. // *BMC Plant Biology.* 2011. V. 11. 33.
6. Han L.B., Li Y., Wang X., Wang W.Y., Liu J., Wu J.H., Zhong N.Q., Wu S.J., Jiao G.L. Wang H.Y., Xia G.X. The cotton apoplastic protein CRR1 stabilizes chitinase 28 to facilitate defense against the fungal pathogen *Verticillium dahlia* // *Plant Cell.* 2019. V. 31. 520-536.
7. Тарчевский ИА., Яковлева ВГ., Егорова АМ. Салицилат-индуцированная модификация протеомов у растений // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2010. Т. 46. №3. С. 263-275.
8. Яковлева ВГ., Егорова АМ., Тарчевский ИА. Протеомный анализ влияния метилжасмоната на корни проростков гороха // *Доклады Академии наук* 2013. Т. 449. №2. С. 236.
9. Bonturi C.R., Silva Teixeira A.B., Rocha V.M., Valente P.F., Oliveira J.R., Filho C.M.B., Fátima Correia Batista I., Oliva M.L.V. Plant Kunitz inhibitors and their interaction with proteases: current and potential pharmacological targets // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. N 9. 4742.

УДК 631.527:581.143.6

РАЗРАБОТКА ПРИНЦИПОВ ОТБОРА ЗАСУХОУСТОЙЧИВЫХ ГИБРИДОВ, ФОРМ И КЛОНОВ ТОПОЛЕЙ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

О.О. Жолобова, И.В. Могилевская, Т.В. Терещенко, А.М. Пугачёва, А.В. Солонкин
ФНЦ агроэкологии РАН, Волгоград, Россия

Аннотация. Защитные лесные насаждения из быстрорастущих и устойчивых к абиотическим стресс-факторам видов, гибридов и форм древесных пород необходимо создавать на основе новых, адаптированных к засухе и экстремальным условиям генотипов. Культура изолированных органов и тканей in vitro позволяет в лабораторных условиях проводить часть прикладных и фундаментальных исследований. Целью нашего исследования являлась разработка принципов отбора засухоустойчивых гибридов, форм и клонов тополей в культуре in vitro для ускоренного селекционного процесса. Новые генотипы тополей были получены после целенаправленного скрещивания отобранных родительских линий с использованием культуры изолированных зародышей из незрелых семенных коробочек. Для массового размножения полученных генотипов выбрана питательная среда по протоколу Murashige and Skoog, дополненная цитокинином метатополин в концентрации 0,2 мг/л. Хотя для размножения конкретного генотипа после отбора на устойчивость к засухе необходимо целенаправленно провести подбор оптимального состава питательной среды, т.к. регенерационная способность эксплантов носила ярко выраженный генотипический характер. Использование полиэтиленгликоля 6000 оказалось эффективным для моделирования водного дефицита в культуре in vitro и отбора засухоустойчивых генотипов *Populus* для дальнейших полевых испытаний.

Ключевые слова: *Populus*, микроклональное размножение, полиэтиленгликоль, осмотический стресс, засухоустойчивые генотипы

DEVELOPMENT OF PRINCIPLES OF SELECTION OF DROUGHT-TOLERANT HYBRIDS, FORMS AND CLONES OF POPLAR IN CULTURE IN VITRO

O.O. Zholobova, I.V. Mogilevskaya, T.V. Tereshchenko, A.M. Pugacheva, A.V. Solonkin
FSC Agroecology RAS, Volgograd, Russia

Abstract. Protective forest plantations of fast-growing and resistant to abiotic stress factors species, hybrids and forms of tree species must be created on the basis of new genotypes adapted to drought and extreme conditions. The culture of isolated organs and tissues in vitro makes it possible to carry out some applied and fundamental research in the laboratory. The purpose of our research was to develop principles for selecting drought-resistant hybrids, forms and clones of poplars in in vitro culture for an accelerated breeding process. New poplar genotypes were obtained after targeted crossing of selected parental lines using the culture of isolated embryos from immature seed pods. For mass propagation of the obtained genotypes, a nutrient medium was selected according to the Murashige and Skoog protocol, supplemented with the cytokinin metatopolin at a concentration of 0.2 mg/l. Although for the propagation of a specific genotype after selection for resistance to drought, it is necessary to purposefully select the optimal composition of the nutrient medium, because the regenerative ability of explants had a pronounced genotypic character. The use of polyethylene glycol 6000 was effective in simulating water stress in in vitro culture and selecting drought-tolerant *Populus* genotypes for further field trials.

Keywords: *Populus*, micropropagation, polyethylene glycol, osmotic stress, drought-resistant genotypes

На территориях с засушливым климатом и нарастающими очагами опустынивания очень остро стоит вопрос о создании орошаемых площадей и увеличению количества зеленых насаждений. Защитные лесные насаждения из быстрорастущих и устойчивых к абиотическим стресс-факторам видов, гибридов и форм древесных пород, в том числе и представителей рода *Populus*, необходимо создавать на основе новых, адаптированных к засухе и экстремальным условиям генотипов [4].

В последние годы селекционеры используют в своей работе новейшие технологии, основанные на достижениях в области геномики, эпигенетики и микроразмножения, которые способны значительно ускорить селекционный процесс [6]. Создаются коллекции ценного генофонда лиственных древесных пород в культуре *in vitro* для проведения прикладных и фундаментальных исследований [3]. Клеточная селекция *in vitro*, позволяющая проводить направленный отбор генотипов с заданными признаками, основана на общих механизмах устойчивости, как для целых растений, так и для изолированных клеток [2]. Данный метод позволяет не только экономить время и ресурсы при создании доноров устойчивости, но и ускорить оценку селекционного материала.

ВНИИ лесной генетики, селекции и биотехнологии разработал биотест-систему на основе каллусных культур *in vitro* для отбора засухоустойчивых форм сосны обыкновенной [1]. Большим генетическим разнообразием в их коллекции микроклонов представлены рода *Populus* и *Betula*, которые протестированы на устойчивость к засолению *in vitro* [5].

Целью нашего исследования являлась разработка принципов отбора засухоустойчивых гибридов, форм и клонов тополей в культуре *in vitro* для ускоренного селекционного процесса.

Гибридные формы тополей были получены от целенаправленного скрещивания на срезанных ветвях отобранных родительских линий в коллекции ФНЦ агроэкологии РАН: Тополь дельтовидный (*Populus deltoids*) ♀ × Тополь белый (*Populus alba*) ♂ (F1-3) и Тополь черный пирамидальный (*Populus nigra* f. *pyramidalis*) ♀ × Тополь белый (*Populus alba*) ♂ (F1-5). Из незрелых зеленых семенных коробочек в асептических условиях были изолированы зародыши, которые помещались в культуральную среду, вдвое обедненную макро- и микроэлементами по протоколу Murashige and Skoog (MS) [8]. Для полученных генотипов были подобраны питательные среды для размножения в культуре *in vitro*, дополненные цитокининами: 6-бензиламинопурином (6-BA), метатополлином (Mt), кинетином (Kinetin). В качестве контроля использовали безгормональную питательную среду (MS контроль).

Для моделирования осмотического стресса в культуре *in vitro* с целью проведения отбора засухоустойчивых генотипов тополей использовали полиэтиленгликоль 6000 (ПЭГ 6000). Данный полимер с высокой молекулярной массой представляет собой инертный осмотический компонент, снижающий водный потенциал питательных растворов, не проникающий в растительные ткани и не оказывающий на них токсичное действие [7].

В результате проведенных исследований, на этапе введения в асептическую культуру изолированных зародышей из незрелых зеленых семенных коробочек было получено 55 генотипов от двух линий скрещивания. В эксперименте по подбору питательных сред для размножения использовали 7 генотипов и 6 концентраций цитокининов с контрольной средой MS. После 6 недель культивирования были зафиксированы различия по длине побега как в зависимости от гормонального состава среды, так и от генотипической реакции (рис. 1). Было отмечено, что среди трех генотипов от скрещивания F1-3, значения средней длины побега на всех питательных средах находились в примерно равном числовом диапазоне и почти не имели статистически значимых различий как между контрольной средой и средами с цитокининами, так и между различными концентрациями самих гормонов.

Для генотипов F1-5 добавление в питательную среду гормонов цитокининовой природы положительно повлияло на длину микропобегов, которая возросла в 3,4 раза у генотипа g6 на среде с Mt 0,2 по сравнению с контролем или в 2 раза и выше у генотипа g3 на средах с гормонами по сравнению с контролем (рис. 1).

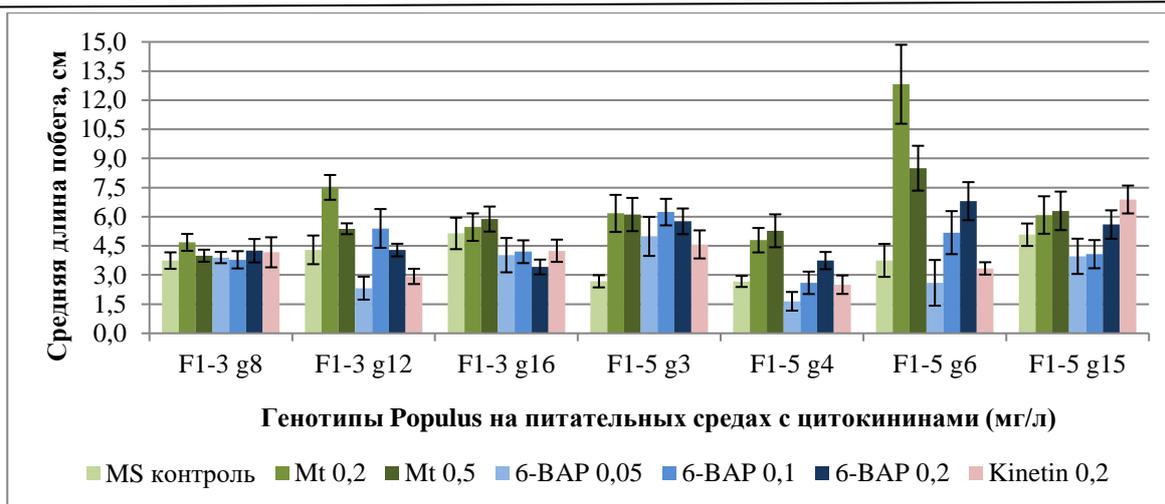


Рисунок 1. Генотипические различия длины микропобегов гибридов *Populus* при культивировании на питательных средах, дополненных цитокининами.

Примечание: MS контроль – безгормональная питательная среда; Mt 0,2 – метатополин 0,2 мг/л; Mt 0,5 – метатополин 0,5 мг/л; 6-BAP 0,05 – 6-бензиламинопурин 0,05 мг/л; 6-BAP 0,1 – 6-бензиламинопурин 0,1 мг/л; Kinetin 0,2 – Кинетин 0,2 мг/л.

В целом, для всех генотипов эффективным гормоном для размножения оказался метатополин (Mt 0,2) в невысоких концентрациях, который оказывал стимулирующее действие на рост микропобегов, не нарушая морфологические характеристики листовых пластин, междоузлий и самих побегов.

Использование 6-BAP в минимальных концентрациях от 0,05 до 0,2 мг/л для большинства исследуемых генотипов положительно влияло на образование новых микропобегов, значительно увеличивая коэффициент размножения (рис. 2 В) по сравнению с контролем (рис. 2 А).

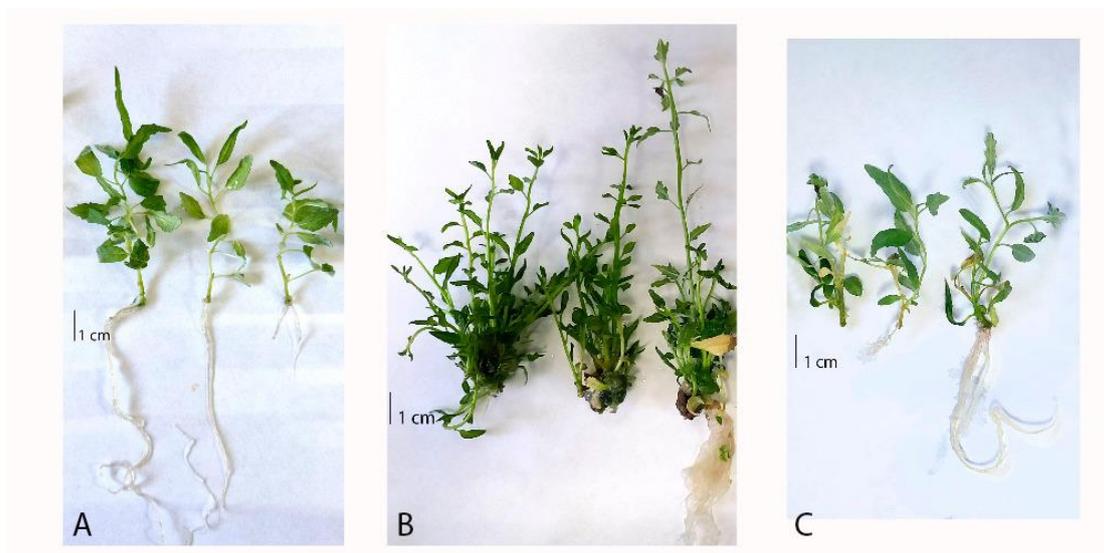


Рисунок 2. Микропобеги гибрида *Populus* F1-5 g3 на экспериментальных питательных средах: А – MS контроль, В – 6-BAP 0,1 мг/л; С – Kinetin 0,2 мг/л.

Количество побегов на эксплант варьировало от 15 до 30 вновь образованных микропобегов, но при этом активно развивались процессы витрификации, влияющие на дальнейшую регенерационную способность. Гипергидратация микропобегов, приводящая к морфологическим изменениям тканей, провоцировала гибель большей части эксплантов при последующем субкультивировании. Применение кинетина в концентрации 0,2 мг/л не повлияло

на изменение морфометрических характеристик микропобегов *Populus*, и было статистически незначимым по сравнению с контролем (рис. 2 С).

Моделирование водного дефицита в условиях *in vitro* с использованием неионного осмотика полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000 оказалось эффективным при создании приближенных условий к засухе. Для построения дозовой кривой и определения сублетальных и летальных концентраций ПЭГ был заложен эксперимент с 5 генотипами тополей на культуральных средах с ПЭГ в концентрациях от 10 до 70 г/л. Выделены две концентрации ПЭГ 40 и 60 г/л для проведения массового отбора на устойчивость к осмотическому стрессу 55 генотипов тополей.

Таким образом, в результате проведенных исследований были разработаны основные принципы отбора засухоустойчивых генотипов *Populus* в культуре *in vitro*. Использование культуры изолированных зародышей из незрелых семенных коробочек является эффективным способом получения исходного гибридного материала после целенаправленного скрещивания на срезанных ветвях. Метатополин в концентрации 0,2 мг/л в культуральной среде проявлял стимулирующее действие для массового размножения полученных генотипов, хотя для размножения конкретного генотипа после отбора на устойчивость к засухе необходимо целенаправленно провести подбор оптимального состава питательной среды, т.к. регенерационная способность эксплантов носила ярко выраженный генотипический характер. Использование полиэтиленгликоля оказалось эффективным для моделирования водного дефицита в культуре *in vitro* и отбора засухоустойчивых генотипов *Populus* для дальнейших полевых испытаний.

Благодарности. Исследование проводилось за счет средств государственного научного гранта Волгоградской области в форме субсидии для реализации проекта «Разработка принципов селективного отбора засухоустойчивых гибридов, форм и клонов тополей в культуре *in vitro*» № 124012200177-7

Библиографический список

1. Аминова Е. Ю., Табацкая Т. М., Машкина О. С., Попов В. Н. Оценка засухоустойчивости отдельных генотипов *Pinus sylvestris* L. на основе метода культуры ткани *in vitro* в моделируемых стрессовых условиях // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. 2017. № 1. С. 14–22.
2. Калашникова Е. А. Клеточная инженерия растений. М.: Юрайт. 2020. 333 с
3. Корчагин О. М., Табацкая Т. М., Машкина О. С. Сохранение лесных генетических ресурсов на основе коллекции *in vitro*: состояние, перспективы, проблемы (аналитический обзор) // Лесохозяйственная информация. 2023. № 2. С. 75–90.
4. Морозова Е.В., Иозус А.П. Особенности сортоиспытания перспективных для защитного орошаемого и богарного лесоразведения видов, гибридов и форм тополей в условиях сухой степи Нижнего Поволжья // Успехи современного естествознания. 2016. № 11-2. С. 306–310.
5. Табацкая Т. М., Аминова Е. Ю., Машкина О. С. Биотехнологическая оценка коллекционного материала березы и тополя в условиях солевого стресса в культуре *in vitro* // Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки. 2020. С. 190–191.
6. Тараканов В. В., Паленова М. М., Паркина О. В., Роговцев Р. В., Третьякова Р. А. Лесная селекция в России: достижения, проблемы, приоритеты (обзор) // Лесохозяйственная информация. 2021. № 1. С. 100–143.
7. Hassan N. M., Serag M. S., El-Feky F. M. Changes in nitrogen content and protein profiles following *in vitro* selection of NaCl resistant mung bean and tomato // Acta Physiologiae Plantarum. 2004. Т. 26. Р. 165–175.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15, № 3. Р. 473–497.

УДК 576.5:57.085.23

НА ПУТИ К ПОЛУЧЕНИЮ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ КЛОНОВ ПЛЮСОВЫХ ДЕРЕВЬЕВ *PINUS SYLVESTRIS* L.

Р.В. Игнатенко, М.А. Еришова, О.В. Чирва, Н.А. Галибина

Институт леса — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», Петрозаводск, Россия

Проведено изучение растений-доноров эксплантов *Pinus sylvestris* с Петрозаводской лесосеменной плантации, способных к инициации соматического эмбриогенеза, а также оценка формирования эмбриогенных клеточных линий на питательных средах MSG, с разным содержанием и источниками фитогормонов. Инициация соматического эмбриогенеза была отмечена у эксплантов отобранных с 2 из 9 исследуемых клонов плюсовых деревьев. Установлено, что эмбриогенные массы клеток образовывались с низкой частотой на всех исследуемых субстратах. Начальные этапы вызревания соматических зародышей регистрировали после семидневного выдерживания масс клеток на среде без гормонов, а затем на субстрате с АБК. По окончании эксперимента растения-регенеранты *Pinus sylvestris* получить не удалось.

Ключевые слова: соматический эмбриогенез, культура *in vitro*, фитогормоны, зародыши, сосна обыкновенная, лесосеменная плантация, Карелия.

Одним из перспективных направлений в области биотехнологического размножения хвойных растений является применение метода соматического эмбриогенеза [4; 15]. Данная технология позволяет получить большое количество растений с селекционно-значимыми признаками. Особенно это актуально для хвойных видов, которые тяжело поддаются клонированию с использованием традиционных методов селекции [3]. Так, например, к ним относится широко распространённое на территории Евразии растение – сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.). Технология соматического эмбриогенеза для *P. sylvestris* была впервые описана финскими исследователями в 1996 г. [10], на сегодняшний день протоколы получения растений-регенерантов модифицированы [8] и успешно применяются на практике. Однако в России получение клонов *P. sylvestris* с использованием данного метода в проанализированной нами литературе описано не было, хотя при помощи соматического эмбриогенеза в нашей стране были получены растения-регенеранты для *Pinus pumila* (Pall.) Regel [13], *Larix sibirica* Ledeb. [14] и *Picea abies* (L.) H. Karst. [9].

Ранее нами были проведены исследования, направленные на подбор условий культивирования [1], а также поиск маркеров для оценки растений-доноров эксплантов *P. sylvestris* [6; 7], что способствовало получению эмбриогенной культуры [2]. Целью данного исследования являлся подбор растений-доноров эксплантов *P. sylvestris* для инициации соматического эмбриогенеза, а также оценка формирования эмбриогенных клеточных линий на разных субстратах и их дальнейшего развития.

Сбор незрелых шишек *P. sylvestris* проводили на Петрозаводской лесосеменной плантации I порядка 05 и 12 июля 2023 г. Сумма эффективных температур (при базовой температуре +5°C) в эти дни составляла 500 и 564 °C, соответственно. Отбор растительного материала производили 5 июля с клонов плюсовых деревьев 516-7, 835-2, 864-2, 876-1, 962-4, 1025-3, 1026-3, 1147-3, 1191-2; 12 июля с клонов 516-7, 864-2, 876-1, 962-4, 1025-3, 1026-3. Шишки до момента введения в культуру хранили в холодильнике при температуре +4°C не более одного месяца.

Незрелые шишки выдерживали в 15% мыльном растворе в течение 10 минут, затем поверхность шишек очищали щёткой и промывали под проточной водой. В стерильных условиях шишки помещали в 96% этанол с добавлением нескольких капель ТВИН 20 и выдерживали в растворе 10 минут. После однократной промывки стерильной дистиллированной

водой шишки вскрывали стерильными инструментами и извлекали семена. Собранные семена погружали в 5% раствор гипохлорита натрия на 10 минут, и 15% перекись водорода на 5 минут с трехкратной промывкой стерильной дистиллированной водой после каждого стерилизующего агента. Обработанные семена в асептических условиях бокса микробиологической безопасности очищали от покровных чешуй и мегагаметофиты, содержащие незрелые зиготические зародыши, горизонтально помещали на поверхность питательной среды по 4 шт. в банку [1].

В качестве субстрата использовали питательные среды на основе MSG [12], которые отличались разным содержанием фитогормонов (табл. 1). В культуру *in vitro* было введено 1860 эксплантов, собранных с 9 клонов плюсовых деревьев *P. sylvestris*.

Таблица 1

Содержание компонентов в питательных средах MSG

Компоненты	Инициации			Пролиферац ии	Предсозрева ния	Созревания	Созревания по Malabadi
	1	2	3				
2.4-Д, μM	13.6	18	–	9.1	–	–	–
6-БАП, μM	2.2	9	9	2.2	–	–	–
НУК, μM	–	–	2.7				
АБК, μM	–	–	–	–	–	60	80
ПЭГ 6000, г/л	–	–	–	–	–	46	–
Уголь, г/л	–	–	–	–	1	–	–
Сахароза, г/л	10	10	10	10	20	20	–
Мальтоза, г/л	–	–	–	–	–	–	60
Агар, г/л	6	6	6	6	6	6	21.6

Спустя месяц культивирования часть эксплантов и массы клеток перенесли на среду пролиферации (табл. 1). Для созревания соматических зародышей эмбриогенную ткань после 7 месяцев пролиферации помещали (1) на одну неделю на субстрат без гормонов (предсозревания), а затем на среду созревания или (2) предварительно высушивали на фильтровальной бумаге в течении 24 часов, а затем культивировали на питательной среде созревания, модифицированной Malabadi [5; 11]. Экспланты на питательных средах культивировали в термостате в темноте при температуре $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

В результате исследования было установлено, что основная часть зиготических зародышей *P. sylvestris* в момент сбора шишек (05 и 12 июля) находилась на стадии развития – кливажной полиэмбрионии. Спустя 3-4 недели нахождения шишек в холодильнике при температуре $+4^\circ\text{C}$ большинство зародышей развились до стадии глобулярного лидирующего зародыша или глобулярного зародыша.

В первые две недели культивирования контаминации подверглись 472 экспланта (25% от общего числа эксплантов). Инфекция в большинстве случаев развивалась из мегагаметофитов *P. sylvestris*. Эти данные не учитывались при дальнейшем анализе.

Экструзия зародыша была зарегистрирована у эксплантов, собранных с деревьев 1025-3, 864-2, 876-1, в среднем на 20 ± 2 сутки эксперимента. Массы клеток формировались у эксплантов с клонов плюсовых деревьев 962-4 (1 шт.) и 864-2 (3 шт.). Данные культуры клеток являлись эмбриогенными, поскольку в них образовывались соматические зародыши (рис. 1).

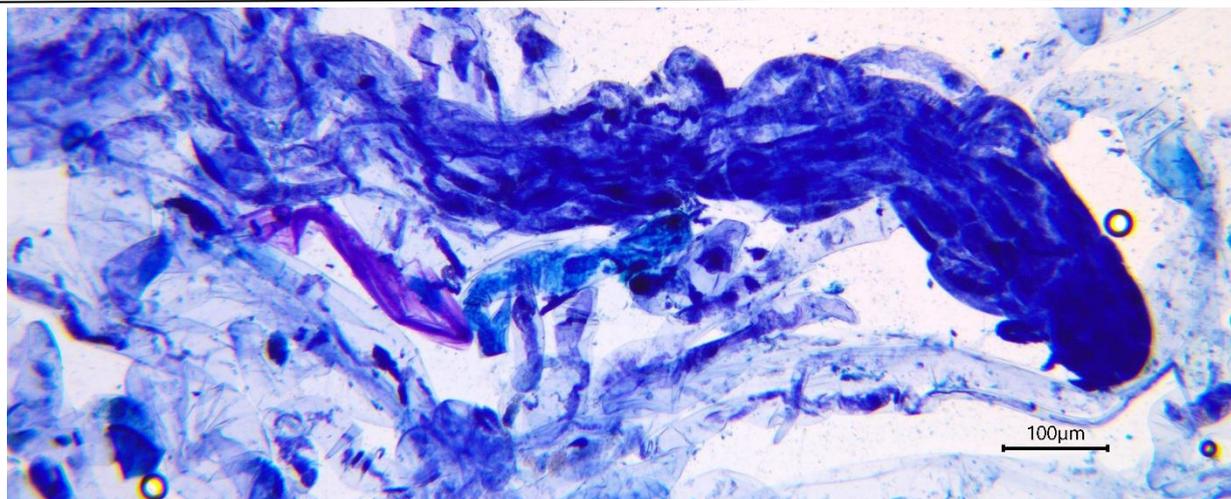


Рисунок 1. Глобулярный соматический зародыш *Pinus sylvestris*, окрашенный растворами сафранина и метиленового синего

Экструзия зародыша наблюдалась на всех средах инициации у 0.4-1.3% эксплантов, введенных в культуру *in vitro* (табл. 2). Доля эксплантов, образовавших эмбрионально-суспензорные массы на 16-38 сутки исследования, варьировала от 0.2 до 0.4% в зависимости от субстрата. После двух месяцев культивирования сохранились 2 клеточные линии, полученные от мегагаметофитов дерева 864-2.

Таблица 2

Частота образования экструзий и эмбрионных масс клеток *Pinus sylvestris* в культуре *in vitro*

Частота образования, %	Варианты среды инициации MSG		
	1	2	3
Экструзии	1.1	1.3	0.4
Эмбрионные массы клеток	0.3	0.2	0.4

Предварительно подсушенные в чашке Петри на фильтровальной бумаге эмбрионально-суспензорные массы, помещали на среду MSG, модифицированную по Малабади, однако на данном типе субстрата клеточные линии погибали. В тоже время при недельном культивировании на среде предсозревания наблюдали подсушивание культур, а при перемещении клеточных линий на субстрат, содержащий 60 μМ АБК, регистрировали начальные этапы созревания соматических зародышей (рис. 2). Спустя месяц культивирования дальнейшего развития зародышей не наблюдали. На среде пролиферации на 9-10 месяц культивирования клеточные линии прекращали свой рост и погибали.

Таким образом, в результате проведенных исследований было получено 4 эмбрионные культуры (0.3%) от эксплантов, собранных с двух клонов плюсовых деревьев *P. sylvestris* (864-2, 962-4), что составляет 22% от общего числа изученных генотипов растений-доноров в 2023 г. При этом формирование эмбрионально-суспензорных масс из мегагаметофитов, содержащих зародыши, клона 864-2 происходило второй год подряд [2]. Известно, что использование ранее экспериментально отобранных деревьев-доноров эксплантов способствует повышению частоты инициации соматического эмбриогенеза [10; 12]. Так, исследователи из Финляндии на протяжении последних 30 лет используют растительный материал для введения в культуру *in vitro* с плантации Финского научно-исследовательского института в Пункахарью [5; 8; 10; 12]. При этом производится контролируемое опыление наиболее успешных по инициации в культуре *in vitro* генотипов *P. sylvestris*.

В нашем исследовании инициация соматического эмбриогенеза происходила на питательных средах MSG с разными источниками и содержанием фитогормонов. Выдерживание культуры клеток на среде предсозревания, а затем перенесение ее на субстрат созревания способствовало дальнейшему развитию соматических зародышей. Однако получить растения-регенеранты не удалось. Возможно, повышение содержания АБК и источников углеводов в

питательной среде, как описано в работе Нагџу с соавторами [8], будет оказывать благоприятное влияние на процесс созревания соматических зародышей.

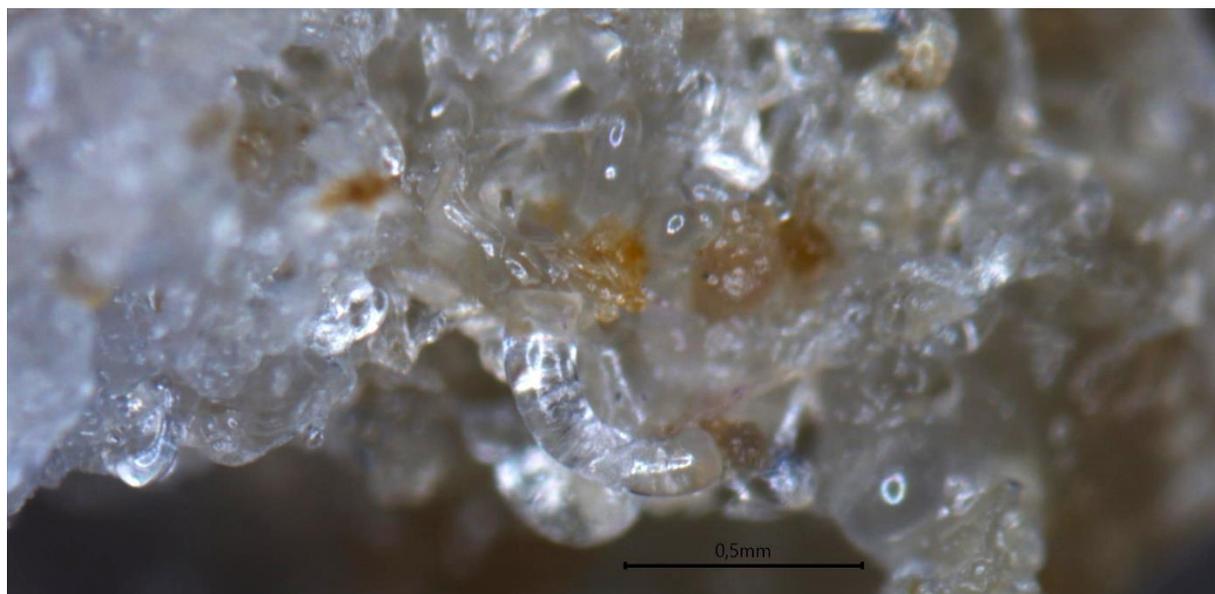


Рисунок 2. Вызревание соматических зародышей *Pinus sylvestris* в культуре *in vitro*

Важно отметить, что в рамках проведенного исследования были установлены генотипы деревьев-доноров *P. sylvestris* на Петрозаводской лесосеменной плантации экспланты с которых способны к инициации соматического эмбриогенеза. А также сделан следующий шаг – начальные этапы вызревания соматических зародышей на субстрате с АБК – на пути к получению растений-регенерантов клонов плюсовых деревьев *P. sylvestris* с территории Карелии.

Благодарности. Работа выполнена за счет средств федерального бюджета по государственному заданию Карельского научного центра Российской академии наук (Институт леса КарНЦ РАН).

Библиографический список

1. Ершова М.А., Игнатенко Р.В., Новичонок Е.В., Чирва О.В., Галибина Н.А. Оптимизация условий стерилизации и культивирования эксплантов *Pinus sylvestris* (Pinaceae) // Растительные ресурсы. 2022. Т. 58, № 4. С. 431–446. <https://doi.org/10.31857/S0033994622040057>
2. Игнатенко Р.В., Галибина Н.А., Ершова М.А., Чирва О.В., Тихомирова С.И., Померанец А.К. Особенности соматического эмбриогенеза *Pinus sylvestris* и *Picea abies* // X Съезд общества физиологов растений России «Биология растений в эпоху глобальных изменений климата»: Всероссийская научная конференция с международным участием: тезисы докладов, Уфа, 18–23 сентября 2023 года. Уфа: Уфимский Федеральный исследовательский центр РАН. 2023. С. 161.
3. Раевский Б.В., Игнатенко Р.В., Новичонок Е.В., Прокопюк В.М., Куклина К.К. Современное состояние селекции и семеноводства хвойных пород // Известия вузов. Лесной журнал. 2022. № 6. С. 9–37. <https://doi.org/10.37482/0536-1036-2022-6-9-37>
4. Шуклина А.С., Третьякова И.Н. Соматический эмбриогенез видов рода *Pinus* в культуре *in vitro* // Успехи современной биологии. 2019. Т. 139, № 2. С. 184–195. <https://doi.org/10.1134/S004213241902008X>
5. Aronen T., Pehkonen T., Ryyänänen L. Enhancement of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Pinus sylvestris* // Scandinavian Journal of Forest Research. 2009. Vol. 24, № 5. P. 372–383. <https://doi.org/10.1080/02827580903228862>
6. Chirva O.V., Ignatenko R.V., Ershova M.A. *Pinus sylvestris* L. mature seeds megagametophytes cultured *in vitro*. Influence of the genotype and the growth regulators content in nutrient medium on the initiation of callus formation // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2023. Vol. 152, № 2. P. 299–308. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02404-3>

7. Galibina N.A., Ershova M.A., Ignatenko R.V., Nikerova K.M., Sofronova I.N., Borodina M.N. Cytogenetic and biochemical characteristics of callus *Pinus sylvestris* L. // Russian Journal of Plant Physiology. 2023. Vol. 70, № 1. P. 10. <http://doi.org/10.1134/S1021443722602348>
8. Harju A., Heiska S., Julkunen-Tiitto R., Venäläinen M., Aronen T. Somatic embryogenesis of *Pinus sylvestris* L. from parent genotypes with high- and low stilbene content in their heartwood // Forests. 2022. Vol. 13, № 4. P. 557. <https://doi.org/10.3390/f13040557>
9. Ignatenko R.V., Chirva O.V., Ershova M.A., Galibina N.A., Teslyuk I.A. Assessing the ability of *Picea abies* (L.) H. Karst. plus tree clones from the middle taiga subzone of Karelia to somatic embryogenesis // Russian Journal of Plant Physiology. 2024. Vol. 71, № 25. P. 25. <https://doi.org/10.1134/S1021443724604531>
10. Keinonen-Mettälä K., Jalonen P., Euroola P., von Arnold S., von Weissenberg K. Somatic embryogenesis of *Pinus sylvestris* // Scandinavian Journal of Forest Research. 1996. Vol. 11, № 1-4. P. 242–250. <https://doi.org/10.1080/02827589609382933>
11. Malabadi R.B., van Staden J. Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula* // Tree Physiology. 2005. Vol. 25, № 1. P. 11–16. <https://doi.org/10.1093/treephys/25.1.11>
12. Niskanen A.M., Lu J., Seitz S., Keinonen K., von Weissenberg K., Pappinen A. Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*) // Tree Physiology. 2004. Vol. 24, № 11. P. 1259–1265. <https://doi.org/10.1093/treephys/24.11.1259>
13. Tret'yakova, I.N., Shuvaev D.N. Somatic embryogenesis in *Pinus pumila* and productivity of embryogenic lines during long-term cultivation *in vitro* // Russian Journal of Developmental Biology. 2015. Vol. 46, № 5. P. 276–285. <https://doi.org/10.1134/S1062360415050070>
14. Tret'yakova I.N., Park M.E. Collectible cell lines of *Larix sibirica* obtained by somatic embryogenesis and their ability to regenerate // Forests. 2023. Vol. 14, № 9. P. 1920. <https://doi.org/10.3390/f14091920>
15. Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J., Filonova L. Developmental pathways of somatic embryogenesis // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2002. Vol. 69, № 3. P. 233–249. <https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>

УДК 581.6

ОЦЕНКА ПОВЕРХНОСТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ САПОНИНСОДЕРЖАЩИХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ

И. А. Коновалова, Е. С. Запольских

Вятский государственный университет, г. Киров, Россия

В настоящее время актуальной задачей при разработке натуральных косметических составов является поиск природных поверхностно-активных веществ. Особый интерес среди них представляют растительные сапонины, способные образовывать мицеллы в водных растворах, проявляя очищающие и эмульгирующие свойства. Сапонинсодержащие экстракты получены из листьев *Agave americana* L., *Hedera helix* L. и *Yucca gloriosa* L., корневища *Ruscus aculeatus* L. и семян *Aesculus hippocastanum* L. С применением современных, в том числе зарубежных, методов и технологий выявлена химическая природа сапонинов в растительных экстрактах, вычислены пенное число и индекс пенообразования экстрактов, а также их поверхностное натяжение. В качестве контрольного образца применяли мыльный раствор нейтрального брускового мыла. В экстрактах *A. americana*, *Y. gloriosa* и *R. aculeatus* обнаружены стероидные гликозиды, в *H. helix* и *A. hippocastanum* – тритерпеновые. Большинство растительных экстрактов и мыльный раствор имеют среднее пенное число, экстракт листьев *A. americana* – низкое. Наиболее высокие значения индекса пенообразования отмечены у 0,1 %-го водного экстракта листьев *H. helix* (1428) и у 0,2 %-го экстракта семян *A. hippocastanum* (1250). Значения поверхностного натяжения этих экстрактов составили 61,0 мНм⁻¹ (экстракт семян *A. hippocastanum*) и 49,4 мНм⁻¹ (экстракт листьев *H. helix*), мыльного раствора – 34,2 мНм⁻¹. Среди исследуемых сапонинсодержащих экстрактов, экстракт листьев *H. helix* отличается наиболее высокой пенообразующей активностью и способен снизить поверхностное натяжение раствора до 49,4 мНм⁻¹. Данный экстракт рекомендуем для разработки эмульсионных косметических продуктов.

Ключевые слова: растительные экстракты, тритерпеновые и стероидные сапонины, пенное число, индекс пенообразования, поверхностное натяжение.

EVALUATION OF SURFACE ACTIVITY OF SOME SAPONIN-CONTAINING PLANT EXTRACTS

I. A. Konovalova, E. S. Zapolskikh

Vyatka State University, Kirov, Russia

At present, an urgent task in the development of natural cosmetic compositions is the search for natural surfactants. Of particular interest among them are plant saponins capable of forming micelles in aqueous solutions, showing cleansing and emulsifying properties. Saponin-containing extracts were obtained from the leaves of *Agave americana* L., *Hedera helix* L. and *Yucca gloriosa* L., rhizome of *Ruscus aculeatus* L. and seeds of *Aesculus hippocastanum* L. Using modern, including foreign, methods and technologies, the chemical nature of saponins in plant extracts was revealed, the foam number and foam index of extracts, as well as their surface tension were calculated. A soap solution of neutral bar soap served as a control sample. Steroidal glycosides were found in the extracts of *A. americana*, *Y. gloriosa* and *R. aculeatus*, while triterpene glycosides were found in *H. helix* and *A. hippocastanum*. Most of the plant extracts and soap solution have medium foaming index, *A. americana* leaf extract - low. The highest values of foaming index were observed for 0,1 % aqueous extract of *H. helix* leaves (1428) and 0,2 % extract of *A. hippocastanum* seeds (1250). The surface tension values of these extracts were 61,0 мНм⁻¹ (*A. hippocastanum* seed extract) and 49,4 мНм⁻¹ (*H. helix* leaf extract), while those of the soap solution were 34,2 мНм⁻¹. Among the studied plant extracts, *H. helix* leaf extract is characterized by the highest foaming activity and is able to reduce the surface tension of the solution up to 49,4 мНм⁻¹. This extract is recommended for the development of emulsion cosmetic products.

Keywords: plant extracts, triterpene and steroidal saponins, foam number, foam index, surface tension.

Одним из перспективных направлений при разработке натуральных косметических средств является поиск природных источников поверхностно-активных соединений. Особый интерес среди них представляют сапонины – природные гликозиды, широко распространенные среди вторичных метаболитов растений. Строение молекул сапонинов, состоящих из неполярных агликонов, соединенных одной или несколькими моносахаридными группами, определяет их пенообразующие и эмульгирующие свойства [5]. Эти особенности позволяют рассматривать сапонины как потенциальные компоненты рецептур косметических продуктов. Цель настоящего исследования – оценить пенообразующую способность и поверхностное натяжение ряда растительных экстрактов, содержащих сапонины.

Материалом для исследования служили отдельные виды растений, культивируемые в оранжерее (*Agave americana* L., *Hedera helix* L., *Yucca gloriosa* L., *Ruscus aculeatus* L.) и открытом грунте (*Aesculus hippocastanum* L.) ботанического сада ВятГУ. Для получения экстрактов использовали свежее растительное сырье: листья (*A. americana*, *H. helix* и *Y. gloriosa*), части корневища (*R. aculeatus*) и семена (*A. hippocastanum*).

Наличие сапонинов в сырье устанавливали методами фармакогностического анализа с помощью качественных реакций. Для этого готовили водные и водно-спиртовые растительные экстракты, проводили пробу на пенообразование, реакцию с ацетатом свинца, пробу Лафона, реакцию с концентрированной серной кислотой, реакцию Сальковского. Химическую природу сапонинов устанавливали с помощью реакции Фонтан-Кендаля. По традиционной методике [1] определяли пенное число – наименьшую концентрацию сапонинов, вызывающую образование стойкой пены в течение 1 мин.

Согласно технологии, описанной бразильскими учеными [4], у исследуемых растительных экстрактов вычисляли индекс пенообразования (FI) – показатель без какой-либо единицы измерения, представляющий максимальное разведение, при котором данная масса растения способна образовывать 1-сантиметровый столб пены при определенных условиях. Для этого готовили водные экстракты разной концентрации: к навеске растительного сырья от 0,2 г до 2 г (с интервалом 0,2 г) прибавляли по 200 мл воды. Полученные образцы кипятили в течение 5 мин. После охлаждения экстракт каждой концентрации фильтровали, распределяли по пробиркам от 1 мл до 9 мл и доводили конечный объем до 10 мл дистиллированной водой. В последнюю пробирку отмеряли 10 мл неразбавленного экстракта. Измеряли pH каждого раствора и, при необходимости, корректировали до 7,0 карбонатом кальция. Каждую пробирку встряхивали в течение 15 секунд, затем через 15 мин измеряли высоту стойкого столба пены (в см) в каждой пробирке. В качестве стандартного образца из нейтрального брускового мыла готовили мыльные растворы этих же концентраций. Индекс пенообразования (FI) рассчитывали по формуле (1):

$$FI = \frac{10}{[(M \cdot Ddv)/200]}, \quad (1)$$

где M (г) – масса растительного сырья, Ddv (мл) – объем разведенного экстракта, используемый в каждой пробирке, 10 и 200 – общий объем в пробирке и объем, используемый для приготовления экстракта соответственно.

С помощью метода взвешивания капель определяли статическое поверхностное натяжение (γ) растительных экстрактов. Из бюретки мы набирали по 20 капель (1 мл) каждого разведенного экстракта в трех экземплярах и измеряли среднее значение массы и объема капли. Поверхностное натяжение рассчитывали по закону Тейта [3] (2):

$$\gamma = \frac{(m \cdot g)}{[2 \cdot \pi \cdot r \cdot \Psi(r/V^{1/3})]}, \quad (2)$$

где γ – поверхностное натяжение (mNm^{-1}), m – средняя масса каждой капли (г), g – ускорение силы тяжести (980 см с^{-2}), r – радиус кончика бюретки (0,175 см), $\Psi(r/V^{1/3})$ – поправочный коэффициент.

С целью получения фактического значения поверхностного натяжения вводили поправочный коэффициент к оставшейся доле жидкости на кончике бюретки, вычисляемый по формуле (3):

$$\Psi \cdot (r/V^{1/3}) = 1.000 - 0.9121 \cdot (r/V^{1/3}) - 2.109 \cdot (r/V^{1/3})^2 + 13.38 \cdot (r/V^{1/3})^3 - 27.29 \cdot (r/V^{1/3})^4 + 27.53 \cdot (r/V^{1/3})^5 - 13.58 \cdot (r/V^{1/3})^6 + 2.593 \cdot (r/V^{1/3})^7, \quad (3)$$

где V – средний объем каждой капли (см^3).

Полученные данные сравнивали с контрольным образцом – мыльным раствором нейтрального брусочного мыла той же концентрации, что и растительные экстракты.

В результате проведенных исследований определена химическая природа сапонинов в растительном сырье: в листьях *A. americana*, *Y. gloriosa* и корневище *R. aculeatus* обнаружены стероидные гликозиды, в листьях *H. helix* и семенах *A. hippocastanum* – тритерпеновые. Исследуемые водные извлечения имеют среднее пенное число (у экстракта корневища *R. aculeatus* и мыльного раствора – 4000, у экстрактов листьев *H. helix* и семян *A. hippocastanum* – 5000, у экстракта листьев *Y. gloriosa* – 2000), кроме экстракта листьев *A. americana*, рассчитанное пенное число (1000) которого считается низким.

Индекс пенообразования вычислен у исследуемых растительных экстрактов и мыльного раствора, выступающего в качестве стандартного образца (табл.). Среди исследуемых растительных экстрактов наименьший индекс пенообразования ($FI = 125$) отмечен у корневища *R. aculeatus* в концентрации экстракта 0,8 % без разведения. Максимальная высота столба пены, который образовался при встряхивании этого экстракта, составила 1,3 см при концентрации раствора 1 %. Водный экстракт листьев *A. americana* также имеет невысокий относительно других экстрактов индекс пенообразования ($FI = 200$) в концентрации экстракта 0,5 % без разведения. Максимальная высота столба пены экстракта листьев *A. americana* составила 2,6 см при концентрации раствора 1 %, что в два раза больше, чем у водного экстракта корневища *R. aculeatus*. В 0,2 %-ной концентрации водных экстрактов листьев *Y. gloriosa* и семян *A. hippocastanum* отмечен индекс пенообразования, который составил 833 и 1250 соответственно (табл.). Несмотря на то, что навеска сырья в обоих случаях составила 0,4 г, разведение в пробирках исследуемых экстрактах различалось. Так, для образования 1-сантиметрового столба пены необходимо было разбавить 4 мл 2-го % водного экстракта *A. hippocastanum* до 10 мл дистиллированной водой, в то время как водного экстракта листьев *Y. gloriosa* – 6 мл. Максимальная высота столба пены, который образовался при встряхивании водного экстракта листьев *Y. gloriosa*, составила 2,0 см при концентрации раствора 1 %. У водного экстракта семян *A. hippocastanum* этот показатель составил 2,4 см.

Таблица 1.

Индекс пенообразования (FI) водных растительных экстрактов

Параметры	Экстракт листьев <i>Agave americana</i>	Экстракт листьев <i>Yucca gloriosa</i>	Экстракт корневища <i>Ruscus aculeatus</i>	Экстракт листьев <i>Hedera helix</i>	Экстракт семян <i>Aesculus hippocastanum</i>
Концентрация экстракта, %	0,5	0,2	0,8	0,1	0,2
FI	200	833	125	1428	1250

Среди исследуемых растительных экстрактов наибольший индекс пенообразования отмечен у 0,1 %-го водного экстракта листьев *H. helix*, который составил 1428. При этом потребовалось развести 7 мл 0,1 %-го водного экстракта листьев *H. helix* до 10 мл дистиллированной водой. Навеска сырья в данном случае составила 0,2 г. Максимальная высота столба водного экстракта листьев *H. helix* при этом составила 2,6 см в концентрации 1 %. Мыльный раствор, как контрольный образец, даже при концентрации 0,1 % образовывал столб пены высотой 3,2 см, что превышало значения исследуемых растительных экстрактов. Максимальная высота столба пены (13,6 см) отмечена у 2 %-го мыльного раствора. Таким образом, у водных экстрактов листьев *H. helix* и семян *A. hippocastanum* высота столба пены в 1 см была отмечена при меньших концентрациях растворов относительно других растительных экстрактов.

Полученные результаты и поведение растительных экстрактов на границе фаз, вероятно, связаны со структурой агликона и сахарных цепей [4]. Известно, что тритерпеноидные сапонины, обнаруженные в экстрактах *H. helix* и *A. hippocastanum*, связаны с более высокими

вязкоупругими межфазными слоями, и это приводит к высокой пенообразующей способности и стабильности пены по сравнению со стероидными сапонинами [2].

На основе полученных данных поверхностное натяжение (γ) вычисляли только для водных экстрактов листьев *H. helix* и семян *A. hippocastanum*, а также нейтрального брускового мыла. Известно, что вещество с высокой поверхностной активностью способно снизить поверхностное натяжение воды с 72 до 35 mNm^{-1} [4]. Результаты анализа данных показали, что 0,1 %-ный растительный экстракт листьев *H. helix* способен снизить поверхностное натяжение раствора до 49,4 mNm^{-1} , в отличие от 0,2 %-ного экстракта семян *A. hippocastanum*, поверхностная активность которого без разбавления раствора составила 61,0 mNm^{-1} (рис. 1). Значение поверхностного натяжения мыльного раствора при этом составило 34,2 mNm^{-1} .

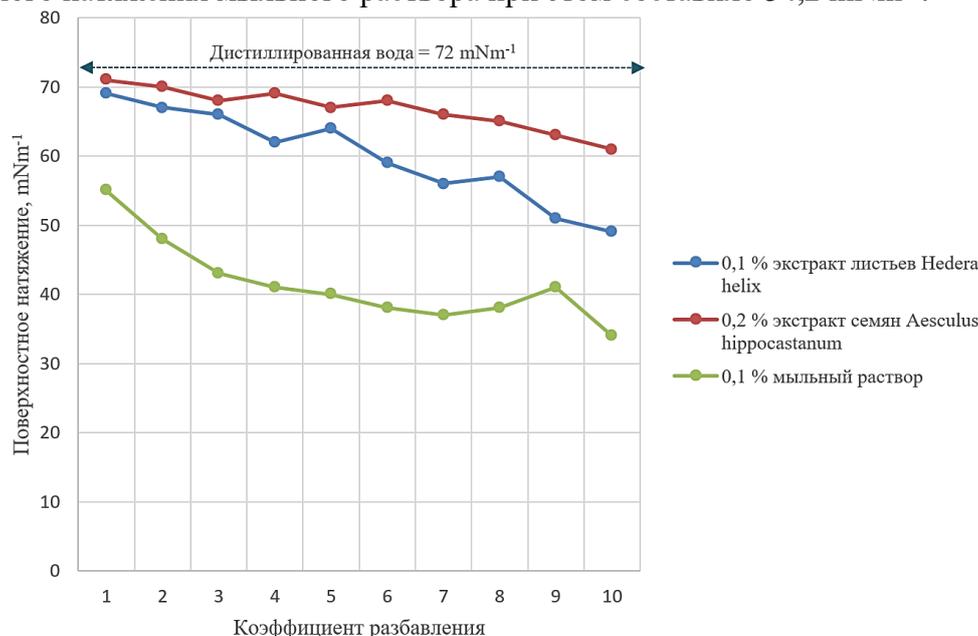


Рис. 1. Кривые регрессии поверхностного натяжения (mNm^{-1}) экстрактов листьев *H. helix* и семян *A. hippocastanum*, и нейтрального брускового мыла

Таким образом, среди исследуемых сапонинсодержащих растительных экстрактов, экстракт листьев *H. helix* обладает высокой пенообразующей активностью и способен снизить поверхностное натяжение раствора до 49,4 mNm^{-1} . Предполагаем, что данный экстракт имеет высокий потенциал в разработке эмульсионных косметических продуктов.

Благодарности. Исследование выполнено в рамках проекта «Трансформация образовательного курса «Технологии переработки растительного сырья» программы магистратуры 06.04.01 Биология. Разработка фитокосметических средств», реализуемого победителем грантового конкурса для преподавателей 2023/2024 Стипендиальной программы Владимира Потанина.

Библиографический список

1. Коренская И. М., Ивановская Н. П. и др. Фитохимический анализ и стандартизация лекарственного растительного сырья: учебно-методическое пособие. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2017. 78 с.
2. Böttcher S., Drusch S. Saponins – self-assembly and behavior at aqueous interfaces // Adv. Colloid Interf. Sci. 2017. Vol. 243. P. 105–113.
3. Lee B.-B., Ravindra P., Chan E.-S. A critical review: surface and interfacial tension measurement by the drop weight method // Chem. Eng. Commun. 2008. Vol. 195. P. 889–924.
4. Müller L. E., Schiedeck G. Physical properties of botanical surfactants // Science of the Total Environment. 2018. V. 610–611. P. 1133–1137.
5. Piyasena K. G. N. P., Qader M. M. Saponins // Chemistry of natural products. Phytochemistry and Pharmacognosy of Medicinal Plants / Edited by Mayuri Napagoda and Lalith Jayasinghe. Berlin, Boston, 2022. P. 115–136.

УДК 581.162.41: 635.92

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПЫЛЬЦЫ IN-VITRO У ВИДОВ И СОРТОВ КЛАРКИИ (*CLARKIA PURSH*)

Е.В. Королева¹, Ю.В. Фотев^{1,2}

¹Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

²Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия

E-mail: coroleva-nsk@yandex.ru

Виды кларкии, рода *Clarkia Pursh* – ценные для Сибири и России цветочно-декоративные растения, требующие биотехнологического подхода для ускорения селекции. С целью определения жизнеспособности пыльцы кларкии, от которой зависят процессы оплодотворения и развития семян, использовали проращивание пыльцы in-vitro на растворе синтетического осмотика – полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000 (ПЭГ 6000). По сравнению с раствором сахарозы на 30 % растворе ПЭГ 6000 с добавлением в среду микроэлементов в следующих концентрациях: борной кислоты H_3BO_3 – 0,01%, , нитрата кальция $CaNO_3$ – 0,03%, сульфата магния $MgSO_4$ – 0,02%, нитрата калия KNO_3 – 0,01%. энергетическая активность и жизнеспособность пыльцевых зерен увеличивается в 1,7–2 раза. Установлено, что энергетическая активность, жизнеспособность пыльцы и скорость роста пыльцевых трубок у исследованных видов и сортов рода *Clarkia Pursh* из трех различных секций (*Rhodanthos*, *Godetia*, *Phaeostoma*) чувствительны, как к среде культивирования, так и к продолжительности времени культивирования.

Ключевые слова: *Clarkia Pursh*, секции *Rhodanthos*, *Godetia*, *Phaeostoma* селекция, жизнеспособность пыльцы, in-vitro, скорость роста пыльцевых трубок

IN-VITRO METHOD FOR DETERMINING THE POLLEN VIABILITY OF *CLARKIA* SPECIES AND CULTIVARS

E. V. Koroleva, Yu. V. Fotev.^{1,2}

¹*Novosibirsk State Agricultural University, Novosibirsk, Russia*

²*Central Siberian Botanical Garden, Novosibirsk, Russia*

Clarkia species of the genus *Clarkia Pursh* are valuable floral and ornamental plants for Siberia and Russia, which require a biotechnological approach to accelerate breeding. To determine the viability of *Clarkia* pollen, on which the processes of fertilization and seed development depend, we used in vitro germination of pollen in a solution of a synthetic osmotic agent, polyethylene glycol with a molecular weight of 6000 (PEG 6000). Compared to a sucrose solution in a 30% PEG 6000 solution with the addition of microelements to the medium in the following concentrations: boric acid H_3BO_3 - 0.01%, calcium nitrate $CaNO_3$ - 0.03%, magnesium sulfate $MgSO_4$ - 0.02%, potassium nitrate KNO_3 – 0.01%. the energy activity and viability of pollen grains increases by 1.7–2 times. It has been established that energy activity, pollen viability, and pollen tube growth rate in the studied species and varieties of the genus *Clarkia Pursh* from three different sections (*Rhodanthos*, *Godetia*, *Phaeostoma*) are sensitive to both the cultivation environment and the duration of cultivation time.

Keywords: *Clarkia Pursh*, sections *Rhodanthos*, *Godetia*, *Phaeostoma* selection, pollen viability, in-vitro, pollen tube growth rate

Кларкия (*Clarkia Pursh*) – однолетние, травянистые, декоративно-цветущие растения, относящиеся к семейству кипрейные (*Onagraceae Juss*). Известно 42 вида кларкии и почти все они являются эндемиками западной части Северной Америки. В декоративном садоводстве и цветоводстве распространены сорта кларкии прелестной (*C. amoena* (Lehm.) A. Nelson & J. F. Macbride), включающей подвиды *C. amoena* subsp. *lindleyi* (Douglas) H. Lewis & M.E. Lewis, *C.*

amoena subsp. *whitneyi* (A. Gray) H. Lewis & M. E. Lewis; кларкии ноготковой *C. unguiculata* Lindl. и *C. pulchella* Pursh, особенно широко культивируемой в Европе. Виды кларкии и выведенные из них сорта используются в ландшафтном дизайне для оформления различных цветников, миксбордеров, групп, мавританских газонов, в бордюрных посадках, в контейнерном цветоводстве – для оформления вазонов, подвесных корзин, в фитодизайне и на срез [1].

От продуктивных качеств пыльцы зависят процессы оплодотворения и развития полноценного семени и жизнеспособности потомства, что особенно актуально для однолетних видов кларкии, размножаемых только семенами. Скорость роста пыльцевой трубки — одна из основных составляющих селективной ценности гаметофита [2]. В настоящее время, пыльцевая селекция широко применяется как экспресс-метод для оценки реакции генотипов на различные абиотические стресс-факторы, токсические вещества и патогены, для оценки устойчивости разных видов растений к высоким и низким температурам [3].

По литературным данным пыльца у кларкии крупная, соединена висциновыми нитями, пыльцевые зерна достигают в длину 100-150 мкм, подавляющее большинство образцов пыльцы, представляли собой очень рыхло агрегированные пыльцевые массы, которые, были более подвержены переносу от пчелы к цветку (MacSwain et al., 1973) [4]. А. А. Нове и S. J. Mazer (2013) считают, что на конкурентоспособность пыльцы кларкии могут влиять различные морфометрические характеристики, включая размер пыльцы и объем пыльцевых зерен. Эти авторы также выявили, что характеристики пыльцы после самоопыления и перекрестного опыления не различались ни в пределах самоопыляющихся, ни в ауткроссирующих таксонах и высказали предположение, что система размножения и качество пыльцы могут эволюционировать у *Clarkia* совместно, но на продуктивность пыльцы в естественных популяциях явно влияют и другие факторы [5].

Для прорастания пыльцы необходимы определенные условия: температура, влажность, состав среды и другие [6]. Основными компонентами обычно используемых сред для проращивания пыльцы являются сахароза и борная кислота [7,8].

Для видов кларкии из коллекционного фонда ФГБОУ ВО Новосибирского ГАУ, в основном, ауткроссинговых актуально изучение энергетической активности и жизнеспособности пыльцевых зерен *in-vitro* в целях совершенствования методов селекции. Поэтому была поставлена цель: изучить морфометрические и физиологические качества пыльцы у разных видов и сортов кларкии, включая активность и жизнеспособность пыльцевых зерен в культуре *in-vitro*.

Объекты, методы и методика исследования. Для расширения промышленного ассортимента декоративно-цветущих однолетних растений и использовании их в озеленении населенных пунктов юга Западной Сибири на базе Новосибирского ГАУ (55.0312880, 82.9903190) в 2010 г. была начата селекционная работа с перспективными интродуцентами рода *Clarkia*.

Объекты исследования – пыльца видов и сортов кларкии из трех различных секций: секция *Rhodanthos*: *C. amoena* сорт Малиновая чаша (патент № 13349 от 08.02.2024) и подвид *C. amoena* subsp. *lindleyi* сорт Персиковая чаша (патент № 13357 от 08.02.2024), секция *Godetia*: *C. purpurea* (Curtis) A. Nelson & J. F. Macbride сорт Лиловая фея (патент № 13350 от 08.02.2024), секция *Phaeostoma*: *C. unguiculata* Lindl. Коралловые рифы (патент № 13359 от 08.02.2024).

Методика включала следующие этапы:

1) Сбор пыльцы с цветков кларкии. Пыльца собирается с каждого вида и (или) сорта кларкии – отдельно, не допуская смешивания образцов, в фазе полного цветения (50-75 % раскрытых цветков);

2) Культивирование пыльцы *in-vitro* и оценка роста пыльцевых трубок: производится на стерильном предметном стекле, в капле среды, содержащей ПЭГ 6000 в концентрации 30 % с добавлением микроэлементов: борной кислоты H_3BO_3 – 0,01 %, нитрата кальция $Ca(NO_3)$ – 0,03 %, сульфата магния $MgSO_4$ – 0,02 %, нитрата калия KNO_3 – 0,01 % и тщательно перемешивают; затем предметное стекло с культивируемой пылью кладут между слоями влажной фильтровальной бумаги в закрытую чашку Петри и ставят для проращивания в термостат при постоянной температуре 25 °С; Контроль активности и жизнеспособности пыльцы проводят

через 4 часа, а конечный результат анализируется через 24 часа. Для контрольного варианта мы использовали среду с замещением раствора ПЭГ 6000 на раствор с оптимальной 15 % -ой концентрацией сахарозы и добавлением тех же микроэлементов в равной опыту концентрации.

3) Измерение размеров пыльцевых зерен и пыльцевых трубок проводили с использованием микроскопа БИОМЕД 5, микрофотосъемку с использованием цифровой камеры TOUPCAM FM A 050.

4) Размер пыльцевых зерен и пыльцевых трубок измеряется в микронах с использованием окуляр микрометра. В подсчет включается не менее 5 полей зрения, просматривается не менее 100 пыльцевых зерен;

5) Определение энергетической активности пыльцевых зерен и их жизнеспособности, оценка роста пыльцевых трубок. Определение энергетической активности (энергии прорастания) пыльцевых зерен проводили по методике Я. Г. Оголевец (1961) [9]. Энергия прорастания пыльцевых зерен соответствует величине, являющейся произведением процента прорастания пыльцы (жизнеспособность, %) за определенный срок на относительную длину пыльцевой трубки, выраженную в процентах к максимальной длине, полученной в опыте.

Жизнеспособность пыльцы соответствует числу проросших пыльцевых зерен по отношению к их общему числу, выраженному в процентах. Проросшими считали пыльцевые зерна с длиной пыльцевой трубки равной длине пыльцевого зерна в экваториальной проекции (диаметру) и более.

Для статистической обработки данных мы использовали свободную среду программирования R-studio, а для выявления внешних факторов влияния на скорость роста пыльцевых трубок – критерий Краскела-Уоллиса.

Результаты и их обсуждение. Различными исследователями было подтверждено, что сахароза способствует увеличению интенсивности дыхания пыльцы и не может являться полноценной основой для определения энергетической активности и жизнеспособности пыльцевых зерен. Поэтому мы разработали более простой способ определения жизнеспособности пыльцы у различных видов кларкии, путем ее культивирования на среде, включающей раствор синтетического осмотически активного вещества – полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000 (ПЭГ. 6000) в концентрации 30 %, не участвующий в метаболизме растительной клетки, что позволяет определить энергетические возможности пыльцевых зерен и их жизнеспособность.

У исследованных видов кларкии секции *Godetia* и *Rhodanthos* отличались наличием разнопоровых (трех- и четырех-поровых) пыльцевых зерен. Самые крупные четырехпоровые пыльцевые зерна были отмечены у *C. purpurea* Лиловая фея из секции *Godetia*, экваториальный диаметр $84,8 \text{ мкм} \pm 6,5 \text{ мкм}$ (min 76,2–max 95,7 мкм), самые мелкие трехпоровые в секции *Rhodanthos*, экваториальный диаметр варьировал от $59,4 \text{ мкм} \pm 3,43 \text{ мкм}$ (min 51,8 – max 64,7 мкм) у *C. amoena* subsp. *lindleyi* Персиковая чаша до $67,5 \text{ мкм} \pm 4,2 \text{ мкм}$ (min 57,0– max 75,3 мкм) у *C. amoena* Малиновая чаша. Пыльцевые зерна *C. unguiculata* Коралловые рифы из секции *Phaeostoma* отличались звездчатой трехпоровой формой с экваториальным диаметром $76,8 \text{ мкм} \pm 3,98 \text{ мкм}$ (min 58,6–max 87,4 мкм). Пыльцевые зерна у изученных видов кларкии могут давать сразу несколько пыльцевых трубок (из каждой поры).

Результаты подтвердили, что при использовании среды с содержанием ПЭГ 6000 в концентрации 30 % – показатели скорости роста пыльцевой трубки, энергетической активности (энергии прорастания) и жизнеспособности пыльцевых зерен у представителей рода *Clarkia*, из трех различных секций значительно превышают эти же показатели, полученные на среде с использованием 15 %-ной сахарозы, как после 4-х часов, так и после 24-х часов культивирования (Табл. 1).

Таблица 1.

Энергетическая активность и жизнеспособность пыльцевых зерен у видов и сортов *Clarkia Pursh*, в зависимости от времени культивирования и состава среды

Вид кларкии	Время, часы	*ПЭГ 6000 - 30 %			*Сахароза -15 % (контроль)		
		**Энергия прорастания, %	Жизнеспособность, %	Длина ПТр, мкм	**Энергия прорастания, %	Жизнеспособность, %	Длина ПТр, мкм
Секция <i>Rhodanthos</i>							
<i>C. amoena</i> Малиновая чаша	4	29,5 ± 1,7	44,3 ± 3,4	90,8 ± 5,2	12,5 ± 1,9	19,4 ± 2,2	38,3 ± 5,9
	24	35,5 ± 4,5	59,4 ± 2,6	133,8 ± 16,1	25,1 ± 2,5	35,2 ± 1,3	63,2 ± 6,2
<i>C. amoena subsp. lindleyi</i> Персиковая чаша	4	19,4 ± 2,1	41,7 ± 2,3	75,3 ± 5,9	11,8 ± 0,9	19,1 ± 1,4	27,4 ± 2,0
	24	33,8 ± 3,5	54,3 ± 2,6	137,5 ± 14,0	17,4 ± 1,2	28,2 ± 1,4	35,9 ± 3,2
Секция <i>Godetia</i>							
<i>C. purpurea</i> Лиловая фея	4	43,9 ± 5,1	76,1 ± 4,9	113,4 ± 16,3	29,0 ± 2,6	38,9 ± 3,5	75,3 ± 6,8
	24	51,2 ± 4,7	87,9 ± 2,6	179,0 ± 33,9	29,1 ± 1,6	45,7 ± 2,5	99,4 ± 8,1
Секция <i>Phaeostoma</i>							
<i>C. unguiculata</i> Коралловые рифы	4	37,1 ± 3,2	47,2 ± 2,0	105,2 ± 14,5	20,8 ± 1,3	28,8 ± 3,3	72,2 ± 3,8
	24	38,7 ± 3,9	75,3 ± 4,2	134,1 ± 29,3	20,9 ± 3,4	41,3 ± 2,5	88,2 ± 18,6
Средние значения	4	32,5 ± 3,0	52,3 ± 3,1	96,2 ± 10,4	18,5 ± 1,7	26,5 ± 2,6	53,3 ± 4,6
	24	39,8 ± 4,2	69,2 ± 3,0	146,1 ± 23,3	23,1 ± 2,2	37,6 ± 1,9	71,7 ± 9,0

*Среда как с ПЭГ 6000, так и с сахарозой включала: борную кислоту – НЗВОЗ – 0,01%, нитрат кальция Ca (NO₃) – 0,03%, сульфат магния Mg SO₄ – 0,02%, нитрат калия KNO₃ – 0,01%.

** Энергетическая активность (энергия прорастания) пыльцевых зерен рассчитывалась по методике: Оголевец, 1961.

1) Секция *Rhodanthos*: у *C. amoena* сорта Малиновая чаша энергетическая активность и жизнеспособность пыльцевых зерен была выше в 2,4–2,1 раза через 4-е часа культивирования и в 1,4–2,4 раза – через 24 часа, при этом длина пыльцевых трубок была выше в 2,4–2,1 раза соответственно, чем у контрольных вариантов, культивируемых на среде с сахарозой. У подвида *C. amoena subsp. lindleyi* сорта Персиковая чаша показатели энергетической активности и жизнеспособности пыльцы были выше в 1,7–2,0 раза через 4-е часа культивирования и в 2–1,9 раза через 24 часа культивирования соответственно, при этом длина пыльцевых трубок была выше в 2,7–3,8 раза, чем у контрольных вариантов;

2) Секция *Godetia*: у *C. purpurea* сорта Лиловая фея энергетическая активность и жизнеспособность пыльцевых зерен через 4-е часа культивирования была выше в 1,5–2 раза, чем у контрольного варианта, а при увеличении времени культивирования до 24-х часов – в 1,8–1,9 раза, при этом длина пыльцевых трубок выше в 1,5–1,8 раза, соответственно.

3) Секция *Phaeostoma*: у *C. unguiculata* сорта Коралловые рифы энергетическая активность и жизнеспособность пыльцевых зерен после 4-х часов культивирования была выше в 1,8–1,6 раза соответственно, а после 24-х часов культивирования энергетическая активность и жизнеспособность пыльцевых зерен были выше в 1,8 раза, чем у контрольного варианта. Длина пыльцевых трубок была выше в 1,5 раза при всех сроках культивирования.

Средние значения энергетической активности и жизнеспособности пыльцевых зерен для всех представленных видов и подвида *Clarkia* из трех секций на среде с ПЭГ 6000 превышают показатели контроля в 1,8–2,0 раза через 4-е часа и в 1,7–1,8 раза через 24-е часа культивирования. Длина пыльцевых трубок на среде с ПЭГ 6000 после 4-х и 24-х часов культивирования больше в 1,8–2 раза соответственно, чем у контрольных вариантов

Анализ данных в среде программирования R-studio и кластерный анализ подтвердили, что на скорость роста пыльцевых трубок, энергию прорастания и жизнеспособность пыльцевых зерен у всех видов кларкии из трех различных секций достоверно влияют: состав среды культивирования (осмотик) ($p\text{-value} = 2.557e^{-10}$), продолжительность времени культивирования

(p -value = $5.057e^{-09}$ ($5 \cdot 10^{-9}$), виды и сорта кларкии (p -value = $3.209 e^{-05}$) и не влияют условия года вегетации (p -value = 0.3307) (Рис. 1).

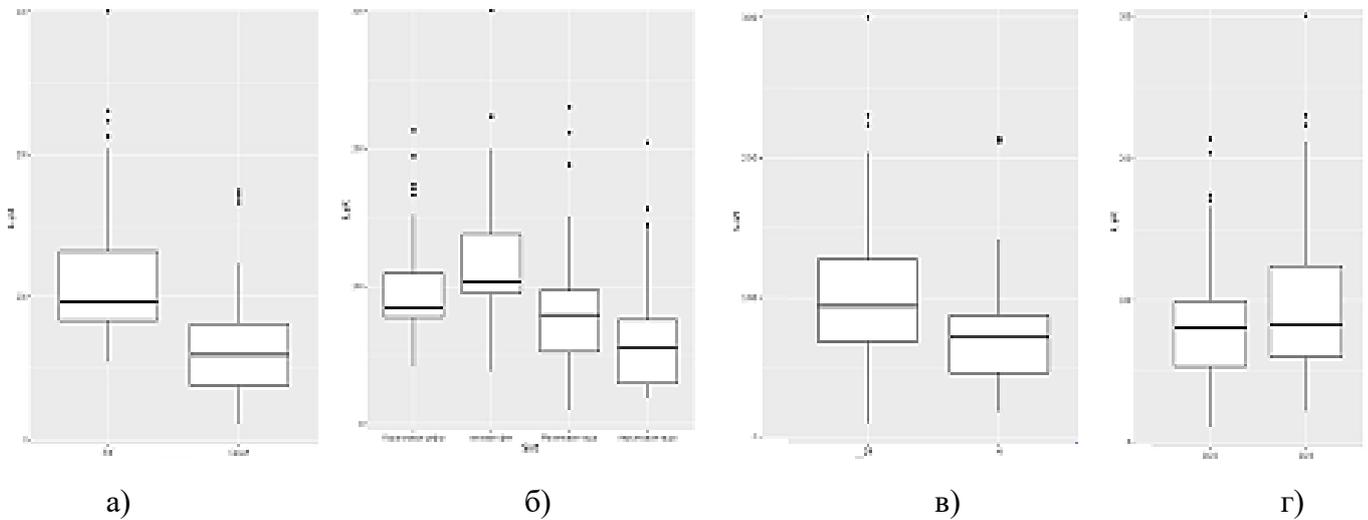


Рисунок 1. Влияние разных факторов на длину пыльцевой трубки у видов и сортов кларкии: а) состав среды культивирования (осмотик); б) виды и сорта кларкии; в) продолжительность времени культивирования; г) условия года исследования.

Таким образом, заявленный способ определения жизнеспособности пыльцы видов кларкии обладает преимуществом по сравнению с раствором сахарозы и может использоваться для сохранения и использования ресурсов зародышевой плазмы и селекции новых сортов декоративных культур рода *Clarkia*. На данный способ зарегистрирована заявка на патент (Заявка № 2024102029 от 28.01.2024).

Библиографический список

1. Flora of North America. URL: <http://dev.floranorthamerica.org/Clarkia>
2. Ottaviano, E., Sidoti, P., Villa, M. (1986). Pollen Competitive Ability in Maize Selection and Single Gene Analysis. In: Mulcahy, D.L., Mulcahy, G.B., Ottaviano, E. (eds) Biotechnology and Ecology of Pollen. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8622-3_4.
3. Фотев Ю. В. Оценка холодостойкости коллекционных образцов момордики (*Momordica charantia* L.) по прорастанию пыльцы при низкой температуре *in vitro*. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2022;183(3):39-47. DOI: 10.30901/2227-8834-2022-3-39-47
4. MacSweyn J., Raven P., Thorp R. Comparative behavior of bees and Onagraceae. IV *Clarkia* of bees the western United States // Univ. of Calif. Publ. – 1973. – Vol. 70. – P. 1–80.
5. Hove AA, Mazer SJ. Pollen Performance in *Clarkia* Taxa with Contrasting Mating Systems: Implications for Male Gametophytic Evolution in Selfers and Outcrossers. *Plants* (Basel). 2013 Apr 24;2(2):248-78. doi: 10.3390/plants2020248. PMID: 27137375; PMCID: PMC4844357.
6. Голубинский И. Н. Биология прорастания пыльцы. Киев: Наукова думка, 1974. 368 с.
7. Brewbaker J.L., Kwack B.H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth // *American Journal of Botany*. 1963. V. 50, № 9. P. 859–865.
8. Авторское свидетельство № 328885 А1 СССР, МПК А01G 7/00. Питательная среда для проращивания пыльцы растений: № 1442720/30-15: заявл. 22.05.1970: опубл. 09.02.1972 / Н. Л. Кривко.
9. Оголевец Я. Г. О самостерильности Ирисов // Бюллетень ГБС.- Вып. 40, 1961.– С. 77–85.

МИКРОЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ РАСТЕНИЙ КАК ЭЛЕМЕНТ ВИДОСПЕЦИФИЧНОГО ГОМЕОСТАЗА

Д.С. Круглов

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный университет», Новосибирск, Россия

В современной ботанике систематика растений перешла от морфологического признака в разделении растений на систему Angiosperm phylogeny group – APG, в основе которой лежат генетические признаки, по которым проводится построение филогенетических отношений. В системе APG IV построение основано на анализе последовательностей ДНК генов хлоропластов и гена, кодирующего рибосомы. Микроэлементный состав растений также имеет прогностическое значение для хемосистематики растений. В связи с тем, что поглощение микроэлементов из почвы происходит с использованием белков-переносчиков, чей состав определяется естественно тоже генами, можно ожидать корреляции между филогенетическим деревом и деревом микроэлементного статуса построенных с использованием иерархической кластеризации. Целью данной работы явилась проверка выдвинутой гипотезы. Объектами исследования служили надземные части растений семейства Boraginaceae - *Pulmonaria mollis* Wulf. ex Horn., *Pulmonaria obscura* Dum., *Nonea rossica* Stev. *Onosma arenaria* Waldst. et Kit., *Onosma simplissima* L., *Ehium vulgare* L., *Brunnera sibirica* Stev. и *Lithospermum officinale* L., собранные в фазе цветения в разные годы и в наиболее типичных местах ареалов. Количественное определение содержания элементов проводили методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. Для анализа полученных данных была применена иерархическая кластеризация с формированием кластеров по методу Варда. Анализ построенного иерархического дерева показал, что распределение растений по кластерам коррелирует с их распределением в системе APGIV. Установлено, что распределение растений на основании микроэлементного статуса коррелирует с распределением, полученным с использованием молекулярно-генетического анализа.

Ключевые слова: геносистематика, молекулярно-генетический анализ, APGIV, бурачниковые, микроэлементный статус, иерархическая кластеризация

TRACE ELEMENT COMPOSITION OF PLANTS AS A COMPONENT OF SPECIES- SPECIFIC HOMEOSTASIS

D.S. Kruglov

Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

Today plant taxonomy has moved from morphological characters for dividing plants to the way offered by Angiosperm phylogeny group - APG system, which is based on genetic characters that are used to creating phylogenetic relationships. This is based on the analysis of DNA sequences of chloroplast genes and the gene encoding ribosomes. On the other hand, the trace element composition of plants also has prognostic significance for plant chemosystematics. Due to the fact that the absorption of trace elements from the soil occurs using proteins carrier, whose composition is naturally also determined by genes, one can expect a correlation between the phylogenetic tree and the tree of trace element status constructed using hierarchical clustering. The purpose of this work was to verify the hypothesis presented. The subjects of the study were the above-ground parts of plants of the Boraginaceae family, *Pulmonaria mollis* Wulf. ex Horn., *Pulmonaria obscura* Dum., *Nonea rossica* Stev. *Onosma arenaria* Waldst. et Kit., *Onosma simplissima* L., *Ehium vulgare* L., *Brunnera sibirica* Stev. and *Lithospermum officinale* L., collected in the flowering phase in different years and in the most typical places of their habitats. Quantitative determination of elements was carried out by mass spectrometry with inductively coupled plasma. Hierarchical clustering was used with cluster formation using the Ward method to analyze the data. Analysis of the constructed hierarchical tree showed that the distribution of plants into

clusters correlates with their distribution in the APGIV system. We established that the distribution of plants according to the status of trace elements correlates with the distribution obtained using molecular genetic analysis.

Keywords: gene systematics, molecular genetic analysis, APGIV, Boraginaceae, trace element status, hierarchical clustering

Молекулярно-генетические методы исследования, благодаря внедрению ПЦР-технологии широко используются в современной биологической науке. В частности, в ботанике систематика растений перешла от морфологического признака в разделении растений на различные таксоны (система Тахтаджана) на систему Angiosperm phylogeny group – APG, в основе которой лежат генетические признаки [1]. В базисе системе APG лежит построение филогенетических отношений на основании последовательностей нескольких фрагментов ДНК. Последняя версия системы классификации цветковых растений APG IV основана на кладистическом анализе последовательностей ДНК генов хлоропластов и гена, кодирующего рибосомы [2]. После составления матрицы последовательностей она анализируется с использованием методов многофакторного анализа и наиболее часто метода иерархической кластеризации с построением дендрограммы – филогенетического дерева. Система позволяет перейти от описательного подхода к количественному с использованием различных методов численного анализа многомерных объектов.

Нашими исследованиями было показано, что микроэлементный состав растений может иметь прогностическое значение для хемосистематики растений. []. Здесь следует заметить, что микроэлементы необходимы растительному организму в качестве или прямых катализаторов и инициаторов начального этапа биосинтеза различных метаболитов или в качестве простетических компонентов различных ферментов, регулирующих такой биосинтез [8]. Поглощение микроэлементов из почвы, в основном, происходит активным путём по симпласту с использованием различных белков-переносчиков элементов через плазмолемму [11]. Естественно, что состав белков-переносчиков определяется естественно тоже генами, кодирующими белки и можно ожидать вида корреляции между филогенетическим деревом и деревом микроэлементного статуса построенных с использованием иерархической кластеризации.

Целью данной работы явилась проверка гипотезы о корреляции таксономического положения растения, полученного с использованием молекулярно-генетическим подходом и полученного с использованием микроэлементного статуса растения.

Объектами исследования служили надземные части растений семейства *Boraginaceae* - *Pulmonaria mollis* Wulf. ex Horn., *Pulmonaria obscura* Dum., *Nonea rossica* Stev. *Onosma arenaria* Waldst. et Kit., *Onosma simplissima* L., *Ehium vulgare* L., *Brunnera sibirica* Stev. и *Lithospermum officinale* L., собранные в фазе цветения в разные годы и в наиболее типичных местах ареалов. Количественное определение элементов проводили методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на приборе ELAN DRC-II (Perkin Elmer Inc.).

Для анализа полученных данных была применена иерархическая кластеризация с формированием кластеров по методу Варда [4] и стандартизацией по строкам. В качестве расстояния между кластерами берется прирост суммы квадратов расстояний объектов до центров кластеров, получаемый в результате их объединения. На каждом шаге алгоритма объединяются такие два кластера, которые приводят к минимальному увеличению целевой функции, т.е. внутригрупповой суммы квадратов. В качестве критериев объединения точек в кластер является условие, что Евклидово расстояние между точками меньше некоей задаваемой величины ϵ , которая в данном случае выполняет роль некоего «доверительного интервала» для оценки значимости различий между кластерами. В качестве величины ϵ , была принята индивидуальная изменчивость микроэлементного состава по заросли равная 15% [3] Для построения иерархического дерева использовали пакет прикладных программ “STATISTICA 10.0”

В результате было определено содержание 60-ти элементов - Li, Be, B, Na, Mg, Al, Si, P, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Ag, Cd, Sn, Sb, I, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Hg, Tl, Pb, Bi, Th, U

Анализ построенного иерархического дерева (рис 1) показывает, распределение растений по кластерам коррелирует с их распределением в системе APGIV и четко выделяются кластеры, объединяющие растения из двух разных триб Boraginaceae и Lithospermeae.

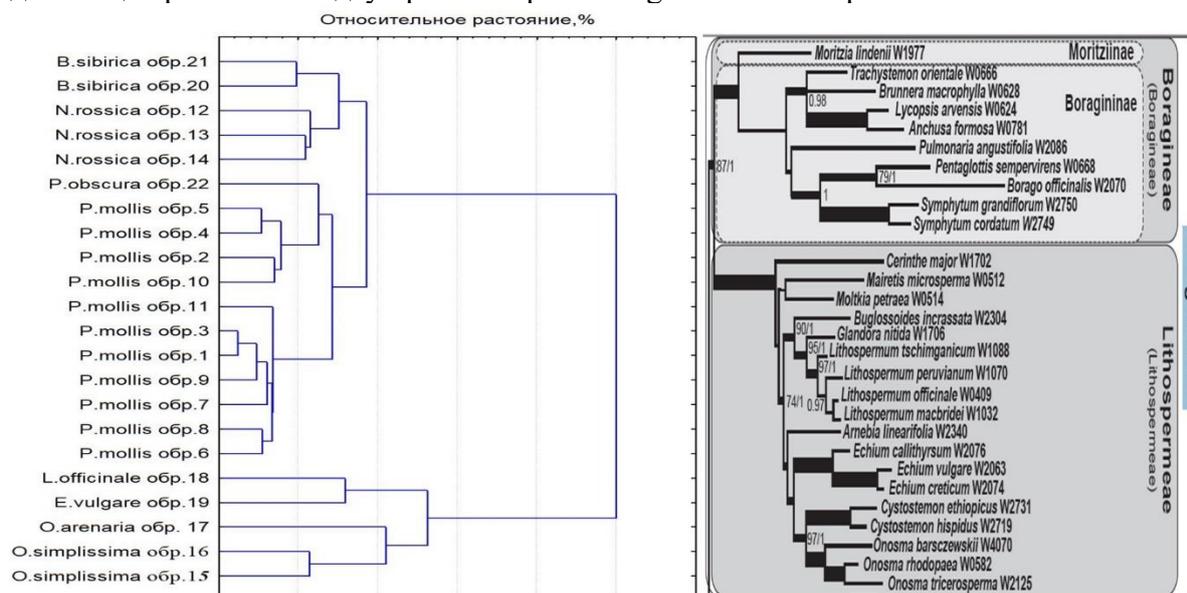


Рис 1. Иерархическое дерево кластеризации растений по микроэлементному статусу и филогенетическое дерево по системе APGIV из [5]

Внутри триб растения что вне зависимости от места сбора и года сбора группируются по видам, несмотря на значительное варьирование абсолютных значений содержания того или иного элемента. Такая инвариантность может быть объяснена тем, что важным является не столько абсолютное значение сколько некий функционал образованный этими элементами. Такой функционал, что в свою очередь может определяться белками-переносчиками, которые кодируются генами, используемыми в молекулярно-генетическом анализе. Поскольку геном растений уникален то и микроэлементный состав растения не может меняться, выходя за запрограммированные генетически пределы и можем говорить о микроэлементном статусе растения как компоненте гомеостаза растения. Таким образом в результате данной работы установлено, что содержания микроэлементов варьирует существенно у одного и того же вида, однако это не влияет на нормированное соотношение микроэлементов в растении и таким образом применяемый метод анализа не только вид специфичен, но и инвариантен относительно вариации абсолютных значений концентрации элементов.

Библиографический список:

1. Гельтман Д. В. Современные системы цветковых растений // Ботанический журнал. 2019, том 104, № 4, с. 503-527. <https://doi.org/10.1134/S0006813619040045>
2. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV// The Linnean Society of London, Botanical Journal of the Linnean Society, 2016, 181: 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
3. Круглов Д. С. Прогностическая применимость микро элементного профиля растений для задач систематики // Ботаника в современном мире. Труды Русского ботанического общества Т. 1: Систематика высших растений. Флористика и география растений. Охрана растительного мира. Палеоботаника. Ботаническое образование. - Махачкала: АЛЕФ, 2018. - с.58-60
4. Murtagh F, Legendre P. Ward's hierarchical clustering method: clustering criterion and agglomerative algorithm // Journal of Classification. 2014, 31(3), pp. 274–295
5. Chacon Ju., Luebert F., Hilger H. H., Ovchinnikova S., Selvi F., Cecchi L., Guilliams C.M., Hasenstab-Lehman K., Sutory K., Simpson M.G., Weigend M. The borage family (Boraginaceae s.str.): A revised infrafamilial classification based on new phylogenetic evidence, with emphasis on the placement of some enigmatic genera // Taxon 2016. 65 (3): 523-546. <http://dx.doi.org/10.12705/653.6>

УДК 581.143.6

ИНДУКЦИЯ КАЛЛУСОГЕНЕЗА У ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР *CUCUMIS SATIVUS* L. И *BETA VULGARIS* L.**М.Е. Лапкасов^{1,2}, Т.А. Кузнецова², Ю.В. Ухатова¹**¹Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

Санкт-Петербург, РФ

Исследовано влияние различного состава питательных сред, типа эксплантов (гипокотили, эпикотили, семядоли, фрагменты листа) на каллусогенез двух сортов и гибрида *Cucumis sativus* L. и четырех сортов и гибрида *Beta vulgaris* L. Подобран режим стерилизации семян, которые в дальнейшем проращивались в асептических условиях. Из полученных проростков получали разные типы эксплантов, которые использовались для получения каллусных тканей. Экспланты высаживались на модифицированные среды на основе среды Мурасиге-Скуга (МС), содержащие различные стимуляторы роста. Оптимальной средой для получения каллусной ткани из сортов огурца стала среда МС с содержанием 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, при обеспечении светового режима с 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2200 люкс на м², при температуре от 20 до 24 °С. Наиболее успешное использование в качестве экспланта эпикотилей сорта 'Ochiai 9'. Наилучшей средой для образования каллусной ткани свёклы стала среда МС с добавлением 0,1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 1 мг/л 6-бензиламиннопурина для исследуемых сортов 'Гранатовый Шар', 'Цыганский Барон', 'Комбат', 'Санькина Любовь' и гибрида 'Партнер F1', наилучший тип экспланта – фрагменты листовой пластинки. Полученный по итогу работы каллус можно применять для изучения регенерационной способности, использовать для получения новых сортов методами ускоренной селекции.

Ключевые слова: каллусогенез, *Beta vulgaris* L., *Cucumis sativus* L., культивирование, *in vitro*.

Применение биотехнологических подходов селекции разных овощных культур начинается с разработки эффективных и воспроизводимых методов регенерации и каллусогенеза, поскольку без них невозможно проводить дальнейшие исследования с применением методов генетической инженерии и биотехнологии, так как на выходе нельзя будет получить целое растение для дальнейшего высаживания и изучения в полевых условиях. Для разработки методик каллусообразования на эксплантах; нужно провести тщательный анализ сред, обогащенных фитогормонами, так как от этого будет зависеть вид образовавшегося каллуса, его консистенция и размер [2]. У культур свёклы и огурца в настоящее время изучены только единичные генотипы [1, 4, 6, 7], возможности коллекции ВИР позволяют расширить выборку и провести анализ растений различных сортов и гибридов по способности каллусообразования и регенерации в условиях *in vitro*.

Материалы и методы. В качестве материала исследования использован материал из коллекции ВИР: два сорта и гибрид *Cucumis sativus* L.: 'Ochiai 9', 'Cucumber Pickmore', 'Britanos F1' и четыре сорта *Beta vulgaris* L.: 'Гранатовый Шар', 'Цыганский Барон', 'Комбат', 'Санькина Любовь' и один гибрид 'Партнер F1'. В качестве исходных эксплантов для инициации культуры *in vitro* брали семена 2018 года репродукции (огурец) и 2021 (свёкла).

Для введения в асептические условия семена стерилизовали в растворе с содержанием активного хлора – 2,5 % в течение 15 минут с последующим трехкратным промыванием в стерильной воде. Эффективность стерилизации оценивали по отсутствию роста посторонней микрофлоры при помещении семян после обработки на питательную среду. Базовым составом

питательной среды была среда по прописи Мурасиге и Скуга (1962), МС. В эксперименте оценивали влияние различных регуляторов роста на индукцию каллусообразования (табл. 1).

Проращивание семян на поверхности питательной среды проводили при 16-часового фотопериоде и освещенности 2200 люкс на м² при температуре воздуха от 20 до 24 °С. В ходе работы по получению каллуса исследовали способность к каллусогенезу у различных типов эксплантов (фрагменты листьев, семядоли, черешки, гипокотили и эпикотили), которые помещали на среду МС, обогащенную различными стимуляторами роста (табл. 1) и культивировали в контролируемых постоянных условиях (описаны выше) световой комнаты.

Эффективность каллусообразования оценивали как долю (%) эксплантов, на которых образуется каллусная ткань, от общего количества посаженных на питательную среду эксплантов в одном варианте опыта. При введении в культуру *in vitro* семена овощных культур равномерно распределялись по 4 питательным средам по 40 семян от сорта или гибрида. Получаемые проростки нарезались на экспланты и высаживались на среды. Из-за неравномерного произрастания растения из семени, количество посадочного материала для образования каллусной ткани различилось. В среднем на среду от сорта или гибрида изучаемых культур высаживалось по 35 эксплантов.

Таблица 1

Состав сред для индукции каллусообразования из эксплантов *Cucumis sativus* и *Beta vulgaris in vitro*

Состав среды	Номер сред для культивирования					
	1 [7,8]	2 [4]	3 [4]	4 [6]	5 [1]	6 [3]
	<i>Cucumis sativus</i>			<i>Beta vulgaris</i>		
МС макро- и микроэлементы	+	+	+	+	+	+
Витамины МС	+	+	+	+	+	+
Хелат железа	+	+	+	+	+	+
6-БАП, мг/л	-	1,0	1,0	1,0	-	0,5
2,4-Д, мг/л	2,0	-	1,0	0,1	1,0	-
PVP, мг/л	-	-	-	-	5,0	-
НУК, мг/л	-	1,0	-	-	-	0,1
ИУК, мг/л	-	-	-	-	-	-
Сахароза, г/л	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0

Примечание: БАП – 6-бензиламиннопурин; 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; PVP – поли-N-винилпирролидон; НУК – нафталинуксусная кислота; ИУК – индолил-3-уксусная кислота.

Изучали также влияние освещенности на каллусогенез. Получение каллусной ткани проводили в двух режимах освещенности: в темноте и при обеспечении светового режима с 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2200 люкс на м². Температура воздуха составляла от 20 до 24 °С. Появление каллусной ткани зависело от используемого сорта, среды, а также выбранных условий и варьировалось от 4 до 8 недель. Для более точных показателей времени образования каллуса результаты снимались каждые сутки.

Результаты и обсуждение. Стерилизация приводила к 96,6±1,7 % стерильности семян у сортов огурца, у свеклы – 96,0±1,9 %. Процент прорастания семян после стерилизации у сортов и гибрида *Cucumis sativus* L. составил 45,8±2,2 %, у сортов и гибрида *Beta vulgaris* L. – 55,0±2,1 %. Оптимальной средой для получения проростков из семян большинства изучаемых овощных культур *in vitro* стала безгормональная среда МС, на которой процент прорастания у сортов и гибрида *Cucumis sativus* L. составил 68,3±14,9 %, у сортов и гибрида *Beta vulgaris* L. – 68,0±14,7 %.

Из трех изучаемых сред для получения каллуса из эксплантов *Cucumis sativus* (табл. 1: номера сред 1, 2, 3), наиболее интенсивное каллусообразование наблюдали на среде МС с содержанием 2 мг/л 2,4-Д [7,8] (среда № 1), на свету. Из 61 изучаемого экспланта разного происхождения, посаженных на эту среду, культивируемых на свету, на 43 образовалась каллусная ткань (табл. 2).

Таблица 2

Эффективность каллусообразования (%) образцов *Cucumis sativus* на модифицированных средах с использованием разных типов эксплантов

Сорт / гибрид	Среда №1		Среда №2	Среда №3
	МС + 2 мг/л 2,4-Д		МС + 1 мг/л 6-БАП, 1 мг/л НУК	МС+ 1мг/л 2,4-Д, 1 мг/л 6-БАП
	свет	темнота	свет	свет
‘Ochiai 9’	70,5±5,9	16,4±4,6	42,1±11,6	0,0±0,0
‘Cucumber Pickmore’	65,0±10,9	0,0±0,0	35,0±10,9	50,0±12,9
‘Britanos F1’	41,2±12,3	20,0±9,2	60,0±11,2	50,0±18,9

Лучший тип эксплантов – эпикотили сорта ‘Ochiai 9’. Каллус образовывался на концах эпикотилия и достигал размеров от 7 до 15 мм в диаметре на 48 сутки роста. На других типах эксплантов каллус был точечный, не превышающий 4 мм в диаметре на 48 сутки роста. Каллус, полученный на листьях, образовывался чаще всего в районе прикрепления черешка к листовой пластинке. Каллус сорта ‘Ochiai 9’ можно охарактеризовать как плотноглобулярную массу, светло-зеленого цвета. При культивировании каллуса более 40 – 50 суток он перестает расти, либо растет очень медленно и начинает темнеть. В литературе потемнение каллусных тканей объясняется накоплением в них фенольных соединений [2].

На сорте ‘Cucumber Pickmore’ из 20 изучаемых эксплантов каллус образовался на 13 (табл. 2). Его можно охарактеризовать как плотноглобулярную массу, светло-зеленого или желто-зеленого цвета. На гибриде ‘Britanos F1’ из 17 изучаемых эксплантов каллус образовался только на 7 эксплантах (табл. 2). Его можно охарактеризовать как плотноглобулярную массу, светло-зеленого или желто-зеленого цвета. В местах соприкосновения со средой каллус становился рыхлым.

В темноте эффективность каллусообразования на среде № 1 существенно снижается. На эксплантах сорта ‘Cucumber Pickmore’ каллусообразование отсутствует, у сорта ‘Ochiai 9’ из 61 экспланта, посаженных на среду, только на 10 удалось получить каллус (наилучший тип экспланта в этих условиях гипокотиль и фрагменты листа), из 17 эксплантов гибрида ‘Britanos F1’ только на 4 эксплантах (фрагментах листа), образовывался точечный каллус.

На среде №2 содержащей 1 мг/л НУК и 1 мг/л 6-БАП [4] было использовано 59 эксплантов, были задействованы листья и семядоли растений. Эксперимент проводился на свету. Лучше всего каллусная масса образовывалась на эпикотилиях сорта ‘Ochiai 9’ (табл. 2). Из 19 эксплантов, посаженных на данную среду, на 8 образовалась каллусная ткань. Каллус образовывался на концах гипокотилия и по всей поверхности листа. На эпикотиле размер каллуса был от 2 до 9 мм в диаметре. На листе каллус образовывался небольшими участками от 3 до 5 мм в местах порезов и в основании. На других эксплантах каллус обнаружен не был.

На различных типах эксплантов гибрида ‘Britanos F1’, и сорта ‘Cucumber Pickmore’ каллус образовывался только на одном типе эксплантов – фрагменты листа. Размеры каллусных тканей достигали 3 – 4 мм. Полученный каллус был плотноглобулярным, обычно светло-желтого или желтого цвета, редко образовывался каллус светло-зеленого цвета.

На среде № 3 с содержанием 1мг/л 2,4-Д и 1 мг/л 6-БАП [4] для получения каллуса было задействовано листья и семядоли растений. На 20 сутки каллус образовался в среднем на 50 % эксплантов сорта ‘Cucumber Pickmore’ и гибрида ‘Britanos F1’ (табл. 2). Каллус образовывался только на одном типе эксплантов – фрагменты листа. Он окружал всю поверхность экспланта, кроме сторон, соприкасающихся со средой. Образованный каллус был плотноглобулярным размером от 3 до 5 мм, зеленого или светло-зеленого цвета с небольшими вкраплениями светло-желтого или желтого цвета.

Для получения каллусной ткани из сортов *Beta vulgaris* из 3 питательных сред лучше всего подошла среда МС с добавлением 0,1 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л 6-БАП [5], независимо от сорта (табл. 3, среда № 4), световой режим с 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2200 люкс на м².

Таблица 3

Эффективность каллусообразования образцов *Beta vulgaris* на модифицированных средах с использованием разных типов эксплантов

Сорт / гибрид	Среда № 4	Среда № 5	Среда № 6
	МС + 1,0 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л 2,4-Д	МС + 1 мг/л 2,4-Д, 5 мг/л PVP	МС + 0,1 мг/л НУК и 0,5 мг/л 6-БАП
	Свет	свет	темнота
‘Гранатовый Шар’	100±0	0,0±0,0	30,0±15,3
‘Цыганский Барон’	100±0	60,0±16,3	22,2±10,1
‘Партнер F1’	100±0	0,0±0,0	52,8±8,4
‘Комбат’	100±0	0,0±0,0	58,3±14,9
‘Санькина Любовь’	100±0	23,1±12,2	20,0±13,3

Каллус образовался на всех эксплантах разного происхождения, но наиболее крупный от 5 до 10 мм в диаметре, несколькими очагами – на фрагментах листовой пластинки. Он имел плотную глобулярную консистенцию, цвет бело-серый, стабильный. Было определено, что экспланты листового происхождения лучше всего подходят для каллусообразования.

Каллус формировался вдоль всего основания листа и в местах порезов. Также были случаи, когда каллус образовывался в местах соприкосновения экспланта со средой. Каллусная ткань была плотноглобулярной и имела бело-серый цвет. Каллус, появляющаяся в местах соприкосновения листа со средой, был рыхлой, темно-зеленого или красноватого цвета, данный тип каллуса характеризуется в литературе как неморфогенный, не способный к дальнейшей регенерации в целое растение [1].

На среде МС с добавлением 1 мг/л 2,4-Д и 5 мг/л PVP (среда № 5) проводили культивирование листовых эксплантов в условиях освещения. Каллус на эксплантах появился только на 32 сутки на 6 эксплантах сорта ‘Цыганский Барон’ небольшими участками (от 1 до 5 мм) по всей длине листа. Каллус можно охарактеризовать как плотный, светло-зеленого цвета, на 89 сутки он приобретал белый цвет.

На 3-х эксплантах сорта ‘Санькина Любовь’ (на поверхности фрагмента листа) образовался светло-зеленый каллус на 127 сутки культивирования. Размер участков – 9 мм. Эксплант вместе с каллусной тканью быстро почернел из-за накопления в них фенольных соединений. Листовые экспланты сортов ‘Гранатовый Шар’, ‘Комбат’ и гибрида ‘Партнер F1’ быстро чернели и образование каллуса обнаружено не было. На среде с содержанием 0,1 мг/л НУК и 0,5 мг/л 6-БАП [3] (среда №6) для получения каллусов было использовано 93 экспланта, были задействованы листья и семядоли растений. Эксперимент проводился без доступа света.

Лучше всего каллусная масса образовывалась на листовых эксплантах гибрида ‘Партнер F1’ и сорта ‘Комбат’. Каллус образовывался в местах порезов, а также участками от 2 до 7 мм по краям. Было отмечено, что несмотря на то, что было получено много каллусной ткани, по сравнению с другими сортами, она быстро чернела.

Образующийся каллус можно охарактеризовать как плотный, глобулярный, белого или кремового цвета. На 12 эксплантах сорта ‘Комбат’, каллус образовался на 26 сутки на 7 эксплантах. Из 10 изучаемых образцов сорта ‘Санькина Любовь’, каллусная ткань образовалась на 29 сутки только на 2 эксплантах. Из 18 эксплантов сорта ‘Цыганский Барон’, каллус образовался на 26 сутки только на 4 эксплантах. Из 10 эксплантов сорта ‘Гранатовый Шар’, каллус образовался на 27 сутки только на 3 эксплантах. Образующийся каллус у всех сортов, можно охарактеризовать как плотный, глобулярный, белого или светло-серого цвета.

При длительном проращивании семян свёклы на среде Мурасиге-Скуга с добавлением 1 мг/л 6-БАП у пары проростков свёклы на безгормональной среде МС, вокруг гипокотилия через 4 недели проращивания начинал появляться плотный белый каллус. После появления каллуса, рост растения замедлялся.

Выводы. Оптимальной средой для получения каллусной ткани из сортов огурца стала среда МС с содержанием 2 мг/л 2,4-Д, на свету. Наиболее крупная каллусная масса образовывалась на эпикотилиях сорта огурца ‘Ochiai 9’. Наилучшей средой для образования каллусной ткани свёклы

стала среда МС с добавлением 0,1 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л 6-БАП, для исследуемых сортов 'Гранатовый Шар', 'Цыганский Барон', 'Комбат', 'Санькина Любовь', гибрида 'Партнер F1', наилучший тип экспланта для каллусогенеза – фрагменты листовой пластинки.

Благодарности: часть результатов работы получена при поддержке проекта "Национальная сетевая коллекция генетических ресурсов растений для эффективного научно-технологического развития РФ в сфере генетических технологий".

Библиографический список

1. Банникова М.А. Регенерация растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) в культуре *in vitro*. Гистологическое изучение процессов регенерации / М.А. Банникова, А.Э. Головкин, О.А. Хведынич, Н.В. Кучук // Цитология и генетика. – 1995. – Т. 29. – №. 6. – С. 14 – 22.
2. Васильченко Е.Н. Воспроизведение *Beta vulgaris* L. в условиях *in vitro* / Е.Н. Васильченко., Е.О. Колесникова, Т.П. Жужжалова // Наука и образование: отечественный и зарубежный опыт – 2019. – С. 114 – 117.
3. Мишуткина Я.В. Изучение влияния состава питательной среды, типа экспланта и генотипа на частоту регенерации растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) *in vitro* / Мишуткина Я.В., Гапоненко А.К. // Генетика. – 2006. – №. 2. – С. 210-218.
4. Lashin I.I. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration of cucumber (*Cucumis sativus* L. Beith Alpha) / I.I. Lashin, D. Mamdouh // Nat. Sci. – 2014. – V. 12, Nb. 1. – pp.68 – 74.
5. Murashige T.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T.A. Murashige, F. Skoog // Plant Physiol. – 1962. – V. 15. – pp. 473 – 476.
6. Roussy I. In planta 2, 3, 5 truodobenzoic acid treatment promotes high frequency and routine *in vitro* regeneration of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants / Roussy I. // Plant cell reports. – 1996. – V. 16. – pp. 142–146.
7. Sultana H. Response of Different Explants for Callus Induction in *Cucumber* / H. Sultana et al. //European Journal of Biology and Biotechnology. – 2021. – Т. 2. – №. 5. – С. 71-75.
8. Usman M. Somatic embryogenesis and shoot regeneration induced in cucumber leaves / M. Usman, Z. Hussain, B. Fatima // Pak. J. Bot. – 2011. – V. 43, Nb. 2. – pp. 1283-1293.

ИЗУЧЕНИЕ И СОХРАНЕНИЕ РЕДКИХ И ЦЕННЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ МЕТОДАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ

Е.В. Малаева^{1,2}

¹ГБУ ВО «Волгоградский региональный ботанический сад», г. Волгоград, Россия,

e.malaeva@mail.ru

²ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный социально-педагогический университет»,
г. Волгоград, Россия

В статье представлена информация по совершенствованию технологии клонального микроразмножения и особенностях размножения *in vitro* редких и ценных видов растений. Работа по созданию коллекции *in vitro* Волгоградским региональным ботаническим садом ведется с 2005 года. Коллекция редких и ценных видов растений насчитывает более 100 наименований, в том числе редких видов, занесенных в Красную книгу РФ и Красную книгу Волгоградской области - 50 видов, относящихся к 19 семействам и разным эколого-фитоценотическим группам. В результате исследований проведена оптимизация условий культивирования редких и ценных видов растений на разных этапах клонального микроразмножения. Максимальный коэффициент размножения для редких видов $4,9 \pm 0,7$ зафиксирован на питательной среде, содержащей 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л и ИУК 0,01 мг/л. Наибольший коэффициент размножения актинидии (9,02) установлен при культивировании на среде, содержащей 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л и ИУК 0,05 мг/л. В результате проведенных исследований подобраны оптимальные условия для длительного сохранения растений-регенерантов. Растения *in vitro* хранятся в климатической камере SANYO MRL-351H на питательной среде $\frac{1}{2}$ МС дополненной 6-БАП 0,2 мг/л, сахарозой (20-30 мг/л), t (3-7°C) и освещенность (500–1200 лк).

Ключевые слова: клональное микроразмножение, коэффициент размножения, пролиферация, регуляторы роста, редкие и ценные растения.

Растения являются важнейшим мировым биологическим ресурсом. Их объем и численность популяции из года в год значительно изменяется. В результате, все больше число видов имеет статус, нуждающихся в охране, а проблема сохранения биологического разнообразия сегодня признана одной из ключевых. Традиционно работы по сохранению генофонда растительного мира ведут ботанические учреждения многих стран мира. Работа по формированию и изучению коллекции редких и ценных видов растений в ГБУ ВО «Волгоградский региональный ботанический сад» (далее ВРБС) ведется с 2005 года.

В настоящее время она насчитывает более 100 наименований, в том числе редких видов, занесенных в Красную книгу РФ и Красную книгу Волгоградской области - 50 видов, относящихся к 19 семействам и разным эколого-фитоценотическим группам. Данная коллекция в культуре *in vitro* является самой динамичной. Это связано со сложностью введения редких видов в культуру и с неустойчивостью многих из них, поэтому состав коллекции постоянно меняется.

В настоящее время возникает потребность в выращивании культур, которые содержат в большом количестве витамины и биологически активные вещества. К таким культурам по праву можно отнести коллекцию видов, сортообразцов и дикорастущих форм актинидии. Коллекция данной культуры *in vitro* представлена 36 наименованиями.

Актинидия – дальневосточный эндем, который является ценным источником витаминов, кахетинов, пектинов, дубильных и красящих веществ, флавоноидов, алкалоидов и множества других соединений. Кроме того, актинидия – ценная культура и с экологической точки зрения.

Она отличается высокой устойчивостью к болезням и вредителям, что позволяет ее выращивать без применения высоких доз инсектицидов и фунгицидов [3]. Из 40 видов актинидии наибольшее распространение в России получили растения самых зимостойких видов *Actinidia kolomikta* (Rupr. Et Maxim.) Maxim., *A. arguta* Planch., и *A. polygama* (Sieb. Et Zucc.) Maxim.

В качестве эксплантов использовали апикальные и латеральные меристемы, сегменты стерильных проростков, выращенных из семян, для актинидии – одноглазковые черенки и меристематические участки апикальных и латеральных почек. Методика исследований основана на общепринятых классических методах работы *in vitro* [1] и приемах, оптимизированных в условиях лаборатории биотехнологии ВРБС [8].

В условиях *in vitro* растения культивировали в чашках Петри и биологических пробирках при освещении с интенсивностью 3-5 клк, при 16-часовом фотопериоде, температуре 24⁰С и относительной влажности воздуха 70%.

Все опыты проводили трижды, повторность в каждом варианте 10-кратная. Поверхностная стерилизация осуществлялась 95% этиловым спиртом в течение 50-60 секунд, затем 5 % раствором Лизоформина 3000, при этом время экспозиции составляло 5 и 7 минут. Оптимальный режим стерилизации определяли по жизнеспособности первичных эксплантов и наличию инфекции.

На этапе микроразмножения использовали минеральную основу питательной среды Мурасига Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962), Уайта (White, 1943) или ½ питательной среды Мурасига Скуга (½МС) [2]. В качестве цитокининов использовали: 6-бензиламинопурин (6-БАП) в концентрации 0,1-4,0 мг/л, цитодеф (ЦФ) 0,1-1,0 мг/л, кинетин (К) 0,5-1,0 мг/л, тидиазурон (TDZ) 0,1-1,0 мг/л, 2-изопентиладенин (2-иР) 0,5-1,0 мг/л, зеатин (Z) 3,0-5,0 мг/л, в том числе дополненные β-индолилуксусной кислотой (ИУК) в концентрации от 0,01-0,5 мг/л.

При этом отмечали следующие показатели: коэффициент размножения (Кр), побегов/эксплант, среднее число побегов, шт, среднюю длину побега, см и количество аномальных (витрифицированных) растений, %. Результаты экспериментальных данных обрабатывались статистически с помощью компьютерной программы Excel лицензионного пакета Microsoft Office 2007. Полученные данные достоверны при $p < 0,05$.

Среди факторов, оказывающих наибольшее влияние на морфогенетические процессы в культуре тканей и органов, в первую очередь необходимо выделить таксономическую принадлежность, генетические особенности растений-регенерантов, физиологическое состояние маточных растений, инициального экспланта, состав питательной среды, условия культивирования [5-7]. Один из путей повышения коэффициента размножения *in vitro* является использование препаратов с высокой цитокининовой активностью.

Перспективными регуляторами роста являются TDZ (тидиазурон), 2iP (2-изопентиладенин), Z (зеатин) и К (кинетин). Эффект TDZ (тидиазурина) был изучен на актинидии и других культурах [4, 9]. На этапе размножения, микрочеренки редких видов помещались на питательную среду МС с добавлением 6-БАП, ЦФ и TDZ в концентрации 0,1-1,0 мг/л. При этом отмечали и рассчитывали коэффициент размножения (Кр) (побегов/эксплант) и количество аномальных (витрифицированных) растений (%) (табл. 1).

В процессе исследований для *Hedysarum grandiflorum* и *H. cretaceum* наибольший Кр наблюдали на питательной среде, содержащей 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л и 1,0 мг/л - (3,0±0,3) и (4,6±0,8) соответственно. При концентрации 6-БАП 0,1 мг/л Кр значительно меньше - 2,5±0,4, но все растения нормальной морфологии. Увеличение концентрации 6-БАП значительно увеличивает Кр, но в тоже время увеличивается процент аномальных побегов, достигая 50% при концентрации 6-БАП 1,0 мг/л.

При использовании ЦФ в концентрации 0,1-1,0 мг/л Кр не превысил 2,9±0,7. В то же время во всех вариантах не наблюдали витрификации, побеги были нормальной морфологии. Таким образом, использование цитокинина ЦФ на этапе микроразмножения вполне эффективно.

Таблица 1

Влияние типа и концентрации цитокинина на коэффициент размножения и развитие микрочеренков *Hedysarum grandiflorum* Pall. и *H. cretaceum* Fisch.

Цитокинин	Концентрация, мг/л	Коэффициент размножения, побегов/эксплант	Аномальных (витрифицированных) растений, %	Коэффициент размножения, побегов/эксплант	Аномальных (витрифицированных) растений, %
		<i>H. cretaceum</i>		<i>H. grandiflorum</i>	
Контроль б/г	-	1,2 ± 0,3	0	1,2 ± 0,5	0
6-БАП	0,1	2,5±0,4	5	1,2±0,2	0
	0,5	3,0±0,3	10	3,8±0,5	10
	1,0	4,6±0,8	50	2,2±0,3	30
ЦФ	0,1	2,0±0,2	0	2,0±0,4	0
	0,5	2,9±0,7	0	2,5±0,5	0
	1,0	2,8±0,2	0	2,5±0,4	0
TDZ	0,1	10±1,1	10	5,1±1,0	60
	0,5	12±1,3	20	4,2±0,9	90
	1,0	22±0,8	50	8,3±1,1	100

Для представителей рода *Actinidia* Lindl. установлено что все исследованные фитогормоны (за исключением кинетина) в целом обеспечивали увеличение коэффициента размножения (рис. 1).

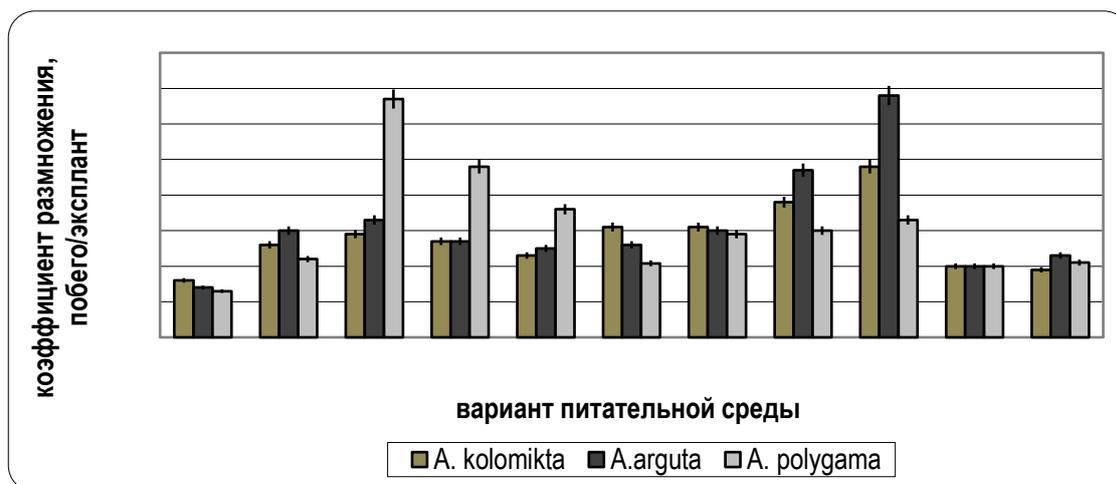


Рис. 1. Влияние регуляторов роста на коэффициент размножения некоторых представителей рода *Actinidia*.

Условные обозначения: 1. контроль, без гормонов. 2. Z (зетин) 3,0 мг/л. 3. Z (зетин) 5,0 мг/л. 4. 6-БАП (6-бензиламинопурин) 0,5 мг/л. 5. 6-БАП (6-бензиламинопурин) 1,0 мг/л. 6. TDZ (тидиазурон) 0,5 мг/л. 7. TDZ (тидиазурон) 1,0 мг/л. 8. 2iP (2-изопентиладенин) 0,5 мг/л. 9. 2iP (2-изопентиладенин) 1,0 мг/л. 10. К (кинетин) 0,5 мг/л. 11. К (кинетин) 1,0 мг/л.

Сравнительный анализ изучения влияния различных цитокининов показал, что при использовании 2iP коэффициент размножения *A. kolomikta* и *A. arguta*, существенно превышали значение этих показателей на средах с 6-БАП. Коэффициент размножения варьировал от 3,1±0,4 до 4,8±0,7 для *A. kolomikta* и от 4,7±0,9 до 6,8±0,3 - для *A. arguta*. Для *A. polygama* отмечены максимальные показатели коэффициента размножения на среде, содержащей Z (5 мг/л) и 6-БАП (0,5 мг/л). Показатели варьировали от 3,9±0,5 до 6,7±0,4. Для всех исследуемых видов не отмечено положительного эффекта при использовании тидиазурана. На среде содержащей тидиазурон наблюдалось развитие аномальных листьев и сильно укороченных побегов, а использованием концентрации 1,0 мг/л приводило к витрификации микрочеренков.

Содержание в среде зеатина увеличивало коэффициент размножения у всех исследуемых образцов актинидии, одновременно стимулируя образование каллуса, что в последствии незначительно затрудняло адаптацию растений - регенерантов *in vivo*. По данным некоторых авторов и наш опыт культивирования показал наличие положительного эффекта при совместном использовании 6-БАП и ИУК для многих культур [10].

Так для редких видов растений, максимальный коэффициент размножения на средах, содержащих только 6-БАП, составил $4,6 \pm 0,8$ (концентрация 6-БАП – 1,0 мг/л), при совместном использовании 6-БАП и ИУК максимальный коэффициент размножения составил $10,2 \pm 0,5$, но при этих концентрациях процент витрифицированных растений достигал 50%. Таким образом, оптимальным соотношением 6-БАП и ИУК для редких видов является 0,1:0,01 и 0,5:0,05 (мг/л). При этом наблюдали увеличение коэффициента размножения по сравнению со средами, содержащими только 6-БАП с $2,5 \pm 0,4$ до $3,5 \pm 1,2$ и $3,0 \pm 0,3$ до $4,9 \pm 0,7$ соответственно (табл. 2).

Таблица 2.

Влияние состава питательной среды на коэффициент размножения *Astragalus dasyanthus* Pall.

Вариант питательной среды		Коэффициент размножения, побегов/эксплант	Витрифицированных растений, %
6-БАП мг/л	ИУК мг/л		
0	0	$1,1 \pm 0,1$	0
0,1	0,01	$3,5 \pm 1,2$	0
0,5	0,05	$4,9 \pm 0,7$	0
1,0	0,1	$5,3 \pm 0,8$	10
1,5	0,3	$7,0 \pm 1,1$	30
2,0	0,5	$10,2 \pm 0,5$	50

В результате проведенных экспериментов для актинидии установлена эффективность совместного использования цитокининов и ауксинов (табл. 3).

Таблица 3

Влияние состава питательной среды на морфометрические показатели представителей рода *Actinidia*

Вариант питательной среды		Среднее число побегов, шт	Средняя длина побегов, см	Коэффициент размножения
6-БАП мг/л	ИУК мг/л			
0,5	0,05	1,63	3,12*	9,02*
1,0	0,05	1,60	1,95	7,31
2,0	0,05	1,51	2,04	6,40
4,0	0,05	1,26*	1,69	5,34*
НСР _{0.05}		0,54	4,33	1,59

Так под действием 0,5 мг/л 6-БАП и 0,05 мг/л ИУК длина развивающихся побегов (3,12 см), а также среднее число междоузлий на побег (потенциальный коэффициент размножения) существенно превышали значения этих показателей, полученных при более высоких концентрациях 6-БАП. Дальнейшее увеличение концентрации этого гормона приводило к появлению аномальных побегов. Важно отметить, что число побегов на один эксплант также уменьшается при увеличении концентрации 6-БАП с 1,63 шт. на среде при 0,5 мг/л БАП до 1,26 на среде с содержанием 4,0 мг/л 6-БАП (табл. 3).

Максимальный коэффициент размножения актинидии (9,02) установлен при культивировании на среде, содержащей 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л и ИУК 0,05 мг/л. Важным показателем при культивировании редких и ценных видов растений является количество субкультивирований. Установлено, что коэффициент размножения растений-регенерантов актинидии существенно менялся в процессе культивирования. Отмечена общая для всех изучаемых видов тенденция: на первых пассажах коэффициент размножения

постепенно возрастал, достигая наибольших значений на 5-7 пассаже, снова снижаясь на 8-10 пассажах. Максимальный коэффициент размножения *A. polygama* - на 5 пассаже, а для *A. kolomikta* и *A. arguta* отмечен на 7 субкультивировании.

Для редких видов темпы развития эксплантов в зависимости от количества субкультивирований существенно отличались. Так, если для *Lepidium meyeri* Claus и *Mathiola fragrans* Bunge (представителей семейства *Brassicaceae*) максимальные значения коэффициента размножения ($12 \pm 0,7$ и $10,5 \pm 0,3$) были зафиксированы на этапе введения в культуру и при первых субкультивированиях, а для представителей семейства *Fabaceae* (*Hedysarum grandiflorum*, *Hedysarum cretaceum*, *Astragalus dasyanthus*) характерна другая закономерность. Максимальный коэффициент размножения ($4,8 \pm 0,5$) наблюдали на 4-5 пассаже.

Наш опыт по укоренению редких видов растений показал, что при использовании полной минеральной основы МС требуются более высокие концентрации ауксинов – от 1,0 мг/л. Использование обедненных питательных сред – Уайта, $\frac{1}{2}$ МС позволяют снизить концентрацию ауксинов – от 0,5 до 1,0 мг/л. В результате проведенных исследований по сокращению беспересадочного периода редких видов растений подобраны оптимальные условия для длительного сохранения растений-регенерантов. Основная часть коллекции растений *in vitro* хранится в климатической камере (SANYO MRL-351H) на питательной среде $\frac{1}{2}$ МС дополненной 6-БАП 0,2 мг/л, сахара (20-30 мг/л), t (3-7°C) и освещенность (500-1200 лк).

Подобраны оптимальные среды для микроразмножения редких и ценных видов растений. На средах с концентрацией 6-БАП от 0,1 до 0,5 мг/л у 90 – 100% растений отмечено отсутствие аномальных побегов и стимуляция развития пазушных почек с образованием 4 – 12 пазушных побегов на одно растение. Установлено увеличение коэффициента размножения при совместном использовании 6-БАП и ИУК. Оптимальное соотношение 6-БАП и ИУК для редких видов является 0,1:0,01 и 0,5:0,05 (мг/л). Из испытанных индукторов ризогенеза наиболее эффективным оказалась ИУК в концентрации 0,5 мг/л и 1,0 мг/л.

Библиографический список

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. учеб. пособие – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160с.
2. Калинин Ф. Л., Кушнир Г. П., Сарнацкая В. В. Технология микрклонального размножения растений. Киев: Наукова думка, 1992. – 488 с.
3. Колбасина Э.И. Актинидии и лимонник в России. М., 2000. – 264с.
4. Крахмалева И.Л., Молканова О.И., Малаева Е.В. Использование клонального микроразмножения для разных форм перспективных сортов *Actinidia kolomikta* (Rupr. et Maxim) Maxim // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада, 2019. – Вып. 133. – С. 80-86.
5. Малаева Е. В. Сохранение редких видов растений в коллекции *in vitro* Волгоградского регионального ботанического сада // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: Материалы XVIII Междунар. науч.-практ. конф. - Барнаул, 2019. – С. 606 – 610. DOI: 10.14258/pbssm.2019127
6. Молканова О.И. Использование биотехнологических методов для размножения и сохранения редких видов растений // Бюл. ГБС, 2017. – №1(203). – С. 42-48.
7. Молканова О.И., Горбунов Ю.Н., Ширнина И.В., Егорова Д.А. Применение биотехнологических методов для сохранения генофонда редких видов растений // Бот. журн., 2020. – Т. 105. - №6. – С.610-619.
8. Самарская В.О., Малаева Е.В., Постнова М.В. Аспекты клонального микроразмножения и сохранения растений *in vitro* // Природные системы и ресурсы, 2019. – Т.9. – №3. – С.13-22.
9. Семенова Д. А., Крахмалева И. Л., Мишанова Е. В., Молканова О. И., Митрофанова И. В. Особенности регенерации перспективных сортов *Actinidia arguta* в культуре *in vitro* // Таврический вестник аграрной науки, 2023. – № 1(32). – С. 93–103. DOI: 10.5281/zenodo.7898485. EDN: ESJQQT
10. Malaeva E. V., Molkanova O. I. Regeneration peculiarities of *in vitro* berry cultures // Acta Horticulturae, 2021. – Vol. 1324. – P. 89-94. DOI: 10.17660/ActaHortic.2021.1324.13

УДК 635.9:57

ДЛИТЕЛЬНОЕ СОХРАНЕНИЕ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* *OSMUNDA REGALIS* L. И ОЦЕНКА ЕЁ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ SCOT-МАРКЕРОВ

В.И. Маляровская, Р.М. Шхалахова

Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр Российской академии наук», Сочи, Россия

Osmunda regalis L. вид, который внесён в Красную книгу РФ и имеет категорию «Находящийся под угрозой исчезновения». На территории Сочинского национального парка в настоящее время сохраняется около 30 растений этого вида. Катастрофическое падение численности данного вида в местах произрастания, поставило его под угрозу полного исчезновения на территории Сочинского Причерноморья. Проблема размножения папоротника усугубляется тем, что споры длительное время не прорастают в почве во влажных условиях и быстро теряют жизнеспособность. Поэтому в ФИЦ СЦ РАН проводятся работы по сохранению и размножению *O. regalis* методами биотехнологии в условиях культуры *in vitro*. **Целью наших исследований** являлось изучение физических факторов депонирования в условиях *in vitro* и подбор информативных SCOT-праймеров для оценки генетической стабильности *Osmunda regalis* L.. Объект исследований – гаметофиты *O. regalis*. Показано, влияние температуры (13 °C, 21 °C, 23°C) и освещенности (800 лк, 1000 лк и 3500 лк) на морфометрические показатели и процент жизнеспособности гаметофитов при длительном культивировании (250 сут) в условиях *in vitro*. Установлено, что при понижении температуры (13 °C) и освещенности (800-1000 лк) уменьшались морфометрические показатели и процент жизнеспособности гаметофитов (41,5-43,6 %). Выявлено, что для длительного культивирования *O. regalis* оптимальными условиями являются температура 21 °C и освещенность 800-1000 лк, при которых жизнеспособность гаметофитов соответствовала 73,5-78,2 %. Для оценки генетической стабильности образцов из культуры *in vitro* апробировано 36 SCOT-праймеров, среди которых восемь (SCoT1, SCoT2, SCoT9, SCoT10, SCoT21, SCoT22, SCoT24, SCoT34) показали низкий уровень амплификации. Установлено, что наибольшее количество бэндов генерировали два маркера: SCoT19 и SCoT29. Вместе с тем, эффективность показали еще 9 SCoT-маркеров (SCoT3, SCoT8, SCoT13, SCoT14, SCoT15, SCoT16, SCoT18, SCoT20, SCoT32), которые могут быть использованы при оценке внутривидового разнообразия *O. regalis*. Анализ полученных данных выявил генетическую стабильность между длительно (5 лет) культивируемыми гаметофитами *O. regalis* L. в коллекции генобанка *in vitro* и маточными растениями, произрастающими в ботаническом саду «Дерево Дружбы» ФИЦ СЦ РАН.

Ключевые слова: *Osmunda regalis* L., гаметофиты, исчезающий вид, условия *in vitro* депонирование, SCOT-маркеры, питательная среда, регуляторы роста, спорофиты

Сохранение видов растений в условиях замедленного роста в культуре *in vitro* определяется в большей степени их биологическими особенностями. При этом сохранение жизнеспособности растений основная цель при создании медленно растущих коллекций. Замедления роста можно достичь за счет различных факторов, физических условий культивирования, модификации питательных сред и т.д. Среди модификаций питательных сред можно рекомендовать разбавление их минеральной основы, изменение концентраций или комбинаций регуляторов роста, применение осмотиков, ингибиторов роста и т.д. Нами в ФИЦ СЦ РАН ранее были проведены исследования по депонированию исчезающих, редких видов природной флоры Западного Кавказа *Campanula sclerophylla* (Kolak.) Czer., *Lilium martagon* subsp. *causicum* Misch. ex Grossh. [1, 2]. Эти исследования включали оценку ряда показателей: влияние применения осмотиков (сорбит, маннит), ингибитора роста – абсцизовую кислоту и различные режимы температуры и освещенности на замедление роста и развития растений в условиях *in*

in vitro [1, 7]. Среди физических факторов наиболее часто применяют снижение температуры, в комбинации с уменьшением интенсивности освещения.

Депонирование в условиях *in vitro* гермоплазмы является частью консервации генетических ресурсов *ex situ* и, как известно, обладает рядом преимуществ. Вместе с тем при долговременном субкультивировании в течение нескольких лет необходима оценка генетической стабильности растений сохраняемых в генобанке *in vitro* [3].

Цель настоящих исследований – изучение физических факторов депонирования и подбор информативных SCOT-праймеров для оценки генетической стабильности *Osmunda regalis* L..

Объекты и методы исследований. Объектом исследований служили гаметофиты *Osmunda regalis*. Эксперимент заложен на среде ¼ МС (без NH₄NO₃ и витаминов). Варианты опыта: температура воздуха 13 °С, освещённость 800 и 1 000 лк; температура воздуха 21 °С, освещённость 800 и 1 000 лк; контроль - освещённость 3500 лк, температура воздуха 23±1 °С. Состояние гаметофитов оценивали через 250 суток культивирования с помощью морфометрических показателей (длины и количества гаметофитов) и их жизнеспособности (%). Гаметофиты культивировали при фотопериоде 16/8 часов и влажности 70 %. Для статистической обработки полученных результатов использовали программное приложение Statistica 6.0.

Растительный материал и экстракция ДНК. В данной работе в качестве образцов были отобраны маточные растения *Osmunda regalis* L., произрастающее на территории сада-музея «Дерево Дружбы» г. Сочи, и растения из медленнорастущей коллекции *in vitro*, находящиеся в культуре в течении 5 лет в отделе биотехнологии ФИЦ СНЦ РАН. ДНК выделяли из листьев согласно протоколу СТАВ [6] Качество выделенной ДНК проверяли в 1% агарозном геле и спектрофотометрическим методом. Все образцы разбавляли до рабочей концентрации 200 ng/μL

Генетический анализ. В работе использованы 36 SCoT-праймера, первоначально разработанные для *Oryza sativa* [5]. Реакционная смесь для ПЦР SCoT состояла из 10 мкл 2х реакционного буфера HS-TaqPCR (Biolabmix, Новосибирск, Россия), содержащего Hot Start Taq-полимеразу, 0,4 мкл праймера (10 мкМ), 2 мкл ДНК (200 нг мкл⁻¹) и обработанная DEPC вода в общем объеме ПЦР 20 мкл. Амплификацию проводили в термоциклере MiniAmp (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США) по следующей программе: первичная денатурация 5 мин при 95 °С, отжиг 35 циклов денатурация при 95 °С в течение 1 мин, отжиг при 52 °С в течение 1 мин, элонгация при 72 °С в течение 2 минут и финальная элонгация при 72 °С в течение 5 минут. Разделение SCoT-фрагментов проводили в 2 % агарозном геле в течение 2,5 часов при 90 В в 1 × TAE буфере.

Статистическая обработка. Параметры генетического разнообразия: общее количество бэндов; количество полиморфных бэндов (P = полиморфизм (%)) рассчитаны с использованием программы IMES (<https://irscope.shinyapps.io/iMES/>).

Результаты и обсуждение.

В результате исследований установлено, что условия депонирования (температура и освещённость) в течение 250 суток культивирования, влияли на биометрические показатели и жизнеспособность гаметофитов *O. regalis* (табл. 1). Так, показатели количества и длины гаметофитов варьировали от 6,1 до 17,3 шт./экспл. и от 0,5 до 1,3 см, соответственно. При этом наименьшие морфометрические показатели получены у гаметофитов в условиях пониженных температуры и освещённости, и процент их жизнеспособности в этих условиях культивирования также был низок.

Наибольшие морфометрические показатели отмечены в контроле, однако процент жизнеспособных гаметофитов также был невысок – 48,3 %. Вместе с тем, установлено, что оптимальными условиями для длительного культивирования гаметофитов *O. regalis* является температура воздуха 21 °С и освещённость 800-1000 лк, при которых жизнеспособность гаметофитов составляет 73,5 и 78,2%, соответственно.

Таблица 1.

Влияние температуры и освещенности на морфометрические показатели и жизнеспособность гаметофитов

Температура культивирования, °С (освещённость, лк)	Количество гаметофитов, шт./экспл.	Длина гаметофитов, см	Жизнеспособных гаметофитов, %
Контроль, освещённость 3500 лк, температура воздуха 23±1 °С	17,3±3,2	1,3±0,2	48,3
Температура воздуха 13±1 °С, освещённость 800 лк	6,1±1,1	0,5±0,1	41,5
Температура воздуха 13±1 °С, освещённость 1 000 лк	6,4±1,3	0,7±0,2	43,6
Температура воздуха 21±1 °С, освещённость 800 лк	8,7±2,1	0,9±0,1	73,5
Температура воздуха 21±1 °С, освещённость 1 000 лк	9,1±1,9	1,1±0,1	78,2

Для оценки генетической стабильности гаметофитов и спорофитов *O. regalis* апробировано 36 SCoT-праймеров. Установлено, что восемь (SCoT1, SCoT2, SCoT9, SCoT10, SCoT21, SCoT22, SCoT24, SCoT34) из них показали низкий уровень амплификации в образцах. Наибольшее количество бэндов генерировали два маркера: SCoT19 и SCoT29 (рис. 1).

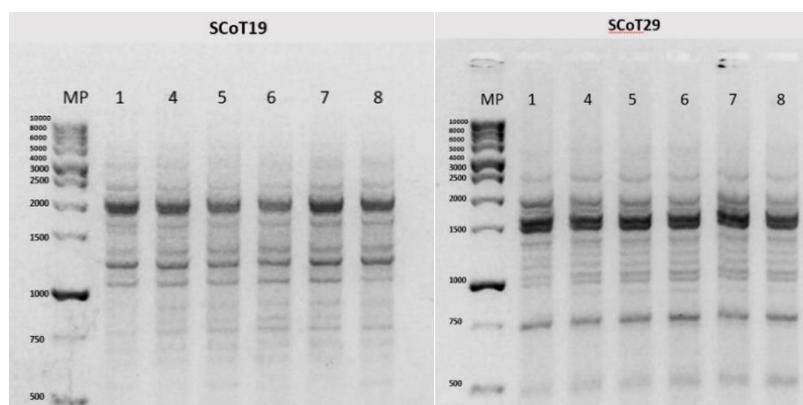


Рисунок 1. Электрофоретические спектры маркеров SCoT19 и SCoT29

Всего было генерировано 212 ампликонов, в диапазоне от 3 (SCoT26) до 13 (SCoT29), в среднем 7,5 бэнда на праймер. При этом, размер амплифицированных продуктов варьировал от 0,35 (SCoT13) до 4,1 т.п.н. (SCoT3) (рис. 2, 3).

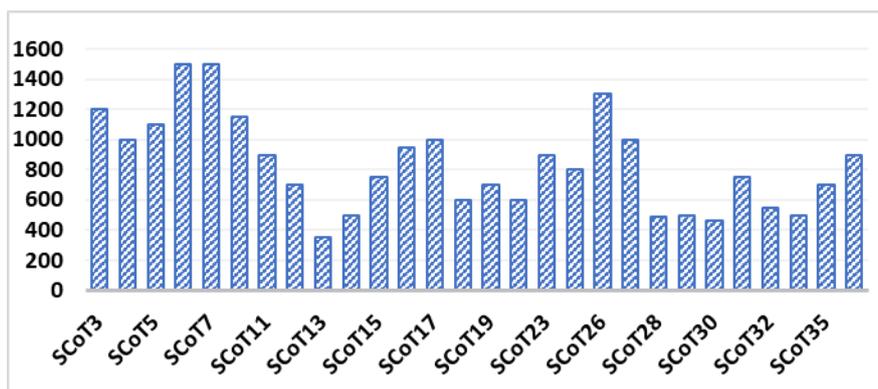


Рисунок 2. Минимальный размер бэндов, п.н.

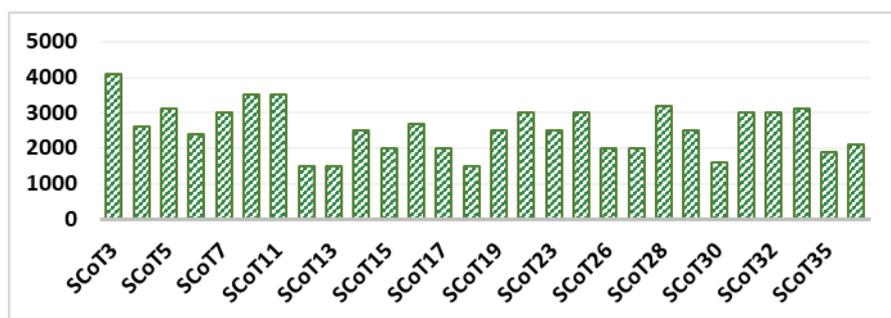


Рисунок 3. Максимальный размер бэндов, п. н.

Все маркеры были распределены на два кластера. В первый кластер вошли девять SCoT-маркеров, которые выявили низкий уровень полиморфизма среди образцов. Процент полиморфизма варьировал от 10 % до 33,3 %. При этом наибольшее значение показал маркер SCoT35, наименьшее SCoT8B. Во второй кластер вошли SCoT-праймеры, которые не выявили полиморфизм у *Osmunda regalis* L.

Известно, что SCoT-маркеры эффективны при изучении внутривидового генетического разнообразия ряда других видов растений, и выявляют высокий уровень полиморфизма, в пределах от 50 до 75 % [4. 8-10]. В нашей работе, апробированные на *Osmunda regalis* L. SCoT-маркеры, в целом, показали низкий уровень полиморфизма и не выявили значительных генетических различий между маточными растениями и регенерантами, что может свидетельствовать о генетической стабильности *Osmunda regalis* L. в коллекции генобанка *in vitro*. Аналогичные результаты нами с соавторами получены на видах природной флоры с другими праймерами [3, 4].

Заключение. Таким образом, нами выявлено, что для длительного культивирования *O. regalis* оптимальными условиями являются температура 21 °C и освещенность 800-1000 лк, при которых жизнеспособность гаметофитов была максимальна: 73,5-78,2 %.

В результате апробации 36 SCoT-праймеров выделено среди них 11 SCoT-маркеров (SCoT3, SCoT8, SCoT13, SCoT14, SCoT15, SCoT16, SCoT18, SCoT19, SCoT20, SCoT29, SCoT32), которые показали большее количество ампликонов и могут быть использованы при оценке внутривидового разнообразия *O. regalis*. Анализ полученных данных выявил генетическую стабильность эксплантов *Osmunda regalis* L. в коллекции *in vitro*.

Благодарности. Публикация подготовлена в рамках реализации ГЗ ФИЦ СИЦ РАН FGRW-2024-0003, регистрационный номер № госрегистрации 124022000093-1 и FGRW-2024-0005 регистрационный номер 1022040700995-7-1.6.4

Библиографический список

1. Маляровская В.И., Шуркина Е.С. Влияние факторов культивирования на длительность депонирования *in vitro* эндемичного вида *Campanula sclerophylla* Kolak //Субтропическое и декоративное садоводство. 2022. – № 81. – С. 98-106. DOI: 10.31360/2225-3068-2022-81-98-106
2. Методика клонального микроразмножения и сохранения видов природной флоры и красивоцветущих кустарников в условиях *in vitro*/Маляровская В.И., Коломиец Т.М., Самарина Л.С. Сочи, 2020. 28 с.
3. Супрун И.И., Маляровская В.И., Степанов И.В., Самарина Л.С. IRAP-анализ для оценки генетической стабильности эндемичных и исчезающих видов флоры. Западного Кавказа в коллекции *in vitro*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(1):8-14. DOI 10.18699/VJ19.455
4. Шхалахова Р.М., Маляровская В.И., Конинская Н.Г. Эффективность SCOT-маркеров для характеристики внутривидового генетического разнообразия *Cyclamen coum*, *Helleborus caucasicus*, *Galanthus woronowii*, *Paeonia caucasicus*//Turczaninowia. 2023. Т. 26. № 2. С. 45-58. DOI: 10.14258/turczaninowia.26.2.3

5. Collard B.C.Y.; Mackill D.J. Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2009, 27, 86–93, doi:10.1007/s11105-008-0060-5. <https://irscope.shinyapps.io/iMEC/>
6. Doyle J.J. Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus*. 1990. T. 12. C. 13-15.
7. Kolomiets T.M., Malyarovskaya V.I., Samarina L.S. *In vitro* conservation of *Campanula sclerophylla* Kolak. - endemic endangered species of Western Caucasus // *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 2016. – № 26 (2). – P. 143-149, DOI: 10.3329/ptcb.v26i2.30564
8. Luo C., He X.-H., Chen H., Hu Y. and Ou S.-J. Genetic relationship and diversity of *Mangifera indica* L., revealed through SCoT analysis. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2012. 59, 1505–1515.
9. Nath V. S., Hegde V. M., Jeeva M. L., Misra R. S., Veena S. S., Raj M. et al. Genetic diversity of *Phytophthora colocasiae* causing taro leaf blight, analysis using start codon targeted (SCoT) polymorphism. *J. Root Crops* 2015.39, 168–177.
10. Wu J.-M., Li Y.-R., Yang L.-T., Fang F.-X., Song H.-z., Tang H.- Q. et al. cDNA-Scot, a novel rapid method for analysis of gene differential expression in sugarcane and other plants. *Aust. J. Crop Sci.* 2013. 7, 659

УДК 635.33:581.33:581.4

ФАКТОРЫ ЭФФЕКТИВНОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА ГЕНОТИПОВ РОДА *BRASSICA* В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР *IN VITRO*

А.И. Минейкина

ФГБНУ ФНЦО, Одинцово, Россия

Технология получения удвоенных гаплоидов (DH) стала мощным инструментом фундаментальных и прикладных исследований растений. Основным и рутинным использованием DH-технологии является производство чистых линий в селекционном процессе для получения гибридов. Успешность применения таких биотехнологических подходов заключается в высоком уровне эффективности протоколов культуры клеток и тканей растений *in vitro*. Для технологии культуры изолированных микроспор *in vitro* основополагающими являются процессы индукции эмбриогенеза и регенерации растений из эмбриоидов. В результате работы нами были изучены и модифицированы основные факторы, влияющие на эти процессы, для повышения выхода эмбриоидов у изученных генотипов растений рода *Brassica*.

Ключевые слова: DH-технология, удвоенные гаплоиды, культура микроспор *in vitro*, капустные культуры, андрогенез, индукция эмбриогенеза, факторы эмбриогенеза.

Введение. Ускоренное создание новых и совершенствование существующих сортов и гибридов сельскохозяйственных растений является одним из стратегических направлений научной деятельности в области продовольственной безопасности государства. Культура изолированных микроспор *in vitro* является одной из передовых технологий, которая позволяет ускорить селекционный процесс за счет быстрого получения гомозиготных линий – удвоенных гаплоидов [6,8]. Первые успешные исследования в культуре микроспор капустных культур были проведены в начале 1980-х годов [9]. Затем был разработан базовый протокол культуры микроспор рапса, который служит основой DH технологии для растений рода *Brassica* [13]. Затем данный протокол с небольшими модификациями стали использовать для получения удвоенных гаплоидов у других растений рода *Brassica*: капусты белокочанной, краснокочанной, цветной, португальской, листовой, брокколи, кольраби и капусты китайской [7,17,15,16,11,18].

В мировой практике было реализовано множество стратегий для повышения эффективности технологии получения удвоенных гаплоидов у капустных культур. Такие факторы, как условия выращивания донорных растений, генотип, стадия развития микроспор [10,3,5], тип предобработки бутонов и микроспор [14], состав питательных сред, условия культивирования [8] являются объектами постоянных исследований и модификаций. Среди многих факторов, обуславливающих эффективную индукцию микроспор, одним из важнейших являются стрессовые условия. Такие факторы способствуют перепрограммированию развития микроспор с гаметофитного на спорофитное с образованием эмбриоидов [2]. Однако точные механизмы действия таких факторов не установлены.

Как видно из результатов ранних исследований, успешность применения биотехнологических методов требует эффективного и надежного протокола. Поскольку многие авторы отмечают высокую генотипическую специфичность, такой протокол необходимо адаптировать под определенный вид, сорт, генотип.

Материалы и методы. В работе использовали генотипы растений рода *Brassica* лаборатории селекции и семеноводства капустных культур ФГБНУ ФНЦО. Донорные растения выращивали в полевых условиях. Яровизацию проводили при температуре 6-10°C в течение 2 месяцев. Для получения цветоноса растения переносили в камеры искусственного климата с использованием натриевых ламп высокого давления 6000 лк со световым режимом 16 ч. - день/ 8 ч. – ночь при температуре 19°C. Бутоны были отобраны вначале цветения донорных растений. Отбор бутонов, определение стадии развития микроспор и их изолирование проводили с использованием методики культивирования микроспор семейства *Brassicaceae*, разработанной ранее в лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНЦО с небольшими модификациями [1].

Для культивирования использовали жидкую питательную среду NLN-13 с 13%-ной сахарозой с рН 5,8-6,4 [9]. Шоковую температурную обработку проводили при 32°C в темноте с различной временной экспозицией от 1 до 3 суток. Далее микроспоры культивировали при 25°C непрерывно в темноте в термостате с платформой-шейкер до образования эмбриоидов. По мере достижения эмбриоидов семядольной стадии развития их переносила в культуральные сосуды с твердой питательной средой MS [12] с 2%, сахарозой, 0,7% агаром, рН 5,8. Для повышения регенерационной способности в среду добавляли 1 мг/л БАП и 0,1 мг/л ГК. Культивирование проводили на стеллажах при смешанном освещении двух типов люминесцентных ламп: OSRAM Fluora L36W/77 (преимущественно синего и красного спектра) и Philips 36W/54-765 (преимущественно белого спектра), при суммарной освещенности 3000 люкс при 16 ч днем/8 ч ночью и 24 ± 2 °С. Укорененные побеги с 5–6 листьями высаживали в горшки объемом 1 л со смесью торфа и перлита (7:3) и накрывали пластиковыми стаканчиками с перфорацией на 10 суток, чтобы дать возможность устьицам адаптироваться к пониженной влажности. Горшки помещали в камеру выращивания при 21°C, фотопериоде 16 часов – день/8 часов – ночь и освещенности 6000 лк. Статистический анализ произведен с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel.

Результаты

1. Стадия развития микроспор

Для капустных культур стадия развития микроспор является решающим фактором успешного эмбриогенеза. Микроспоры на поздней одноядерной стадии и ранняя двухклеточная пыльца под воздействием стрессовых факторов способны переключать гаметофитный путь развития на спорофитный с образованием гаплоидных эмбриоидов (Рис. 1). Ввиду морфологических различий строения и размеров бутонов у различных видов капустных культур, соответственно, и стадии развития микроспор в бутонах одной длины будут различны. У капусты белокочанной отмечены наибольшие размеры бутонов, содержащие компетентные к эмбриогенезу микроспоры. Преимущественно из бутонов длиной 4,5-5,5 мм было получено наибольшее количество эмбриоидов. Для *B. rapa*, *B. napus* и *B. juncea* параметры длины бутона существенно меньше (Рис.2).

2. Температурная обработка микроспор

Инкубация микроспор при 25°C не способствовала инициации развития микроспор по спорофитному пути. Только применение кратковременного температурного шока при 32°C позволило достичь выхода эмбриоидов. Предварительная холодовая температурная обработка бутонов в течение 1 суток положительно влияла на повышение индукционного ответа во всех отзывчивых генотипах. Существенное влияние на количество эмбриоидов оказала временная экспозиция высокотемпературной обработки. Для *B. oleracea* и *B. rapa* при продолжительности температурного шока в течение 24-48 ч отмечен наибольший выход эмбриоидов (Табл.1).

Таблица 1

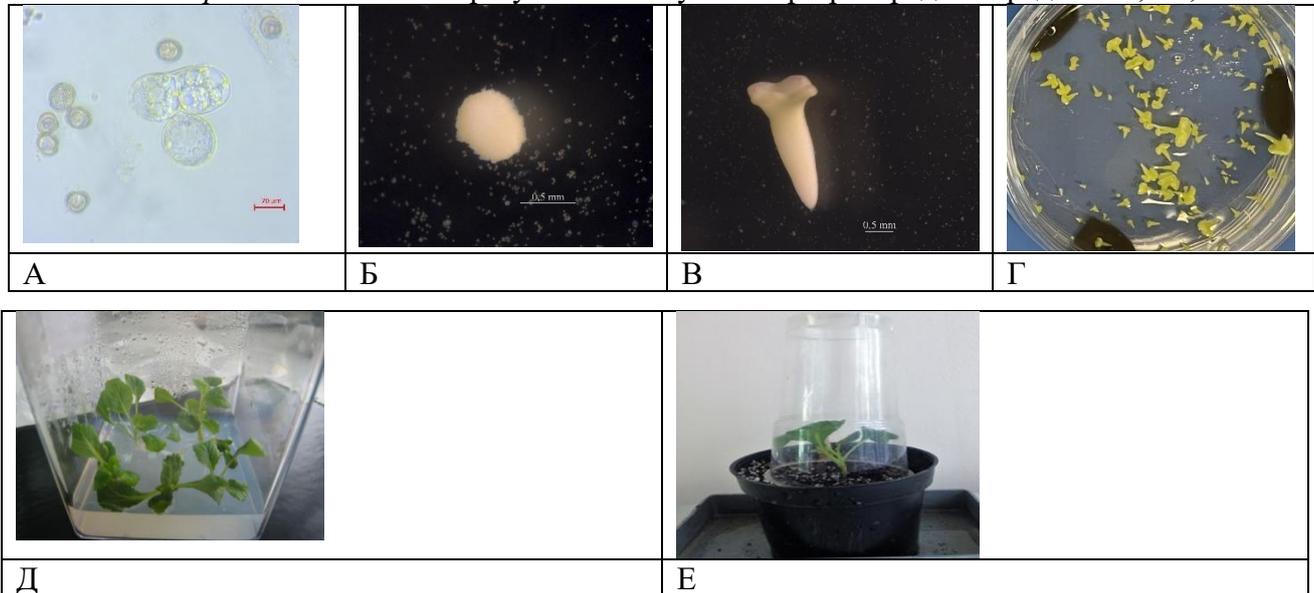
Выход эмбриоидов в зависимости от продолжительности температурной обработки микроспор в культуре *in vitro* у растений *B. oleracea* и *B. rapa* (шт./чашку Петри)

Вид	Селекционный № генотипа	25°C (среднее±SE)	Продолжительность температурной обработки при 32°C, час. (среднее±SE)		
			24	48	72
<i>B. oleracea</i> <i>var. cap.</i>	173	0,00±0,00a	40,67±3,84b	257,33±21,67c	0,00±0,00a
	116	0,00±0,00a	55,00±5,13c	83,00±9,76d	13,33±3,18b
	45	0,00±0,00a	0,00±0,00a	9,50±3,57b	0,00±0,00a
	142	0,00±0,00a	0,33±0,21b	120,00±5,00d	40,33±9,02c
	145	0,00±0,00a	126,47±10,27d	69,50±8,29c	45,75±9,83b
<i>B. rapa</i>	1	0,00±0,00a	9,20±1,36b	11,75±3,43b	0,00±0,00a
	4	0,00±0,00a	249,40±18,91c	49,75±7,42b	0,00±0,00a
	6	0,00±0,00a	121,33±15,06c	14,60±2,86b	0,00±0,00a

Значения в строке внутри генотипа, за которыми следует одна и та же строчная буква, существенно не отличаются, согласно множественному критерию Дункана.

3. Влияние рН питательной среды

Манипуляция со значением pH среды NLN-13 в пределах 5,6-6,6 для различных генотипов капустных культур представляет эффективный и общедоступный способ повышения выхода эмбриоидов. По результатам наших исследований показано, что для капусты белокочанной, цветной, брокколи и рапса наиболее оптимальным является значение pH 5,8-6,0. Для *B. juncea* наибольший выход эмбриоидов достигнут на питательной среде с pH 6,1. А для некоторых генотипов *B. rapa* положительные результаты получены при pH среды в пределах 6,4-6,6.



3.4. Влияние экзогенных гормонов в составе питательной среды

Применение экзогенных регуляторов роста в составе индукционной питательной среды в культуре микроспор *in vitro* не является обязательным требованием для эмбриогенеза. Однако, по результатам исследований с непокорными генотипами применение гормонов способствует выходу эмбриоидов. Для капустных культур преимущественно ауксины и цитокинины способствуют эффективному эмбриогенезу. В наших исследованиях для видов *Brassica* наибольшему выходу эмбриоидов способствовали: кинетин в концентрации 2 мг/л, зеатин в концентрации 1 мг/л и их сочетание с индолилуксусной кислотой (IAA) в концентрации 0,1-0,2 мг/л. Использование 6-бензиламинопурина в концентрации 1-2 мг/л в сочетании с IAA и гиббериллиновой кислотой эффективно влияло на регенерацию и образование адвентивных побегов из эмбриоидов на твердой питательной среде MS.

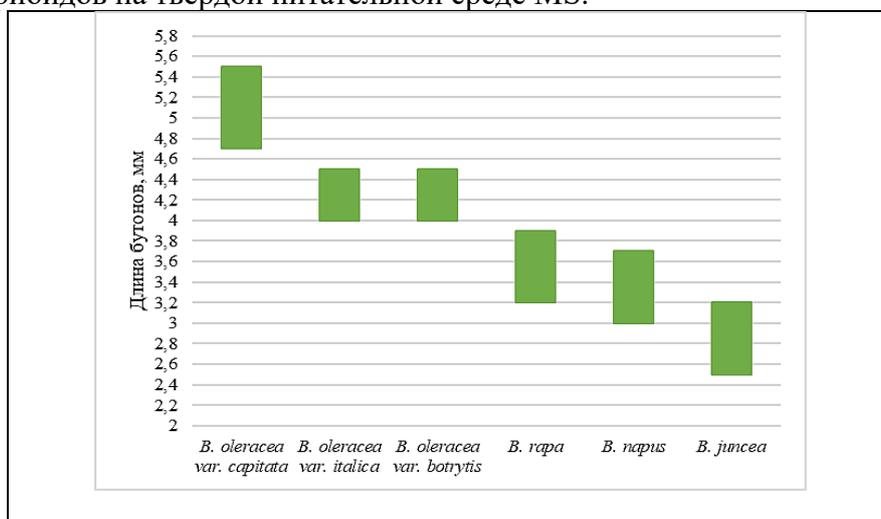


Рисунок 2. Диапазон длины бутонов, способных к эмбриогенезу у рода *Brassica*

Заключение. В результате изучения факторов и подбора оптимальных параметров успешной индукции эмбриогенеза в культуре микроспор *in vitro* у различных представителей рода *Brassica* удалось достичь максимального выхода эмбриоидов у отдельных генотипов. Решающими факторами являются: оптимальная стадия развития микроспор,

высокотемпературная обработка при 32°C, кислотность питательной среды и её гормональный состав.

Библиографический список

1. Домблидес Э.А.; Шмыкова Н.А.; Шумилина, Н.А.; Заячковская Т.В.; Минейкина, А.И.; Козар Е.В.; Ахраменко В.А.; Шевченко Л.Л.; Кан, Л.Ю.; Бондарева Л.Л.; Домблидес, А.С. Технология получения удвоенных гаплоидов в культурах микроспор семейства Brassicaceae (методические рекомендации). Москва. 2016. С. 40.
2. Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Супрунова Т.П. Получение удвоенных гаплоидов у видов рода *Brassica* L. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015, 19(1), 111-120.
3. Baillie A.M.R., Epp D.J., Hucheson D., Keller W.A. In vitro culture of isolated microspores and regeneration of plants in *Brassica campestris*. Plant Cell Rep. 1992, 11, 234-237.
4. Bhatia R., Dey S.S., Sood Sh., Sharma K., Chander P., Kumar R. Efficient microspore embryogenesis in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) for development of plants with different ploidy level and their use in breeding programme. Scientia Horticulturae. 2017, 216(3), 83-92.
5. Bhowmik P., Dirpaul, J., Polowick P., Ferrie A.M.R. A high throughput *Brassica napus* microspore culture system: Influence of percoll gradient separation and bud selection on embryogenesis. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2011, 106, 359–362
6. Devaux P., Pickering R. Haploids in the improvement of *Poaceae*. In C.E. Palmer et al. (ed.); Haploids in crop improvement II. Springer-Verlag: Germany, Berlin, 2005, 215–242.
7. Duijs J.G., Voorrips R.E., Visser D.L., Custers, J.B.M. Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L. Euphytica, 1992, 60, 45-55.
8. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. J. Plant Biotech, 2010, 8, 377-424.
9. Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollens of *Brassica napus*. Z. Pflanzenphysiol. 1982, 105, 427–434.
10. Lichter R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different *Brassicaceae* species. Plant Breed. 1989, 103, 119-123.
11. Mineykina A.I, Bondareva L.L, Soldatenko A.V, Domblides E.A. Androgenesis of red cabbage in isolated microspore culture *in vitro*. Plants. 2021, 10, 1950.
12. Murashige T., Skoog F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol. Plant* 1962, 15, 473–497.
13. Pechan P.M., Keller W.A. Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol. Plant.*, 1988, 74, 377-384.
14. Simmonds D.H., Keller W.A. Significance of pre-prophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis of *Brassica napus*. *Planta*. 1999, 208, 383–391
15. Winarto B., Teixeira da Silva J.A. Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea*. *Plant Cell and Tissue Organ Culture*. 2011, 107, 305-315.
16. Yuan S.X., Su Y.B., Liu Y.M., Fang Z.Y., Yang L.M., Zhuang M., Zhang Y.Y., Sun P.T. Effects of pH, MES, arabinogalactan proteins on microspore cultures in white cabbage. *Plant Cell and Tissue Organ Culture*. 2012, 110, 69-76.
17. Zhang W., Qiang F., Xigang D., Manzhu B. The culture of isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the importance of genotype to embryo regeneration. *Scientia Horticulturae*. 2008, 117(1), 69-72.
18. Zou J., Zou, X., Gong Z., Song G., Ren J., Feng H. Thidiazuron Promoted Microspore Embryogenesis and Plant Regeneration in Curly Kale (*Brassica oleracea* L. convar. *acephala* var. *sabellica*). *Horticulturae*. 2023, 9, 327.

УДК 631.532:57.043

ОПТИМИЗАЦИЯ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА, ИНТЕНСИВНОСТИ ОСВЕЩЕНИЯ И ДЛИТЕЛЬНОСТИ ФОТОПЕРИОДА ДЛЯ ТЕХНОЛОГИИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ГИБРИДОВ ТОПОЛЕЙ

И.В. Могилевская, О.О. Жолобова, Т.В. Терещенко, А.М. Пугачёва, А.В. Солонкин
ФНЦ агроэкологии РАН, Волгоград, Россия

В настоящее время светодиодные технологии активно применяются в различных областях, в том числе для микроклонального размножения древесных растений, используемых для городского озеленения и в агролесомелиорации. В рамках данного исследования был выбран перспективный гибрид *Populus F1-3 g14*, полученный в результате целенаправленного скрещивания двух видов тополей: *Populus deltoides* W. Bartram и *Populus alba* L., широко интродуцированных в Российской Федерации и за ее пределами. Данный гибрид обладает способностью к быстрому росту, устойчив к засушливым условиям климата, что делает его перспективным для использования в зонах с малым количеством осадков в течение года. Целью исследования был анализ влияния различных соотношений спектров, интенсивности освещения светодиодных ламп, а также длительности фотопериода на процессы роста и развития гибрида *Populus F1-3 g14*. Растения выращивались в строго контролируемых условиях на питательной среде Murashige и Scoog без добавления регуляторов роста и с добавлением ауксина ИМК в концентрации 0,01 мг/л. Определены оптимальные параметры освещения для его размножения: сочетание спектров 1КС:1СС:0,53С и фотосинтетическая плотность потока фотонов 70 мкмоль м⁻² с⁻¹. Для развития корневой системы рекомендуется использовать соотношение спектров 2,5КС:1СС:0,43С в сочетании с интенсивностью освещения 40-70 мкмоль м⁻² с⁻¹. Результаты исследования влияния 6 вариантов фотопериода для данного гибрида позволили оптимизировать длительность световой и темной частей суток в искусственных условиях. Эти результаты дают ценные рекомендации по использованию световых спектров, интенсивности освещения, а также длительности фотопериода при выращивании гибрида *Populus F1-3 g14* в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: *Populus*, микроклональное размножение, спектральный состав, фотопериод, интенсивность освещения

OPTIMIZATION OF SPECTRAL COMPOSITION, LIGHT INTENSITY AND PHOTOPERIOD DURATION FOR THE MICROCLONAL REPRODUCTION TECHNOLOGY OF *POPULUS* HYBRIDS

I.V. Mogilevskaya, O.O. Zholobova, T.V. Tereshchenko, A.M. Pugacheva, A.V. Solonkin
FSC Agroecology RAS, Volgograd, Russia

Currently, LED technologies are actively used in various fields, including for microclonal reproduction of woody plants that are promising for urban landscaping and agroforestry. Within the framework of this study, a promising hybrid *Populus F1-3 g14* was selected, obtained as a result of the purposeful crossing of two species of poplars: *Populus deltoides* W. Bartram and *Populus alba* L., widely introduced in the Russian Federation and abroad. This hybrid has the ability to grow rapidly and is resistant to arid climate conditions, making it promising for use in areas with low rainfall throughout the year. The aim of the study was to analyze the effect of various spectrum ratios, the light intensity of LED lamps, as well as the duration of the photoperiod on the growth and development processes of the *Populus F1-3 g14* hybrid. The plants were grown under strictly controlled conditions in Murashige and Scoog nutrient medium without the addition of growth regulators and with the addition of 0.01 mg L⁻¹ IBA. The optimal lighting parameters for its reproduction have been determined: a combination of 1R: 1B: 0.5G spectra and a photosynthetic photon flux density of 70 mmol m⁻² s⁻¹. For the development of the root system, it is recommended to use a spectrum ratio of 2.5R: 1B: 0.4G and light intensity of 40 - 70 mmol m⁻² s⁻¹. The results of the 6 photoperiod variant effect research for this hybrid made it possible

to optimize the conditions for using the duration of light. These results provide valuable recommendations on the use of light spectra and intensity, and photoperiod duration when growing the *Populus* F1-3 g14 hybrid under in vitro conditions.

Keywords: *Populus*, micropropagation, spectral ratio, photoperiod duration, light intensity

Тополь — это одна из первостепенных пород для преодоления лесного дефицита в регионах с недостатком зеленых насаждений [2]. В умеренной зоне данная древесная культура очень быстро растет в течение первого десятилетия. Такое свойство делает его интересным объектом для ученых-исследователей разных стран [10, 7, 4, 3]. Интенсивность транспирации, продуктивность фотосинтеза, секвестрационная способность у тополей значительно выше, чем у других древесных пород [1]. Перечисленные свойства позволяют отнести тополь к хозяйственно важным видам деревьев в связи со способностью к интенсивному росту и накоплению за короткий промежуток времени больших запасов древесины. В то же время использование в современных условиях биотехнологических методов на начальном этапе выращивания становится выгодным инструментом для воспроизводства древесных культур с заданными характеристиками.

Эффективность биотехнологических методов выращивания растений *in vitro* сильно зависит от условий культивирования, в том числе искусственного освещения [12]. Светодиодные технологии сегодня находят большее применение благодаря большому сроку службы, возможности регулировки интенсивности света, увеличенной электрической эффективности, компактному размеру и снижению тепловыделения при использовании LED-ламп [11, 6]. Такие светильники обычно располагают ближе к растениям, это обеспечивает более высокую концентрацию фотонов и, как следствие, приводит к увеличению продуктивности фотосинтеза, а также и сокращению затрат на поддержание оптимальной температуры воздуха в помещении для культивирования [8].

Светодиоды (LED) позволяют комбинировать различные длины волн, тогда индивидуально подобранное их сочетание способствует получению желательных характеристик роста для исследуемых видов и культурных сортов [5]. Для древесных растений рода *Populus* такие исследования влияния интенсивности света и спектрального состава *in vitro* остаются актуальными в связи с недостаточностью сведений для подбора оптимальных контролируемых условий. Целью нашего исследования являлась оптимизация спектрального состава, интенсивности освещения и длительности фотопериода для технологии микроклонального размножения гибридов тополей на примере быстрорастущего клона *Populus* F1-3 g14.

Объект исследований был получен от целенаправленного скрещивания на срезанных ветвях отобранных родительских линий *Populus deltoids* и *Populus alba* в коллекции ФНЦ агроэкологии РАН. Из незрелых зеленых семенных коробочек в стерильных условиях изолированы зародыши, которые были введены в питательную среду, содержащую половину количеств макро- и микросолей по протоколу Murashige and Skoog ($\frac{1}{2}$ MS) [9]. Для культивирования в искусственных условиях освещения использовали питательную среду (MS) полного состава без добавления гормонов. Из полученных гибридов для исследования параметров освещения в условиях *in vitro* выбран быстрорастущий гибрид *Populus* F1-3 g14.

Необходимые уровни освещенности, а именно 6 вариантов спектрального состава с различной интенсивностью от 20 до 225 мкмоль $m^{-2}c^{-1}$ установили с помощью компактного датчика спектрального состава фотонного потока с сенсорным экраном JL600D и программного обеспечения UspectrumX 1.00, а также онлайн-конвертера единиц измерения освещенности. Для культивирования в искусственных условиях использовали экспланты гибрида *Populus* F1- 3 g14 средней длиной $1.25 \pm 0,3$ см после 6 пассажей. Все экспериментальные образцы для выявления оптимального спектрального состава и необходимой интенсивности освещения выращивали в течение 6 недель на среде MS полного состава без добавления регуляторов роста при контролируемых условиях температуры ($23 \pm 1^\circ C$) и фотопериода (16/8 ч) и различной интенсивности освещения. Для определения влияния длительности фотопериода на укоренение эксплантов *Populus* F1-3 g14 проводили эксперимент в климатической камере «Ve Farm Clima 2» (Россия). Исследовали 6 вариантов фотопериода (День-Ночь, ч): 24/0, 20/4, 16/8, 14/10, 12/12,

8/16 при температуре ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) в течение 2 недель и интенсивности освещения $40 \text{ мкмоль м}^{-2}\text{с}^{-1}$.

В результате проведенных исследований после 6 недель культивирования отмечены различные реакции регенерантов на спектральный состав и интенсивность освещения. При использовании сочетания спектров красного (КС), синего (СС) и зеленого (ЗС) в соотношении 1КС:1СС:0,5ЗС и интенсивности освещения $70 \text{ мкмоль м}^{-1}\text{с}^{-2}$ выявлены максимальные длина и прирост побега, количество и площадь листовых пластин, поэтому такие параметры можно рекомендовать как оптимальные для размножения *in vitro* гибрида *Populus F 1-3 g14* (*Populus deltoids* × *Populus alba*). Интенсивность более $125 \text{ мкмоль м}^{-1}\text{с}^{-2}$ отрицательно сказывалась на параметрах роста регенерантов при всех сочетаниях спектров, кроме 0,5КС:1СС:0,03ЗС. Обнаружено отрицательное влияние на прирост побега, свежую массу при увеличении доли красного спектра к синему до 2КС:1СС. Одновременное увеличение красной составляющей спектра и интенсивности освещения уменьшили показатели пигментного состава, а именно общего хлорофилла и индекса азотного баланса почти в 2 раза по сравнению с полученными данными при сочетании спектров 1КС:1СС:0,05ЗС. При сочетании спектров 2,5КС:1СС:0,4ЗС был отмечен наибольший процент укорененных эксплантов, что позволило использовать данное сочетание с меньшей интенсивностью освещения для изучения влияния длительности фотопериода на процесс укоренения при использовании среды без регуляторов роста и с добавлением ауксина ИМК в минимальной концентрации $0,01 \text{ мг/л}$ (рис.1).

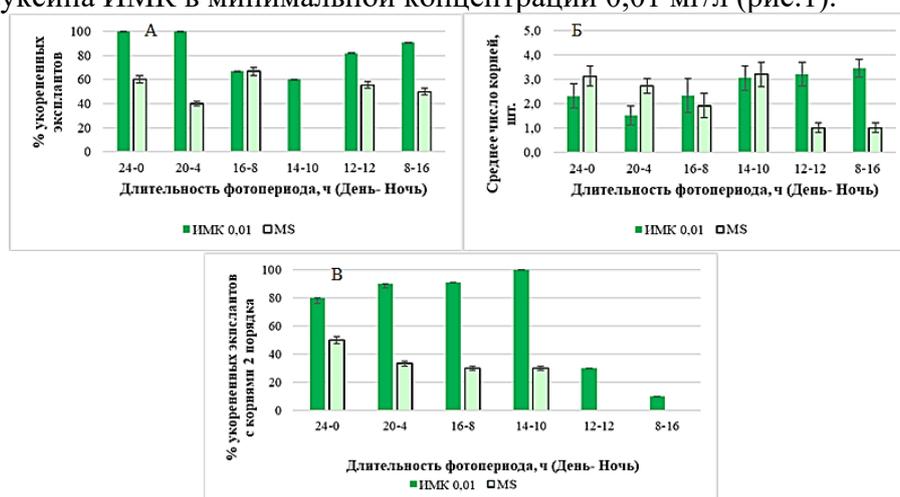


Рисунок 1. Влияние длительности фотопериода на параметры укоренения микропобегов гибрида *Populus F1-3 g14* при культивировании в течение 14 суток на питательной среде MS без добавления гормонов и с добавлением ауксина ИМК ($0,01 \text{ мг/л}$): А - % укорененных эксплантов, шт.; Б - среднее число корней, шт.; В - % укорененных эксплантов с корнями второго порядка, шт. MS – безгормональная питательная среда; ИМК 0,01 – индолил-3-масляная кислота $0,01 \text{ мг/л}$.

Уменьшение длительности фотопериода (8/16 ч) способствовало увеличению числа корней на среде с добавлением ИМК (рис.1 Б). Максимальный процент укорененных эксплантов отмечен при увеличении длительности светового дня до 20-24 ч на среде с добавлением ИМК (рис. 1А). При отсутствии регуляторов роста максимум данного параметра отмечен при фотопериоде 16/8. Появлению корней второго порядка в 100% случаев также способствовала длительность фотопериода 14/10 ч на среде MS с добавлением ИМК ($0,01 \text{ мг/л}$), в то время как на безгормональной среде максимум (50%) был отмечен при увеличенном световом периоде (24/0). Таким образом, в результате проведенных исследований были определены параметры освещения для перспективного в городском озеленении гибрида *Populus F1-3 g14* в культуре *in vitro*. Сочетание спектров 1КС:1СС:0,5ЗС и интенсивность освещения $70 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ оптимальны для стадии размножения исследуемого гибрида, а для укоренения можно рекомендовать сочетание 2,5КС:1СС:0,4ЗС с добавлением ауксина ИМК в концентрации $0,01$

мг/л при длительности фотопериода 14/10 ч. Таким образом, использование гормонов для развития корневой системы совместно с регулированием длительности фотопериода позволяет получить развитую корневую систему у гибрида *Populus* F1-3 g14 в культуре *in vitro*.

Благодарности. Исследование проводилось за счет средств государственного научного гранта Волгоградской области в форме субсидии для реализации проекта «Разработка принципов селективного отбора засухоустойчивых гибридов, форм и клонов тополей в культуре *in vitro*» № 124012200177-7

Библиографический список

1. Евлаков П. М., Гродецкая Т. А., Болтнев И. А. Оценка углерододепонирующей способности быстрорастущих тополей // Состояние и перспективы развития агропромышленного комплекса: сборник научных трудов XVI Международной научно-практической конференции в рамках XXVI Агропромышленного форума юга России и выставки «Интерагромаш» и «Агротехнологии», Ростов-на-Дону, 01–03 марта 2023 года / Донской государственный технический университет. Ростов-на-Дону. 2023. С. 116-117. – DOI 10.23947/interagro.2023.116-117.
2. Царев А. П. Биолого-структурные особенности и палеоисхождение рода *Populus* L. (Обзор) // Лесной вестник / Forestry Bulletin. 2019. Т. 23. № 2. С. 121–126. DOI: 10.18698/2542-1468-2019-2-121-126.
3. Шабунин Д. А., Бутенко О. Ю. Получение мутантов высокопродуктивных генотипов тополя сереющего с использованием метода индуцированного мутагенеза в условиях культуры *in vitro* // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. 2021. № 2. С. 4-16. DOI 10.21178/2079-6080.2021.2.4.
4. Эрст А. А., Каракулов А. В. Оценка засухоустойчивости декоративных форм тополей в культуре *in vitro* // Сибирский экологический журнал. 2023. Т. 30, № 3. С. 321-329. DOI 10.15372/SEJ20230309.
5. Batista D. S., Felipe S. H. S., Silva T. D., de Castro K. M., Mamedes-Rodrigues T. C., Miranda N. A., Ríos-Ríos A. M., Faria D. V., Fortini E. A., Chagas K., Torres-Silva G. Light quality in plant tissue culture: Does it matter? // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2018. Vol. 54. P. 195-215. DOI: 10.1007/s11627-018-9902-5627-018-9939-5.
6. Kondratovičs, T.; Zeps, M.; Rupeika, D.; Zeltinš, P. Morphological and Physiological Responses of Hybrid Aspen (*Populus tremuloides* Michx. × *Populus tremula* L.) Clones to Light In Vitro // Plants. 2022. Vol. 11, № 20. P. 2692. DOI: 10.3390/plants11202692.
7. Liu C., Liu N., Ding C., Liu, F., Su X., Huang Q. Growth of *Populus* × *euramericana* Plantlet under Different Light Durations. Forests. 2023. Vol.14. P. 579. DOI: 10.3390/f14030579.
8. Miler N., Kulus D., Woźny A., Rymarz D., Hajzer M., Wierzbowski K., Szeffs L. Application of wide-spectrum light-emitting diodes in micropropagation of popular ornamental plant species: A study on plant quality and cost reduction // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2019. Vol. 55. P. 99-108. DOI: 10.1007/s11.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15, № 3. P. 473–497.
10. Roviđa Kojima E. A., Gonzalez C. V., Mundo I. A., Guevara A., Biruk L. N. Giordano, C. V. Differential responses of *Populus deltoides* and *Populus* × *canadensis* clones to short-term water deficit // New Forests. 2023. Vol. 54, № 3, P. 421-437. DOI: 10.1007/s11056-022-09929-7.
11. Wu H., Lin C. Red Light-emitting Diode Light Irradiation Improves Root and Leaf Formation in Difficult-to-propagate *Protea cynaroides* L. Plantlets In Vitro // HortScience. 2012. Vol. 47, №10. P. 1490-1494. DOI:10.21273/HORTSCI.47.10.1490.
12. Zeps M., Kondratovičs T., Grigžde E., Jansons A., Zeltinš P., Samsone I., Matisons R. Plantlet Anatomy of Silver Birch (*Betula pendula* Roth.) and Hybrid Aspen (*Populus tremuloides* Michx. × *Populus tremula* L.) Shows Intraspecific Reactions to Illumination In Vitro // Plants. 2022. Vol.11. P. 1097. DOI: 10.3390/plants11081097.

УДК 581.143.5

ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ *SOLANUM CHILENSE* В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* ПРИ РАЗЛИЧНОМ СВЕТОДИОДНОМ ОСВЕЩЕНИИ

Т.В. Никонович, М.И. Усенко, И.Е. Баева.

Белорусская государственная сельскохозяйственная академия, Горки, Беларусь

В статье представлены результаты оценки регенерационного процесса из изолированных тканей семядолей *Solanum chilense* в условиях *in vitro* при различном светодиодном освещении. Установлено, что формирование побегов из соматических клеток исходного экспланта в культуре *in vitro* в значительной степени индуцируют не только регуляторы роста, входящие в искусственную питательную среду, но и спектральный состав света. Определены варианты освещения, позволяющие с относительно высокой частотой (119,0; 342,9 %) вызывать процессы регенерации побегов в культуре тканей семядолей *Solanum chilense*. Это светодиодные светильники, у которых спектральное соотношение R/B составляет 1,3; 3,1 и 19,7; а соотношение FR/R – соответственно 0,14; 0,12; 0,24. Значительный интерес для получения растений-регенерантов представляют светодиоды зеленого цвета, которые совместно с регуляторами роста в составе питательной среды вызвали формирование побегов высотой в среднем 4,1 см, более чем с четырьмя листьями и частотой стеблевого органогенеза 85,7%.

Ключевые слова: томат, *Solanum chilense*, регенерация, *in vitro*, светодиодное освещение.

Культура клеток высших растений является уникальной биологической системой и может рассматриваться в качестве инструмента для физиолого-биохимических, генетических и биотехнологических исследований. Популяции растительных клеток в регулируемых условиях характеризуются рядом специфических особенностей, за счет которых изолированные клеточные культуры представляют собой экспериментальную модель. Важным свойством соматических клеток является их способность к регенерации (лат. *regeneratio* – восстановление, возрождение), то есть к возобновлению деления, дифференциации, в результате чего формируются отдельные ткани, органы или целый растительный организм. В этом проявляется свойство тотипотентности растительных клеток (лат. *totus* – весь, целый и *potentia* – сила), как способности полностью реализовать генетическую программу развития с образованием целого организма и является одной из примечательных особенностей культивируемых клеток растений. В основе тотипотентности лежит омнипотентность ядра или полное сохранение генетической программы развития, что позволяет надеяться на возможность индуцирования активности тех генов, которые отвечают за переход в меристематическое состояние с последующей дифференцировкой стеблевого или корневого апексов, или эмбриогенной структуры, формирование и развитие которой приводит к образованию растения-регенеранта [1, с. 272].

В настоящее время актуальным является выявление генотипов растений, обладающих повышенным регенерационным потенциалом, а также определение условий *in vitro*, стимулирующих проявление восстановительных способностей растительными клетками. Для определения физических факторов, вызывающих реализацию тотипотентности культивируемыми *in vitro* соматическими клетками перспективным направлением, является использование установок на основе света искусственных диодов. Обладая низким энергопотреблением, светодиодные светильники позволяют сократить расходы на освещение. Многообразие световых решений создает определенный спектр света, как для конкретной культуры, так и для конкретного регенерационного процесса. Следовательно, оптимизация освещения для успешного морфогенеза и регенерации растений в условиях *in vitro* требует тщательных исследований, результаты которых позволят получать желаемый результат с минимальным количеством в составе искусственной питательной среды регуляторов роста или совсем без них [4, 5].

Работа с дикими видами томата в культуре *in vitro* направлена на изучение особенностей их регенерации в контролируемых условиях, что позволит включать данные объекты в программы клеточной селекции по улучшению комплекса ценных признаков и свойств растений. Одним из подходов, решающих эти задачи, является анализ происхождения и биологических особенностей диких видов томата, с целью создания оптимальных контролируемых условий для реализации ими регенерационного потенциала. Вид диких томатов *Solanum chilense* относится к семейству пасленовых (рис.1).



Рисунок 1. Внешний вид растения и плодов томата *Solanum chilense*

Произрастает на западном склоне Анд от департамента Такна на юге Перу до севера Чили, на гиперзасушливых скалистых равнинах и прибрежных пустынях от уровня моря до 3000 м. Мощные многолетние растения, прямостоячие, переходящие в лежащие, деревянистые у основания, до 1 м высотой, до 1 м в диаметре, изредка стелющиеся в каменистых местообитаниях. Стебли диаметром у основания 8-12 мм, сероватые, густо бархатисто опушенные. Листья прерывистые, непарноперистые, 7,0-13,0 см длины, 2,5-6,5 см ширины, серовато-зеленые, бархатисто опушенные. Соцветия 6,0-20,0 см, обычно разветвленные с 20-50 цветками. Цветки имеют венчик 2,0-2,6 см в диаметре, звездчатый, ярко-желтый. Плод 1,0-1,5 см в диаметре, шаровидный, 2-5-гнездный, зеленовато-белый с пурпурными полосками по краям гнезда при созревании [6]. Примечательно, что растения *Solanum chilense* обладают определенной степенью устойчивости к факторам внешней среды, в том числе и различным патогенам, что важно для селекции. Кроме того, плоды содержат значительное количество антоцианов – это делает их хорошими донорами указанного признака [2, 3].

Целью данной работы явилось изучение влияния различного спектрального состава светодиодного освещения на регенерационные процессы в культуре изолированных тканей семядолей *Solanum chilense*.

В культуру *in vitro* вводились семена *Solanum chilense*, из которых получали проростки – источники стерильных эксплантов. Для этого плоды без механических повреждений предварительно отмывались проточной водой, затем в условиях ламинарного бокса обрабатывались 96% этанолом и поджигались. Процедура обработки спиртом и поджигания повторялась трижды. Затем плоды вскрывались и семена помещались по одному в стерильные пробирки с питательной средой Мурасиге-Скуга [7]. Данный метод стерилизации позволял получать 100% абсолютно чистых жизнеспособных семян. Культивирование осуществлялось при температуре +22-23°C, в условиях полной темноты. В качестве первичных эксплантов использовались фрагменты тканей семядолей. Через 10-14 дней этиолированные семядоли пересаживались на питательную среду для регенерации, в состав которой вводили экзогенные регуляторы роста: 6-бензиламинопурин и индолилуксусную кислоту.

Регенерационный процесс осуществлялся в культуральном помещении с автоматическим климат контролем, где установлены экспериментальные источники светодиодного освещения. Номера вариантов светодиодных светильников обозначены порядковыми номерами, присвоенными им согласно общей нумерации, используемой в лаборатории. Вариант 4 – светодиодная лента 50 % *Red*+ 50 % *Green* с плотностью потока фотонов – $5,1 \pm 1,8$ мкмоль/($m^2 \cdot c$). Вариант 5 – светодиодная лента RT 2 – 500 12V *White* с плотностью потока фотонов – $5,3 \pm 1,4$ мкмоль/($m^2 \cdot c$). Вариант 8 - светодиодная лента RT 2 – 500 12V *Green* 525 нм с плотностью потока фотонов – $9,2 \pm 2,5$ мкмоль/($m^2 \cdot c$). Вариант 10 - светодиодная лента RT 2 – 500 12V *Blue* 470 нм с плотностью потока фотонов – $0,7 \pm 0,3$ мкмоль/($m^2 \cdot c$). Варианты 12–21 – это модельный ряд светодиодных светильников серии «Светодар» производства Государственного предприятия «ЦСОТ НАН Беларуси». В этих светильниках отношение ППФ (плотность потока фотонов в диапазоне 400–700 нм) оранжево-красно полосы (607–694 нм) к ППФ синей полосы (400–495 нм) варьировалось от 1 до 20.

При этом доля ППФ в диапазоне 580–607 нм (желтый) находилось от 13 до 22 %, а доля фотонов в диапазоне 495–580 нм (зеленый) – от 18 до 38 %. В качестве контроля применялись люминесцентные лампы марки *OSRAM* 36W/765 *Cool Daylight* с плотностью потока фотонов – $38,2 \pm 13,4$ мкмоль/($m^2 \cdot c$) (вариант 22). Через 60 дней определялись следующие показатели: количество образовавшихся побегов (шт.), высота побега (см), количество листьев на побеге (шт.), частота стеблевого органогенеза (отношение количества регенерировавших побегов в варианте опыта к количеству в контроле, выраженное в %), индекс регенерации побегов (отношение количества полученных побегов (шт.) к количеству высаженных первичных эксплантов (шт.)). Как показали наши исследования, более длительное пребывание эксплантов на питательной среде для регенерации приводит к значительному ее истощению и, вероятно, насыщению фенольными соединениями, что вызывает гибель регенерантов и требуется их немедленная пересадка на свежие питательные среды. Причем, нами установлено, что достаточно использовать питательную среду Мурасиге-Скуга без регуляторов роста, чтобы пересаженный побег образовал адвентивные корни и продолжил развиваться как нормальное растение-регенерант. Опыт закладывался в трехкратной повторности по шесть эксплантов на одну повторность. Анализ регенерационного процесса показал, что свет различного спектрального состава значительно влиял на регенерационный потенциал изолированных тканей семядолей *Solanum chilense* в культуре *in vitro*. Формирование побегов из соматических клеток исходного экспланта индуцируют не только регуляторы роста, входящие в состав питательной среды, но и физические факторы, в частности спектральный состав света.

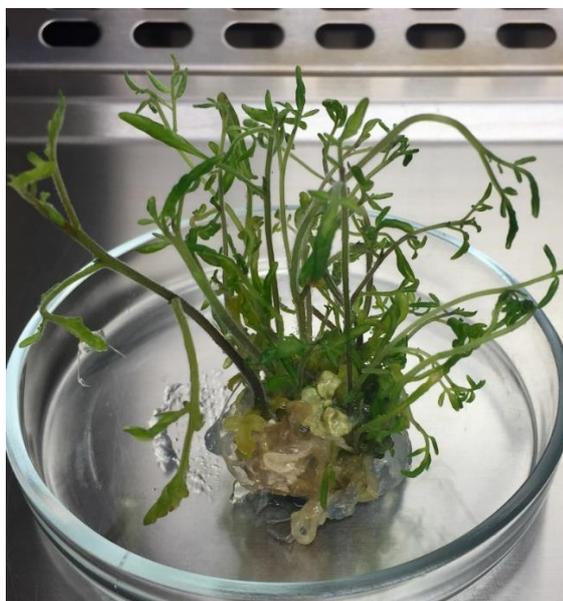


Рисунок 2. Внешний вид побегов, сформировавшихся при 21 варианте освещения

Результаты исследований свидетельствуют о развитии стеблевого органогенеза при всех вариантах светодиодного освещения, однако эффективность и качество этого регенерационного процесса значительно отличались, что указывает на прямую зависимость дифференциации клеток не только от состава питательной среды, но и качества света. В таблице 1 представлена характеристика стеблевого органогенеза, а также данные о количестве и качестве образовавшихся побегов. Наибольшее количество побегов 72 шт. первичные экспланты сформировали при 21 варианте освещения (рис. 2), причем процесс побегообразования продолжался и после установленной даты снятия результатов, тогда как при других вариантах освещения этого явления не наблюдалось.

Таблица 1.

Характеристика стеблевого органогенеза *Solanum chilense* в культуре *in vitro*

Номер варианта освещения	Количество образовавшихся побегов, шт.	Высота побега, см	Количество листьев на побеге, шт.	Частота стеблевого органогенеза, %	Индекс регенерации и побегов
4	6,3	2,4	3,0	28,6	1,0
5	8,0	1,9	2,1	38,1	1,3
8	18,0	4,1	4,7	85,7	3,0
10	22,3	1,7	2,2	104,8	3,7
12	10,7	2,3	5,2	52,4	1,8
13	7,3	1,9	2,2	33,3	1,2
14	25,0	2,4	2,8	119,0	4,2
15	3,3	2,0	2,1	14,3	0,5
16	24,0	2,6	2,2	114,3	4,0
17	8,7	3,0	3,1	38,1	1,3
18	24,7	2,4	2,3	119,0	4,2
19	7,7	1,9	3,0	33,3	1,2
20	8,0	1,4	3,0	33,3	1,2
21	72,0	3,9	4,2	342,9	12,0
22-контроль	21,3	2,4	3,7	100,0	3,5
НСР _{0,5}	27,0	1,2	1,6	-	-

При освещении 21 вариантом были сформированы также отдельные растения-регенеранты с хорошо развитой надземной частью и корневой системой (рис. 3), чего не выявлено при других вариантах освещения.



Рисунок 3. Внешний вид растения-регенеранта, сформировавшегося при 21 варианте освещения

Это свидетельствует об уникальном влиянии 21 варианта освещения на культивируемые клетки, которые способны в данных условиях образовывать эмбриониды, развивающиеся в нормальные растения-регенеранты. Освещение вариантами 10, 16, 14 и 18 вызывало превышение количества регенерировавших побегов над контролем, однако оно составило от 1,0 шт. до 4,0 шт. Значительно уступал контрольному варианту регенерационный процесс, происходящий при освещении 15 вариантом. В данных условиях освещения сформировалось только три побега. Более, чем в два раза меньше побегов образовано первичными эксплантами при 4, 5, 12, 13, 17, 19 и 20 вариантах освещения. На рис. 4 представлен внешний вид побегов, сформировавшихся при 17 варианте освещения, что позволяет видеть значительную разницу в количестве побегов, образованных при 21 варианте освещения, представленных на рис. 2.



Рисунок 4. Внешний вид побегов, сформировавшихся при 17 варианте освещения

Высота побега варьировала от 4,1 см при варианте 8, который способствовал вытягиванию стебля, до 1,4 см при варианте 20. По данному признаку контроль превышали также побеги, образованные при 21 и 17 вариантах освещения. Количество листьев на побеге при контрольном освещении составило 3,7 шт. Это значение было превышено при 8, 12 и 21 вариантах освещения.

Наибольшая частота стеблевого органогенеза 342,9% отмечена при 21 варианте освещения, в данных световых условиях зафиксирован и наивысший индекс регенерации, который составил 12,0. На уровне контроля индекс регенерации установлен при 10 варианте освещения. Незначительное превышение следует отметить при освещении 18, 14 и 16 вариантами. Остальные спектральные составы светодиодного освещения уступали контрольному варианту по влиянию на частоту стеблевого органогенеза, который при них был на уровне 14,3–52,4%. Следует обратить внимание на реакцию клеток первичных эксплантов на освещение вариантом 8. Это светодиоды зеленого цвета, которые совместно с регуляторами роста в составе питательной среды вызвали формирование побегов высотой в среднем 4,1 см, более чем с четырьмя листьями и частотой стеблевого органогенеза 85,7%. Целесообразно признать этот вариант освещения перспективным для работы в культуре *in vitro*, в том числе и с дикими видами томата.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что стеблевой органогенез в тканях семян *Solanum chilense* стимулируется не только наличием в составе питательной среды регуляторов роста, но и качеством света. Несмотря на то, что изучалось действие различного спектрального состава светодиодного освещения в культуре одних и тех же тканей, характеризующихся одинаковым эндогенным гормональным статусом, на одних и тех же вариантах питательных сред частота стеблевого органогенеза варьировала. Такую вариабельность можно объяснить тем, что каждая клетка, имея свою собственную генетическую программу, отвечает на определенные сигналы (качество света) специфически; более того, одна и та же клетка на разной стадии развития может по-разному реагировать на одни и те же сигналы.

В нашем исследовании определены варианты освещения, позволяющие с относительно высокой частотой (119,0; 342,9 %) индуцировать процессы регенерации побегов в культуре тканей семядолей *Solanum chilense*. Это светодиодные светильники вариантов 14, 18 и 21, у которых спектральное соотношение R/B («красный/синий») составляет соответственно 1,3; 3,1 и 19,7; а соотношение FR/R («дальний красный/красный») – соответственно 0,14; 0,12; 0,24. Образовавшиеся в указанных световых условиях побеги успешно развивались при последующем культивировании и формировали нормальные растения-регенеранты. После адаптации в условиях *ex vitro* они могут быть включены в селекционный процесс.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского Республиканского фонда фундаментальных исследований на тему: «Оценка морфогенеза и вариабельности растений-регенерантов различных видов томата при воздействии светодиодного освещения в условиях *in vitro*», договор с БРФФИ № Б24-056.

Библиографический список

1. Калинин, Ф. А. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. А. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. - Киев, 1980. 488 с.
2. Курина А. Б., Соловьева А. Е., Храпалова И. А., Артемьева А. М. Биохимический состав плодов томата различной окраски. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021; 25 (5), с. 514-527.
3. Лабате, Джоан А.; Робертсон, Ларри Д.; Стриклер, Сьюзен Р.; Мюллер, Лукас А. «Генетическая структура четырех диких видов томатов в комплексе видов *Solanum peruvianum* s.l.». Геном. 2014. 57 (3): С. 169–180.
4. Никонович Т. В. Анализ сортовых различий растений-регенерантов картофеля *in vitro* при использовании светодиодных светильников / Т. В. Никонович, А. В. Кильчевский, Т. В. Кардис, В. Л. Филипня, О. В. Чижик, Ю. В. Трофимов, В. И. Цвирко, Е. В. Керножицкий // Вестник БГСХА. 2018. №1. С. 73-79.
5. Никонович, Т. В. Влияние спектрального состава света на рост и развитие растений-регенерантов винограда в период адаптации к условиям *in vivo* / Т. В. Никонович, А. В. Левый, В. В. Французенок // «Вестник БГСХА». – Горки, 2012. № 2. – С. 70-75.
6. Режим доступа: <https://solanaceaesource.myspecies.info/content/solanum-chilense>.
7. Murachige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – Vol. 15. - №13. – P.473-497.

УДК: 631.527:577.29

ИЗУЧЕНИЕ ГИБРИДОВ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-МАРКЕРОВ УСТОЙЧИВОСТИ К СЕПТОРИОЗУ

Н.В. Новоселова, А.В. Харина

Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого, Киров, Россия

Септориоз – одна из значимых болезней пшеницы, способная приводить к большим потерям урожая. В литературе описано более двадцати локусов устойчивости пшеницы к грибу *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvlieg & Crous, который относится к самым вредоносным возбудителям септориоза. При помощи микросателлитных ДНК-маркеров нами были выявлены гибриды, несущие гены *Stb2* и *Stb9*. Данные гибриды представляют интерес для дальнейшей селекции устойчивых к септориозу сортов пшеницы.

Ключевые слова: ПЦР, SSR-маркеры, маркер-вспомогательная селекция, гибридизация, *Triticum aestivum* L.

THE STUDY OF WHEAT HYBRIDS WITH THE USE OF DNA-MARKERS OF RESISTANCE TO SEPTORIOSIS

N.V. Novoselova, A.V. Kharina

Federal Agricultural Research Center of the North-East named N. V. Rudnitsky, Kirov, Russia

Septoriosis is one of the important wheat diseases, which leads to significant yield losses. More than twenty loci of resistance to *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvlieg & Crous have been described in literature. This fungus is related to most harmful causative agents of septoriosis. Using SSR markers, we identified hybrids with *Stb2* and *Stb9* genes. These hybrids are interesting for further breeding of septoriosis resistant cultivars of wheat.

Keywords: PCR, SSR markers, marker assisted breeding, hybridization, *Triticum aestivum* L.

Мягкая пшеница – важная продовольственная культура, выращиваемая по всему миру, однако её урожайность лимитируется различными биотическими и абиотическими стрессами. Септориоз относится к наиболее значимым грибным заболеваниям пшеницы. Его самыми вредоносными возбудителями являются *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvlieg & Crous и *Parastagonospora nodorum* (Berk.) Quaedvlieg, Verkley & Crous. *Z. tritici* является грибом-гемибиотрофом и способна вызывать потери урожая пшеницы в размере до 50 %. К настоящему времени определено более двадцати локусов устойчивости пшеницы к *Z. tritici* (т. н. *Stb*-генов). Основная масса ДНК-маркеров, сцепленных с *Stb*-генами, относится к микросателлитным (SSR) маркерам [1, 4, 5, 7]. Микросателлитные маркеры отличаются высоким внутривидовым полиморфизмом. Преимуществами применения SSR-маркеров являются кодоминантность, точность, надежность и хорошая воспроизводимость результатов анализа [8]. **Целью** нашей работы было идентифицировать среди селекционного материала яровой мягкой пшеницы гибридные линии, несущие локусы устойчивости к *Z. tritici*.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись гибриды, предоставленные лабораторией селекции яровой мягкой пшеницы ФАНЦ Северо-Востока (г. Киров). В естественных полевых условиях Кировской области гибриды F₂ и родительские сорта оценивали по степени поражения, используя шкалу Saari and Prescott (1975) [9]. Определяли индекс устойчивости каждого образца [2]. Для получения ДНК семена анализируемых образцов были пророщены в рулонах фильтровальной бумаги. Выделение ДНК из 5-дневных проростков гибридов F₃ произведено гуанидин-изотиоционатным методом [10]. Для подтверждения наличия генов *Stb2* и *Stb9* использовали микросателлитные SSR-маркеры Xgwm 389 и Xwmc 317

соответственно, ранее показавшие сцепление с данными локусами [5]. Последовательности SSR-маркеров (табл. 1) были взяты из БД GrainGenes [6].

Таблица 1

SSR-маркеры, использованные для поиска *Stb*-генов

Ген	Маркер	Праймеры, прямой и обратный (5' – 3')	Температурный режим	Размер ампликона, п н
<i>Stb2</i>	Xgwm 389	ATCATGTCGATCTCCTTGACG TGCCATGCACATTAGCAGAT	I 95 °С – 5 мин; II 35 циклов: 95 °С – 30 с, 72 °С – 2 мин; III 72 °С – 7 мин	120
<i>Stb9</i>	Xwmc 317	TGCTAGCAATGCTCCGGGTAAC TCACGAAACSTTTTCCTCCTCC	I 95 °С – 5 мин; II 35 циклов: 95 °С – 1 мин, 65 °С – 50 с, 72 °С – 1 мин; III 72 °С – 7 мин	139

Состав реакционной смеси на 10 мкл: ДНК – 2 мкл, 10 х PCR буфер – 1 мкл, смесь dNTPs (4 mM) – 0,5 мкл, по 1 мкл прямого и обратного праймера, Taq-полимераза – 3,75 ед., вода mQ – 3,75 мкл. Условия проведения ПЦР и ожидаемый размер ампликонов представлены в табл. 1. Реакции выполнены на амплификаторе ТП4-ПЦР-01-«Терцик» («НПО ДНК-технология»). ПЦР-продукты были разделены методом вертикального электрофореза в 8 %-м полиакриламидном геле и окрашены бромистым этидием (1 %). Результаты электрофореза документировали с помощью видеосистемы «Взгляд» и ПО «IC Measure» («Компания Хеликон»). Размер амплифицированных фрагментов определяли с использованием 100bp+2Kb+3Kb ДНК-маркеров веса («СибЭнзайм»).

Результаты и обсуждение. На основании анализа научной литературы [1] и изучения коллекционных образцов [3] были выбраны сорта-носители генов устойчивости к *Z. tritici Stb2* и *Stb9*. Данные сорта были любезно предоставлены для селекционной работы Всероссийским институтом генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова (г. Санкт-Петербург). Среди исходного материала с *Stb*-генами наибольший интерес представляет сорт Epos, характеризующийся в полевых условиях как умеренно восприимчивый (степень поражения составила 22,5 %) к септориозу листьев (табл. 2).

Таблица 2

Характеристика исходных форм и гибридов F₂ яровой мягкой пшеницы по устойчивости к септориозу листьев (2023 г)

Исходная форма/гибрид	Каталог ВИР	Происхождение	Ген	Септориоз	
				степень поражения, %	ИУ*
Heines Kolben	31235	Германия	<i>Stb6</i>	55,0	0,62
Heines Kolben x Nova Prata	-	-	-	66,7	0,90
Nova Prata	47064	Бразилия	<i>Stb2</i>	26,7	0,43
Nova Prata x Heines Kolben	-	-	-	53,3	0,59
Nova Prata x Награда	-	-	-	46,7	0,69
Арех x Nova Prata	-	-	-	53,3	0,56
Tonic	59449	Великобритания	<i>Stb9</i>	36,7	0,49
Tonic x Баженка	-	-	-	24,0	0,37
Epos	65801	Германия	<i>Stb2</i>	22,5	0,43
Epos x Heines Kolben	-	-	-	8,3	0,18
Epos x Tonic	-	-	-	6,7	0,14

*- индекс устойчивости сорта.

Гибриды с этим сортом в качестве материнской формы: Epos x Heines Kolben и Epos x Tonic, проявили полевую устойчивость к болезни (степень поражения листа 8,3 и 6,7 %, соответственно). Остальные сорта показали себя восприимчивыми к септориозу (степень поражения от 26,7 до 55,0 %). Гибриды с ними также характеризовались как восприимчивые, кроме умеренно восприимчивого гибрида Tonic x Баженка (степень поражения 24,0 %).

В ходе исследования был проведен ПЦР-анализ 102 гибридных линий F₃, полученных от семи комбинаций скрещиваний (табл. 3). Нами были выявлены гибриды пшеницы, унаследовавшие от сорта-донора *Stb*-локусы (рис. 1). При использовании английского сорта Tonic (донора гена *Stb9*) была получена высокая доля (от 40 до 100 %) растений-гибридов, несущих locus устойчивости. Примечательны образцы 1167 и 1176, полученные при скрещивании сортов Epos и Tonic. У данных образцов были идентифицированы маркеры, связанные как с *Stb2*, так и с *Stb9*. Так как пирамидирование генов способствует более длительной устойчивости сортов к болезням [1], образцы 1167 и 1176 представляют собой ценный материал для дальнейшей селекции.

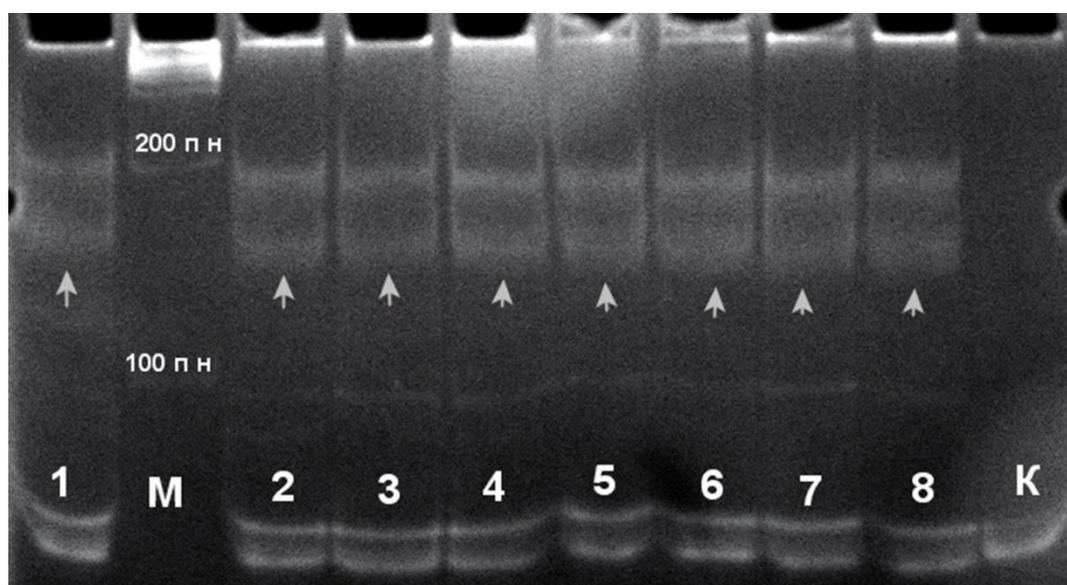


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами к маркеру Xwmc 317 (сцеплен с локусом *Stb9*) в 8 %-м полиакриламидном геле. К — отрицательный контроль; М — маркер молекулярного веса; 1 – 8 – исследуемые линии пшеницы 1123 - 1130; Стрелками отмечены целевые амплификаты (139 п н).

Таблица 3

Результаты ПЦР-анализа гибридных линий F₃ яровой мягкой пшеницы

№ линий	Гибридная комбинация	Общее кол-во проанализированных растений	Образцы с <i>Stb</i> -генами	
			шт	%
<i>Stb2</i>				
1081 – 1099	Heins Kolben x Nova Prata (<i>Stb2</i>)	19	-	-
1102 – 1114	Nova Prata (<i>Stb2</i>) x Награда	13	1	8
1115 – 1117	Nova Prata (<i>Stb2</i>) x Heins Kolben	3	-	-
1131 – 1151	Апex x Nova Prata (<i>Stb2</i>)	21	-	-
1154 – 1161	Epos (<i>Stb2</i>) x Heins Kolben	8	-	-
1162 – 1186	Epos (<i>Stb2</i>) x Tonic (<i>Stb9</i>)	25	1	4
<i>Stb9</i>				
1118 - 1130	Tonic (<i>Stb9</i>) x Баженка	13	13	100
1162 - 1186	Epos (<i>Stb2</i>) x Tonic (<i>Stb9</i>)	25	10	40

Таким образом, нами были выделены гибридные линии, несущие локусы *Stb2* и *Stb9*. Данный селекционный материал был получен в результате скрещивания сортов пшеницы Ерос и Тонис. Гибриды F₂ этих сортов проявили полевою устойчивостью в естественных условиях Кировской области, гибриды F₃ также будут оценены по устойчивости к септориозу колоса.

Благодарности. Статья подготовлена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках Государственного задания ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого» (тема № FNWE-2022-0001)

Библиографический список

1. Бакулина А. В., Харина А. В., Широких А. А. Септориоз листьев и колоса пшеницы: генетический контроль устойчивости хозяина (обзор) // Теоретическая и прикладная экология. 2020. № 2. С. 26-35. DOI: 10.25750/1995-4301-2020-2-026-035.
2. Коломиец Т. М., Панкратова Л. Ф., Пахолкова Е. В. Сорты пшеницы (*Triticum L.*) из коллекции Grin (США) для использования в селекции на длительную устойчивость к септориозу // Сельскохозяйственная биология. 2017. № 52(3). С. 561-569. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.3.561rus
3. Новоселова Н. В., Харина А. В., Бессолицына Е. А., Савинцева Л. С. Скрининг *Stb*-генов устойчивости к септориозу у сортов мягкой пшеницы // Зерновое хозяйство России. 2023. № 15(2). С. 57–62. DOI: 10.31367/2079-8725-2023-85-2-57-62.
4. Ababa G. Biology, taxonomy, genetics, and management of *Zymoseptoria tritici*: the causal agent of wheat leaf blotch // Mycology. 2023. V. 14. №. 4. P. 292-315. DOI: 10.1080/21501203.2023.2241492
5. Brown J. K. M., Chartrain L., Lasserre-Zuber P., Saintenac C. Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding // Fungal Genetics and Biology. 2015. V. 79. P. 33-41. DOI: 10.1016/j.fgb.2015.04.017.
6. GrainGenes, a database for Triticeae and Avena. URL: <https://wheat.pw.usda.gov/GG3/> (дата обращения: 17.01.2024)
7. Gupta P. K., Vasistha N. K., Singh S., Joshi A. K. Genetics and breeding for resistance against four leaf spot diseases in wheat (*Triticum aestivum L.*) // Frontiers in plant science. 2023. V. 14. P. 1023824. DOI: 10.3389/fpls.2023.1023824
8. Li T., Cai S., Cai Z., Fu Y., Liu W., Zhu X., Lai C., Cui L., Pan W., Li Y. TriticeaeSSRdb: A Comprehensive Database of Simple Sequence Repeats in Triticeae // Frontiers in Plant Science. 2024. V. 15. P. 1412953. DOI: 10.3389/fpls.2024.1412953
9. Saari E. E., Prescott J. M. A scale for appraising the foliar intensity of wheat disease // Plant Disease Reporter, 1975. V. 59(5). P. 377–380.
10. Sambrook J., Fritsch T., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual // New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p.

УДК 575.852'113:575.858:57.082.13

ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЕ РАСТЕНИЙ СЛЕДУЮЩЕГО ПОКОЛЕНИЯ

А. В. Родионов, Е. О. Пунина, В. С. Шнеер, А. С. Сухов, В. В. Домашкина

Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, ул. проф. Попова, д. 2, г. Санкт-Петербург, 197376, Россия

E-mail: avrodionov@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/00-0003-1146-1622>

По оценкам кариологов, от 30 до 80% видов растений имеют полиплоидные геномы. Полиплоидизация (полногеномная дупликация – WGD) генома – широко распространенный и быстрый способ видо- и родообразования у растений. Таким путем возникли десятки тысяч видов современных растений. Отталкиваясь от этого факта, А. Лёве (Löve, 1982, 1984) предложил положить в основу систематики и таксономии Пшеницевых геномную формулу – уникальную композицию генома, характерную для данного рода. К одному роду следует относить группу близкородственных видов, имеющую или специфический диплоидный геном, или особую, только для рода характерную, комбинацию субгеномов. До недавнего времени почти единственным способом определения геномного состава вида и рода был предложенный Кихарой метод «Genomanalys» в основе которого лежит изучение закономерностей конъюгации хромосом у потомства от скрещивания тестируемого полиплоида с предполагаемыми диплоидными предками ("анализаторами"). Предложенный Кихарой экспериментальный подход требовал длительных и трудоемких исследований и наличия коллекций живых растений. По этой причине проведение геномного анализа было возможно только в работе с немногочисленными сельскохозяйственными культурами. Должны были появиться новые методы анализа геномов. «То, что невозможно теперь, со временем может стать возможным» - писал Н.Н. Цвелев (1991). Такие методы сейчас появились. Исследуя внутригеномный полиморфизм рДНК методом NGS на платформе Illumina можно эффективно идентифицировать виды и рода растений и верифицировать гипотезы о их происхождении.

Ключевые слова: ITS1, DNA barcoding, rDNA

После того, как была реализована программа секвенирования всех протеин-кодирующих генов генома человека, возникла идея секвенировать один и тот же ген в геномах всех видов животных. В идеале хотелось подобрать такой ген, который бы у животных и у растений выполняет одну и ту же функцию, который был бы идентичен по последовательности ДНК у всех особей вида, но различается у разных видов. Тем самым появилась бы возможность идентифицировать вид по ДНК вне зависимости от сохранности морфологии биологического материала. Автором и пропагандистом этой идеи был канадский ученый Пол Эбер (Hebert et al., 2003). Предлагаемое направление исследований получило название **DNA-barcoding**. В качестве такого стандартного ДНК-штрихкода был предложен 5'-фрагмент субъединицы 1 митохондриального гена цитохром С оксидазы (CO1) (Hebert et al., 2003). Идея была поддержана многими исследователями в разных странах и легла в основу нескольких крупных национальных и межнациональных проектов, таких как International Barcode of Life (I-BOL), Fish Barcode of Life Campaign (FISH-BOL), HealthBOL, Bee Barcode of Life Initiative (Bee-BOL), Lepidoptera Barcode of Life, Mammalian Barcode of Life Campaign. В нашей стране добровольное объединение исследователей этого направления получило название RUS-BOL - председатель Координационного совета проф. Ю.Ф. Картавцев (НИЦМБ ДВО РАН, Владивосток).

Причина, почему идея ДНК-штрихкодирования стала популярной в потенциальной привлекательности этой технологии для решения научных и практических задач. Выделим несколько основных направлений научно-практической деятельности, где находит применение ДНК-штрихкодирование:

А. Определение таксономической принадлежности (вида) образца в экологических, зоологических и ботанических исследованиях: актуальность и значение

этого направления исследований объясняется тем, что 1) число квалифицированных «традиционных» систематиков-зоологов, энтомологов, ботаников, микологов, способных по морфологии безошибочно определить вид, катастрофически уменьшается с каждым годом; 2) Некоторые виды можно определить только на определенной стадии развития; 3) В последние годы обнаружено, что в природе есть «криптические виды» – морфологически неразличимые, но репродуктивно изолированные (Шнеер и др., 2023).

В. Контроль происхождения и качества пищевых продуктов: конкретные, проведенные уже с использованием ДНК-технологий исследования показали, что анонсированный рыбными торговцами и указанный в ресторанных меню видовой состав рыбных блюд катастрофически часто не соответствует реальности. Так Armani et al. (2015) показали, что на итальянских рыбных рынках 48.5% продуктов относились к другим видам рыб, чем объявлено продавцами. Kappel and Schröder (2016) показали, что в немецких ресторанах 50% блюд приготовлены из более дешевых видов рыб, чем указано в меню. В испанских и китайских ресторанах показатели ненамного лучше – в Испании 43% рыбных блюд приготовлены из рыбы, не соответствующей меню (Muñoz-Colmenero et al. (2016); в Китае на рыбных базарах Сяньзяня 36% рыб, а в Хэнане 28,5% рыб относились не к тому виду рыб, который значился на этикетке (Wang et al (2015). Контрольное исследование видового состава мясных блюд также часто показывает несоответствие вида продукта объявленному видовому составу: в Арабских Эмиратах это наблюдалось в 5% случаев (Premanandh et al., 2013), в Великобритании в 10% (Shears, 2010), в Индии, Греции, США и Канаде в 25-35% случаев (Wong, Hanner, 2008; Stamatis et al. 2015).

С. Определения видового состава видов растений, по тем или иным причинам запрещенных к выращиванию. Приведем конкретный пример: постановлением Правительства Российской Федерации №135 от 7 февраля 2024 года предусмотрена административная и уголовная ответственность за выращивание ранее популярного садового растения вида *Ipomoea tricolor* Cav. Садовые сорта этого вида прошли через руки селекционеров и удивительно разнообразны. Отличить вид от садовых сортов других видов рода, например от *I. purpurea* (L.) Roth нелегко даже специалисту. Вероятно, со временем, как судебным исполнителям, так и адвокатам в делах, связанных с этим объектом не обойтись без ДНК-технологий.

Д. Качество растительного сырья в фармакогнозии. Между тем, случаи фальсификации дорогостоящих компонентов и замены их на морфологически сходные, но более дешевые виды растительного сырья не редкость в фармацевтической практике. Так из 78 растительных продуктов, обозначенных поставщиками как *Hypericum perforatum* L. только 68% содержали растительный материал именно этого вида. Только 15% исследованных растительных продуктов *Veronica* содержали целевой вид *Veronica officinalis* L., тогда как основной известный фальсификат, *Veronica chamaedrys* L., был обнаружен в 62% продуктов (Raclariu et al., 2018). В Великобритании популярны как антидепрессанты элеутерококк колючий (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim) Maxim), продающийся под именем «сибирский женьшень», и розовый корень *Rhodiola rosea* L. Проверка 25 коммерческих образцов «сибирского женьшеня» и 10 образцов розового корня, поставленных из Китая показала, что все образцы, продаваемые как «сибирский женьшень», содержали растительный материал этого вида, но 9 образцов кроме того имели в своем составе материал других видов *Eleutherococcus* - *E. sessiliflorus* (Rupr. et Maxim) S.Y.Hu, *E. divaricatus* (Siebold et Zucc.) S.Y.Hu или *E. seoulensis* (Nakai) S.Y.Hu. Что касается родиолы розовой, то в 5 образцах действительно содержалась только родиола розовая, в 1 образце смесь *Rhodiola rosea* и других видов этого рода, в 4 образцах *R. rosea* не определялась, но выявлялась смесь других видов рода *Rhodiola* (Жохова и др., 2019).

Следует подчеркнуть, что с самого начала реализации программы CBOL на пути ДНК-штрихкодирования растений встретилось много трудностей. Стандартный ДНК-штрихкод животных – фрагмент митохондриального гена CO1 оказался неприменим для растений ввиду низкой и неравномерной скорости мутирования (Kress, 2017; Шнеер, Родионов, 2018; Жохова и др., 2019). Была организована специальная группа по поиску ДНК-штрихкода растений (Plant Working Group CBOL). Поиск велся среди нескольких хлоропластных последовательностей,

генов: *matK*, *rpoB*, *rpoC1*, *accD*, *rbcL* и др., некоторых межгенных спейсеров *trnH-psbA*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI*. В качестве наиболее эффективных ДНК-маркеров видов рассматривались межгенные спейсеры ITS1 и ITS2 генов 35S рРНК (Kress, 2017; Шнеер, Родионов, 2018; Жохова и др., 2019). В общем, вывод из многочисленных исследований был сделан такой – однозначная идентификация вида часто требует сравнения нескольких последовательностей сразу (например, *rbcL* и ITS2) (Kress, 2017; Жохова и др., 2019). Появление новых технологий секвенирования, таких как NGS и геномного скимминга (low-coverage shotgun sequencing) породило новые направления, получившие названия “extended DNA barcode” и “mega-barcoding” (Hollingsworth et al., 2016; Kress, 2017). В основе этих подходов лежит предположение, что ДНК-штрихкодирование растений нужно проводить путем одновременного анализа многих разных генов в геноме.

Предлагаемый нами подход принципиально иной. Он строится на особенностях происхождения и организации геномов растений. Исследованиями последнего времени показано, что предки всех современных цветковых растений прошли через акт или акты межвидовой гибридизации, полиплоидизации и вторичной диплоидизации и диспloidии (Родионов, 2022, 2023). Кроме того, от 15 до 50% видов – это относительно недавно возникшие виды с полиплоидным геномом, кариотип которого не позволяет усомниться в его полиплоидном происхождении (Wood et al., 2009). Вторичные диплоиды и полиплоидные виды часто сохраняют способность к следующим актам межвидовой гибридизации, давая все новые и новые комбинации субгеномов. Часто, хотя и не всегда, каждая новая комбинация субгеномов характеризуется особым набором морфологических признаков, достаточным, чтобы определить обладающую им группу морфологически своеобразных растений как особый вид или особый род. Лёве и Дьюи (Löve, 1984; Dewey, 1984) предложили считать родом группу близкородственных видов, имеющую или специфический диплоидный геном, или особую, только для этого рода характерную комбинацию субгеномов. При этом автополиплоидное умножение генома или субгенома не считалось достаточным для того, чтобы относить носителей таких комбинаций генома к разным родам. Попытки последовательного применения геномной концепции рода нередко приводили к неоднозначным новациям в таксономии, потому в свое время, геномная концепция рода принята далеко не всеми систематиками. Однако, такой авторитет, как Н. Н. Цвелев (1991) считал, что геномный критерий родов заслуживает внимания хотя бы потому, что в области морфологии однозначных синапоморфий для построения системы родов, по крайней мере у Пшеницевых, не существует, убедительных морфологических гиатусов на границах родов или репродуктивной изоляции не найдено.

Из широко распространенного недавнего гибридного происхождения многих видов цветковых растений следует, что индикатором вида является не конкретная маркерная последовательность ДНК (ДНК-штрихкод), а сочетание ДНК-штрихкодов, полученных растением от его относительно недавних предков. Метод локус-специфичной амплификации на платформе Illumina многократно повторенных в геноме последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и/или ITS2 позволяет выявить мажорные и минорные варианты рДНК, из которых часть - результат постепенно накапливающихся в геномах мутаций, а другие определяются как последовательности, полученные растением от предков видов. Новое или необычное сочетание вариантов рДНК показывает на то, что геном образца относится к иному виду или новому гибриду. Предлагаемый подход позволяет эффективно дифференцировать близкие по морфологии виды и верифицировать гипотезы о происхождении природных и искусственных гибридов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках гранта РНФ № 24-24-00326.

Библиографический список

1. Жохова Е. В., Родионов А. В., Повыдыш М. Н. и др. 2019. Современное состояние и перспективы использования ДНК-штрихкодирования и ДНК-фингерпринтинга для анализа качества лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов // Успехи современной биологии. Т. 139. №1. С. 25-40.

2. Родионов А.В. 2023. Эуполиплоидия как способ видообразования у растений // Генетика. Т. 59. №5. С. 493-506. DOI: 10.31857/S0016675823050119
3. Родионов А. В. 2022. Тандемные дубликации генов, эуполиплоидия и вторичная диплоидизация—генетические механизмы видообразования и прогрессивной эволюции в мире растений // *Turczaninowia*, 25(4), 87-121
4. Цвелев Н. Н. 1991. О геномном критерии родов у высших растений // Бот. журн. Т. 76, № 5. С. 669–676).
5. Шнеер В. С., Пунина Е. О., Домашкина В. В., Родионов А. В. 2023. Криптогибриды у растений- подводная часть айсберга // Ботанический журнал. Т. 108. №12. С. 1037-1052.
6. Шнеер В. С., Родионов А. В. 2018. ДНК-штрихкоды растений // Успехи современной биологии. Т. 138. № 6. с. 531–538.
7. Armani, A., Guardone, L., La Castellana, R., Gianfaldoni, D., Guidi, A., & Castigliego, L. (2015). DNA barcoding reveals commercial and health issues in ethnic seafood sold on the Italian market // *Food Control*, 55, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.030>.
8. Dewey, D. R. 1984. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae // In: J. P. Gustafson (ed.) *Gene manipulation in plant improvement*. Boston, MA: Springer. Pp. 209-279.
9. Hebert P.D. N., Ratnasingham S., deWaard J. R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species // *Proc. R. Soc. Lond. B*. V. 27. P. 96–99.
10. Hollingsworth PM, Li D-Z, van der Bank M, Twyford AL. 2016. Telling plant species apart with DNA: From barcodes to genomes // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371: 20150338.
11. Kappel, K., & Schröder, U. 2016. Substitution of high-priced fish with low-priced species: Adulteration of common sole in German restaurants // *Food Control*, 59, 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.024>.
12. Kress, W. J. 2017. Plant DNA barcodes: Applications today and in the future // *Journal of systematics and evolution*, 55(4), 291-307.
13. Löve Á. 1984. Conspectus of the Triticeae // *Feddes Repert.* 1984. Т. 95. S. 425–521.
14. Muñoz-Colmenero, M., Blanco, O., Arias, V., Martinez, J. L., & Garcia-Vazquez, E. 2016. DNA authentication of fish products reveals mislabeling associated with seafood processing // *Fisheries*, 41(3), 128–138. <https://doi.org/10.1080/03632415.2015.1132706>.
15. Premanandh, J., Sabbagh, A. and Maruthamuthu, M. 2013. Misdescription of packaged foods: a case study from the United Arab Emirates // *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(12), pp.2022-2026.
16. Raclariu, A. C., Heinrich, M., Ichim, M. C. and de Boer, H. 2018. Benefits and limitations of DNA barcoding and metabarcoding in herbal product authentication// *Phytochemical Analysis*, 29(2), pp.123-128.
17. Shears, P. 2010. Food fraud—a current issue but an old problem // *British Food Journal*, 112(2), pp.198-213.
18. Stamatis, C., Sarri, C.A., Moutou, K.A., Argyrakoulis, N., Galara, I., Godosopoulos, V., Kolovos, M., Liakou, C., Stasinou, V., Mamuris, Z. 2015. What do we think we eat? Single tracing method across foodstuff of animal origin found in Greek market // *Food Research International*, 69, pp.151-155.
19. Wang, M., Liu, Z., Huang, H., Zhao, X. M., Shi, Q., He, S. P., et al. 2015. Application of DNA barcode technology in identification of fish and meat products in Shenzhen // *Food Science*, 36(20), 247–251. Available from: http://www.wanfangdata.com.cn/details/detail.do?_type=perio&id=spkx201520048.
20. Wong, E. H. K. and Hanner, R. H. 2008. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood // *Food Research International*, 41(8), pp.828-837.
21. Wood T. E., Takebayashi N., Barker M. S. et al. 2009. The frequency of polyploid speciation in vascular plants // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. V. 106. P. 13875–13879.

УДК 536.66 +543.86

МЕТОДЫ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ЛИПИДНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ. ТЕСТИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ.

Н.В. Сизова

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химии нефти
Сибирского отделения Российской академии наук
634055, г. Томск, пр. Академический, 4, тел. (3822)-49-14-57, 8-913-8207359
e-mail: SizovaNV@mail.ru*

В работе рассмотрены методы экстракции природных соединений из растительного сырья, и протестирована их антиоксидантная активность. Содержание антиоксидантов измерено методом микрокалориметрии по регистрации теплоты модельной реакции радикального окисления кумола в присутствии экстрактов. Исследовались масляные, углеводородные, углекислотные экстракты. Показана эффективность докритической углекислотной экстракции при низкой температуре углекислоты (21-24 °С), и давлении 5,8 до 6,8 МПа. Для увеличения выхода липидных компонентов проведена со-экстракция ягод облепихи и жмыха рапса, и показано, что такая технология позволяет выделить из сырья в два раза больше биологически-активных веществ. Количество антиоксидантов зависит от исходного сырья и метода выделения, максимальные концентрации обнаружены в экстрактах, выделенных углекислотой и углеводородами из жмыхов ягод клюквы, брусники, облепихи (до $5,5 \cdot 10^{-2}$ моль/кг). Применяемая в работе методика оценки качества экстрактов по выходу липидных АО позволяет выбрать наиболее эффективный способ переработки растительного сырья.

Ключевые слова: углекислотная экстракция растительного сырья, кинетический метод определения антиоксидантов, масляная экстракция, природные антиоксиданты.

Природные соединения, которые проявляют себя как антиоксиданты (АО) растительного происхождения, одновременно обладают противовоспалительным, антимикробным, противовирусным действием, поэтому антиоксидантная активность является косвенной оценкой лечебных свойств растительных экстрактов.

Источники природных антиоксидантов. Ранее мы изучали зависимость АО-активности объектов растительного происхождения от способа выделения экстрактов [1]. Установлено, что источниками природных антиоксидантов являются розмарин, шалфей, прополис, кора лиственницы, пелоиды, масла черного тмина и зародышей пшеницы, семена и оболочки ягод и т.д. Концентрация антиоксидантов зависит от технологии проведения экстракции, максимально эффективно использовать в качестве экстрагентов органические растворители (спирт, ацетон, гексан, эфиры), что практикуется в исследовательских лабораториях. Для крупнотоннажной переработки растительного сырья этот способ не подходит, вследствие токсичности и дороговизны растворителей. В последние годы развивается флюидная экстракция углекислотой, которая не уступает по эффективности экстракции органическими растворителями, и позволяет получать в едином технологическом процессе как масляную, так и водную фракцию растений. Большой плюс этого вида переработки экстракта - отсутствие термического разложения биологически активных веществ (БАВ), недостатками можно назвать высокие требования к технике безопасности и невозможность селективного выделения компонентов. Углекислота экстрагирует эфирные и жирные масла, восковые фракции, которые при вводе в жирные масла выпадают в осадок. Воскообразные углекислотные экстракты успешнее всего применяются в эмульсионных косметических средствах, где воски являются дополнительным загустителем и активом. Часто для увеличения выхода в экстрактор добавляют органический растворитель, на примере экстракции душистых растений диоксидом углерода авторами работы [2] показано, что самый высокий выход экстрактов был получен с помощью полярных растворителей (ацетона или смеси метанол-вода). Высокую антиокислительную активность проявили эфирные масла

чабреца и шалфея, полученные путём экстракции ацетоном, эти экстракты считаются наиболее перспективными для использования в качестве пищевых антиоксидантов.

В натуральных растительных маслах максимально активными антиоксидантами являются гомологи и стереоизомеры токоферола (ТФ), имеющие в составе структурный фрагмент экранированного фенола, они обладают схожей биологической активностью и объединены в группу «витамина Е» [3]. Для разных образцов одного сорта масла количество витамина Е может быть критерием качества и пищевой ценности, его содержание зависит от способа получения, качества сырья, метода очистки. Например, для подсолнечного масла содержание ТФ изменяется от 64 до 98 мг%, в прессованном при низкой температуре масле витамина Е содержится на 30 % больше, чем в рафинированном, дезодорированном масле [4]. Из изученных жирных масел максимальной АО-активностью обладает масло зародышей пшеницы, содержащее токоферолов до 350 мг%. Широко рекламируемое как анти-канцерогенное и анти-мутагенное действие масло черного тмина (*Nigella sativa* oil), (активные вещества: тимохинон, дитимохинон, тимогидрохинон, тимол, токоферолы) по суммарному количеству АО превышает все остальные масла $(6-9) \cdot 10^{-3}$ моль/кг [4].

Ранее, на примере различных технологий извлечения БАВ из облепихи, мы показали эффективность углекислотной экстракции, максимальной АО-активностью обладает сухой концентрат, обогащенный тритерпеновыми кислотами урсанового и олеананового ряда, востребованными для БАД с гиполипидемическим и противосклеротическим действием, и косметики с противовоспалительной и противовозрастной активностью [5].

Материалы и методы.

Антиоксидантная активность изучалась в соответствии с методиками, применяемыми для исследования объектов растительного происхождения [1,4,5] на модельной реакции радикального инициированного окисления кумола при 60⁰С, инициатор - азо-бис-изобутиронитрил (АИБН), скорость инициирования - $w_i=6.8 \cdot 10^{-8}$ л/моль·с. Метод микрокалориметрии (МК) относится к кинетическим методам и основан на регистрации теплоты модельной реакции инициированного окисления кумола в присутствии синтезированных или природных ингибирующих добавок. Измерения проведены на микрокалориметре, произведенным в ИХН СО РАН по оригинальной конструкции. Определив период индукции модельной реакции окисления кумола в присутствии исследуемого объекта, и можно вычислить количество антиоксидантов по формуле:

$$[AO]_0 = \frac{w_i \cdot \tau_0}{f} \quad (1)$$

где f -коэффициент ингибирования; $[AO]_0$ - начальная концентрация антиоксидантов; w_i - начальная скорость инициирования; τ_0 – период индукции модельной реакции.

Объекты исследования. В настоящей работе тестировались масла, масляные экстракты, углекислотные экстракты, масла косметические с добавкой эфирных масел. Масла предоставлены производителями, куплены в аптечных сетях или изготовлены в процессе работы. Докритическая углекислотная экстракция проведена на оборудовании, спроектированном и изготовленном ИП Колесниченко Е.А. (г. Томск). Рабочее давление в установке, при различной плотности сырья, регулируется от 5,8 до 6,8 МПа. Температура углекислоты, при циркуляционном непрерывном процессе внутри установки, составляет 21-24 градуса, время экстракции может варьироваться от 2,5 часов до 96 часов.

Результаты и их обсуждение

В таблице 1 приведены результаты определения антиоксидантной активности масел, экстрактов. Экстракция маслом (сырье заливается маслом и несколько дней выдерживается при небольшой температуре), незначительно извлекает биологически активные вещества. Одна из причин неэффективности заключается в окислении масла-основы, особенно это проявляется в экстракции свежесобранной травы, как показывают данные таблицы 1, на примере экстракта зверобоя, содержание АО убывает в два раза. Свежая трава содержит влагу, ферменты липазы, что на свету, при доступе кислорода увеличивает гидролитическое окисление.

Исследовали несколько образцов репейного масла от трех разных производителей. ООО ПКП "Лазурин" производит репейное масло способом экстракции корней лопуха подсолнечным

маслом, течении 3-4 суток, при температуре 45-60 °С. Интересная закономерность обнаружена - чем больше емкость для экстракции, тем больше выход экстрактивных веществ корня лопуха, концентрация АО увеличивается с 1,45 до $1,57 \cdot 10^{-3}$ моль/кг, что эквивалентно ТФ 62 мг% (основа) до 68 мг% (экстракт). ООО «БИОЛИТ» производит масло также экстракцией корней лопуха, и это по нашим данным более эффективно, чем добавка CO₂ экстракта корней лопуха, возможно из-за низкого процента ввода.

Если для производства косметического масла использует минеральное масло, то количество АО будет низким, так, например, в косметическом масле зверобоя (ООО НПФ «МЕДИКОМЕД») АО= $1,1 \cdot 10^{-3}$ моль/кг. А вот при выборе в качестве базового масло семян рыжика ярового (*Camelina sativa*), изначально имеем богатую антиоксидантом-токоферолом основу, и заметим, что добавки эфирных масел АО-статус не меняют, а вот экстракция вместо корней семян лопуха значительно повышает активность готового продукта (табл. 1).

Выход CO₂-липидной фракции из сухой травы или ягод может составлять от доли процентов до нескольких процентов, поэтому нами показано, что для увеличения эффективности выхода липидной фракции рекомендуется со-экстракция растительного сырья со жмыхами масличных культур. На примере со-экстракции углекислотой рапса и калины, рапса и жмыха облепихи показано, что выход биологически-активных веществ увеличивается в два раза, по сравнению с экстракцией чистого жмыха облепихи. Максимальную активность показали масла и экстракты, полученные метилтретбутиловым (МТБЭ) и диэтиловым (ДЭЭ) эфирами, количество антиоксидантов многократно превышает значения для других объектов, особенно в экстрактах ягод, по причине синергизма токоферолов и тритерпеновых кислот урсанового и олеананового ряда.

Таблица 1.

Содержание антиоксидантов в маслах и экстрактах.

Объект исследования, производитель	Способ получения, состав		[АО] 10 ⁻³ моль/кг	Эквив. ТФ, мг%
Масла и масляные экстракты				
Подсолнечное масло, исходное для экстракции	Масло подсолнечное, раф., дезодорированное		1,56	67
Масло репейное ООО «БИОЛИТ», г. Томск	Экстракция корней лопуха подсолнечном маслом		1,78	77
Масло репейное, с добавкой CO ₂ экстракта корня лопуха.	Масло подсолнечное, раф., дезод., CO ₂ экстракт лопуха.		1,56	67
Экстракт масляный облепихи. ООО «БИОЛИТ», г. Томск.	Экстракция ягод облепихи подсолнечном маслом		1,28	55
Масло репейное, экстракция корней лопуха, ООО ПКП "Лазурин", г. Новосибирск	Масло подсолнечное, рафинированное, основа		1,41	62
	Репейное масло, емкость 100 л		1,45	63
	Репейное масло, емкость 400 л		1,57	68
Масло зверобой косметическое ООО НПФ «МЕДИКОМЕД»	Натуральное косметическое масло зверобоя		1,1	45
Масла на основе масла семян рыжика ярового (<i>Camelina sativa</i>)				
Масло рыжиковое. ООО ПКП «Провансаль», г. Томск	Масло рыжиковое раф., дез., основа для экстракции. АО 0.5% Controx AP 10		2,06	90-100
Масло рыжиковое раф., дез. с добавками эфирных масел.	Масло рыжиковое раф., дез., масла эфирные масла чайного дерева, лаванды розмарина		2,20	95

Исходное для экстракции масло рыжиковое нерафинированное	Масло рыжиковое нерафинированное		2,60	105-117
Экстракт семян лопуха на нерафинированном рыжиковом масле	Экстракт семян лопуха на нерафинированном рыжиковом масле		3,20	140
Экстракт зверобоя на рыжиковом масле	Экстракция маслом свежесобранной, перетертой травы		1,1	44
Масло рыжиковое с углекислотным экстрактом жмыха клюквы 2%	Масло из семян рыжика, раф., дез., СО-2 экстракт жмыха брусники 2%		9,5	410
Масло с углекислотным экстрактом жмыха брусники 2%	Масло из семян рыжика, раф., дез., СО-2 экстракт жмыха брусники 2%		3,2	140
Углекислотные экстракты				
Докритическая углекислотная экстракция боярышника ИП Колесниченко Е.А., г. Томск	Липидная фракция углекислотного экстракта		2,7	120
Докритическая углекислотная экстракция калины и рапса ИП Колесниченко Е.А., г. Томск	Липидная фракция углекислотного экстракта		4,1	180
Сверхкритическая флюидная экстракция брусника, ягода (ООО НИЦ ГОРО)	Липидная фракция углекислотного экстракта		44,6	1900
Сверхкритическая флюидная экстракция клюква, ягода СО2 (ООО НИЦ ГОРО)	Липидная фракция углекислотного экстракта		12,5	530
ИП Колесниченко Е.А. СО2 экстракт жмыха облепихи СО2 экстракт жмыха облепихи и рапса	Липидная фракция экстракта		5,9	254
	Липидная фракция экстракта		12,1	520
Сухие и углеводородные экстракты				
Масло амаранта сорт Чергинский	Экстракция ДЭЭ семян амаранта		6,3	270
Масло амаранта сорт Кизлярец	Экстракция ДЭЭ семян амаранта		3,4	145
Экстракт шрота клюквы	Экстракция шрота МТБЭ		140	6100
Экстракт шрота брусника	Экстракция шрота МТБЭ		84	3600
Экстракт шрота черники	Экстракция шрота МТБЭ		18,5	860
Сухой экстракт облепихи, обогащенный тритерпеновыми кислотами урсанового и олеананового ряда	Экстракция шрота МТБЭ, сушка		55	2400

Выводы. Установлено, что количество антиоксидантов зависит от исходного сырья и способа экстрагирования. Концентрация антиоксидантов, состоящих из комплекса токоферолов,

каротиноидов, тритерпеноидов, липофильных кислот, флавоноидов и др. соединений является хорошим критерием качества и биологической активности экстрактов. Масляная экстракция не эффективно экстрагирует БАВ, при использовании свежесобранного сырья процесс окисления масла-основы сильно ускоряется. Органические растворители максимально активно выделяют АО, но применяются чаще в лабораторной практике. Показано, что CO₂ экстракция является эффективным и экологически чистым способом выделения биологически-активных веществ растительного и животного происхождения. Выход липидной фракции из сухой травы или ягод может составлять от доли процентов до нескольких процентов, поэтому для увеличения эффективности выхода липидной фракции рекомендуется со-экстракция растительного сырья со жмыхами масличных культур. На примере со-экстракции углекислотой рапса и жмыха облепихи показано, что выход биологически-активных веществ увеличивается в два раза, по сравнению с экстракцией жмыха облепихи. Применяемая в работе методика оценки качества экстрактов по содержанию и активности липидных АО позволяет выбрать эффективную технологию переработки растительного сырья.

Благодарности. Исследование выполнено в рамках Государственного задания ФГБУН Института химии нефти СО РАН, финансируемого Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, проект FWRN-2021-0003.

Библиографический список

1. Сизова Н.В. Оценка эффективности экстракции растительного сырья по содержанию липидных антиоксидантов. Материалы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине». Новосибирск, 1-4 октября, 2013 г. Стр.107-109.
2. Кузьмина Т.Д. Влияние способов экстракции на антиоксидантную активность вытяжек ряда ароматических трав, возделываемых в Литве (Нидерланды). Пищевая и перерабатывающая промышленность. 2000. №3. С.975.
3. Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты. Успехи химии. 1985, т.LIV, вып.9, с.1540-1558.
4. Sizova Natalia V. Content of Tocopherols as a Criterion of Natural Fatty Oil Quality. Book of Abstracts 2 Annual Russian-Korean Conference “Current issues of natural products chemistry and biotechnology -2012.-September 18-21 -Novosibirsk— Russia. – P. 150
5. Сизова Н.В. Определение биологической активности облепиховых масел и экстрактов методом микрокалориметрии по выходу липидных антиоксидантов Химия растительного сырья. 2020. №2. С. 223-230.
6. Патент РФ № 2414234. Способ получения средства, обладающего гипохолестеринимическим и гиполипидемическим действием, из шрота клюквы. Колесникова И.В., Митасов М.М., Оганесян Э.Т., Попов С.А., Терехов А.Ю., Шевцов С.А., Щукин Г.И. БИ №8, 2011.

УДК- 57.085.23

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНЫХ И СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР МАЧКА ЖЕЛТОГО КАК ИСТОЧНИКА ГЛАУЦИНА

Р.Г. Тухбатуллина, Л.И. Мотыгуллина

Институт фармации, Казанский государственный медицинский университет, Казань, Российская Федерация

Аннотация. Многолетнее травянистое растение мачок жёлтый (*Glaucium flavum*) является важным источником алкалоида глауцина, который используется в фармацевтике. Однако его распространение ограничивает доступность сырья для производства. Мы предлагаем использовать биотехнологии для создания каллусных и суспензионных культур мачка жёлтого, которые являются источником получения алкалоида глауцина. В настоящее время производится культивирование мачка жёлтого на плантациях в некоторых регионах страны, например, в Крыму. Однако этот метод очень затратный, требует большого количества площадей и применение ручного труда. В работе описаны этапы получения каллусных и суспензионных культур мачка желтого в качестве источника глауцина.

Ключевые слова: мачок желтый, каллусные и суспензионные культуры, технология культивирования *in vitro*, глауцин.

PRODUCTION OF CALLUS AND SUSPENSION CULTURES OF YELLOW HORN POPPY AS A SOURCE OF GLAUCIN

R.G. Tuhbatullina, L.I. Motygullina

Institute of Pharmacy, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation

The perennial herbaceous plant yellow horn poppy (*Glaucium flavum*) is an important source of the alkaloid glaucin, which is used in pharmaceuticals. However, its distribution limits the availability of raw materials for production. We propose to use biotechnologies to create callus and suspension cultures of yellow horn poppy, which are the source of the glaucin alkaloid. Currently, the cultivation of yellow horn poppy is carried out on plantations in some regions of the country, for example, in the Crimea. However, this method is very expensive, requires a large amount of space and the use of manual labor. The work describes the stages of obtaining callus and suspension cultures of yellow horn poppy as a source of glaucin.

Keywords: yellow horn poppy, callus and suspension cultures, *in vitro* cultivation technology, glaucin.

Введение. Рынок противокашлевых лекарств постоянно расширяется, но исследования по созданию новых активных компонентов из лекарственных растений никогда не теряют своей актуальности. Одно из таких растений, положительно влияющих на лечение заболеваний дыхательных путей, — это мачок жёлтый (*Glaucium flavum*) [5,6,10]. В надземной части растения присутствуют изохинолиновые алкалоиды (до 3–4%), где преобладает глауцин (примерно 1,8–2,0%) [4,8,9]. Глауцин обладает мощным противокашлевым действием и превосходит по спектру активности кодеин. Однако, у глауцина есть ряд преимуществ перед другими противокашлевыми препаратами, включая кодеин. Глауцин не угнетает дыхательный центр, не влияет на моторику кишечника и не вызывает привыкания.

Помимо противокашлевого действия, глауцин обладает противовоспалительным, анальгетическим, гипотензивным, спазмолитическим и адrenomолитическим эффектами. Он может применяться при различных заболеваниях верхних дыхательных путей, бронхов, лёгких, плеврите, коклюше, бронхиальной астме, туберкулёзе и раке лёгких. Эти свойства подтверждены экспериментальными и клиническими исследованиями [7].

Препараты из сырья мачка жёлтого не производятся в России, их изготавливают только за границей: «Глаувент», «Бронхоцин», «Бронхолитин» (глауцина гидробромид) из Болгарии, «Глауцина фосфат» из Македонии. Однако эти лекарства созданы на основе глауцина, который получен синтетическим и полусинтетическим путём. Биотехнологический метод получения глауцина из суспензионной культуры имеет следующие преимущества: он требует меньше места для выращивания растений, сокращает затраты на поддержание их роста и ручной труд по уходу за плантациями, а также не зависит от климатических условий. Инновационная технология предполагает превращение каллусных культур в биореакторах в суспензионные культуры мачка жёлтого, которые станут сырьём для производства глауцина. Использование растительных культур и тканей — перспективный подход для получения биологически активных веществ, включая лекарственные препараты. Преимущества биотехнологического производства глауцина включают получение экологически чистого сырья, экономическую эффективность и возможность сохранения разнообразия растительной флоры [1,2,3]. Культура клеток и тканей растений мачка жёлтого *in vitro* представляет собой инновационный метод получения глауцина с помощью биотехнологии, недостаточно описанный в научных публикациях. Основная цель исследования заключалась во введении растения мачка жёлтого в культуру *in vitro* для потенциального использования в качестве источника ценных соединений.

Методика. Для лабораторного эксперимента были использованы семена мачка жёлтого, выращенного в ботаническом саду Казанского государственного медицинского университета, на территории Республики Татарстан. Для работы был отобран эксплант – семя, разработаны среды для проращивания семян, гармонизированные питательные среды для получения каллусной и суспензионной культур, разработан способ стерилизации экспланта.

Обсуждение результатов. Для получения глауцина биотехнологическим способом, мы впервые создали технологию производства каллусной и суспензионной культур мачка жёлтого с содержанием глауцина. Каллусные культуры, используемые в биотехнологии для производства вторичных соединений, должны отличаться быстрым ростом и способностью синтезировать необходимое количество целевого продукта [11].

Для получения каллусной культуры необходимо было выбрать первоначальный эксплант. Ввиду климатических условий, использовать зеленые части растения круглый год не предоставлялось возможным. С учетом этого, были выбраны семена растения *Glaucium flavum*, выращенные на территории ботанического сада Казанского государственного медицинского университета в фенофазах «конец цветения, начало плодоношения».

Далее семена необходимо было простерилизовать. Для стерилизации экспланта использовался раствор антибактериального мыла в стерильной дистиллированной воде в разных пропорциях (3:30, 4:30, 3:40 и 4:40 мл). В качестве антибактериального мыла применялось мыло «Защитное», рекомендованное для мытья рук и обладающее антибактериальным эффектом. Мыло состоит из воды, лаурилсульфата натрия, хлорида натрия, кокамидопропилбетаина, глицерет-2 кокоата, триклозана, масла чайного дерева, декспантенола, глицерина, динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты, лимонной кислоты, метилхлоризотиазолинона, отдушки, гексилкоричного альдегида и красителя «Бриллиантовый синий» (E113, CI42090).

Двадцать семян помещались в химический стакан, заливались водой и добавлялись капли антибактериального мыла в указанных пропорциях. Затем использовались магнитные мешалки для перемешивания в течение 10–15 минут при скорости 300 оборотов в минуту. Соотношение объёма воды и количества капель мыла было определено опытным путём.

На следующем этапе стерильный раствор выливался на металлическое сито и семена трижды промывались стерильной дистиллированной водой. Затем семена снова помещались в стерильный химический стакан, туда добавлялся 30–40 мл стерильной дистиллированной воды, и устанавливались две магнитные мешалки размером 3 × 10. Стакан ставился на магнитную мешалку с частотой вращения 300 оборотов в минуту, и перемешивание продолжалось в течение 5 минут. По истечении этого времени вода сливалась, и семена были готовы для посева на питательную среду [13].

Сначала стерильные семена были помещены на твёрдую питательную среду без гормонов, состоящую из следующих компонентов (мг/л): вода — 1000 мл, агар-агар — 6500. На четвёртый

день семена начали трескаться, а на седьмой появились всходы. Зелёные ростки появились на 12–15 день, и их было 80–83 % от общего числа посаженных семян.

Далее полученные проростки продолжали выращивать на следующей питательной среде (мг/л): вода — 1000 мл, NH_4NO_3 — 825, KNO_3 — 950, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 220, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 185, KH_2PO_4 — 85, KI — 0,415, H_3BO_3 — 3,1, $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ — 11,15, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 4,3, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,125, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,0125, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,0125, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 13,9, Na-ЭДТА (трилон Б) — 18,65, мезоинозит — 100, тиамин — 0,5, пиридоксин — 0,5, никотиновая кислота — 0,5, сахароза — 15000, агар — 6500.

Проростки выращивались при температуре 24 ± 1 °C с фотопериодом 16/8 часов (свет/темнота). Их выращивание продолжалось до третьего-пятого настоящих листьев в течение трёх недель. Затем из полученных проростков были получены листовые экспланты, которые разрезались на мелкие кусочки и помещались в питательную среду с добавлением альфа-нафтилуксусной кислоты (НУК) и 6-бензиламинопурина (БАП).

На питательной среде с добавлением фитогормонов (НУК — 1 мг/л и БАП — 0,5 мг/л) наблюдалось интенсивное образование каллуса. Формирование каллуса начиналось на 14–18 день после посадки эксплантов (разрезанных растений) и заметно увеличивалось на 27 день.

33 листовых экспланта были размещены на 3 чашках Петри с этой средой. Каллус образовался у 21 экспланта (63,6%). Образованный каллус был разделён на мелкие части и повторно высажен на ту же среду 5 раз. В результате из 21 экспланта было получено 21 каллусов (100%).

В процессе пятинедельного субкультивирования появились новые экземпляры каллуса. Эксперименты показали, что более качественный каллус образовывался при многократном субкультивировании и увеличивал свою массу.

Каллус выращивали в темноте при температуре 24 ± 1 °C и влажности $70 \pm 5\%$ в чашках Петри диаметром 90 мм с циклом субкультивирования 5 недель. Изначально полученный каллус имел плотную оформленную тёмную коричнево-серую окраску. После субкультивирования каллусы приобрели разнообразную окраску и становились рыхлыми [14].

Для получения первичной суспензионной культуры мачка жёлтого, использовали рыхлую каллусную культуру мачка жёлтого и жидкую питательную среду того же состава, на которой была получена каллусная ткань (без добавления агар-агара).

Сравнительный анализ алкалоидного состава каллусной культуры и травы мачка жёлтого проводился методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах «Сорбфил-ПТСХАФ-А-УФ» совместно с сотрудниками кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии Самарского государственного медицинского университета [12]. В качестве растворителей использовалась смесь *n*-бутанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 4:1:2. Разделение веществ проводилось с помощью ультрафиолетового света при длинах волн 366 и 254 нм с последующим проявлением реактивом Драгендорфа. Также применялся метод УФ-спектрофотометрии.

Экстракция образцов биомассы и травы мачка жёлтого проводилась 70% этиловым спиртом в соотношении 1:10 на кипящей водяной бане. Стандартными образцами служили изохинолиновые алкалоиды, включая берберин, сангвиритрин и глауцина гидрохлорид, полученный из травы мачка жёлтого с помощью колоночной хроматографии.

Люминесцентный анализ культуры ткани мачка выявил слабое жёлтое и яркое жёлто-зелёное свечение при длинах волн 420 и 360 нм, связанных с присутствием алкалоидов изохинолиновой природы. Этот тип свечения наблюдался на поперечных срезах разных органов мачка жёлтого. В некоторых образцах культуры ткани мачка жёлтого свечение отсутствовало при длинах волн 420 и 360 нм, что указывает на низкое содержание алкалоидов в тканях.

ТСХ-анализ показал наличие изохинолиновых алкалоидов, включая глауцин, в каллусных культурах и траве мачка жёлтого. Результаты исследования водно-спиртовых экстрактов методом ТСХ указывают на возможное присутствие протоалкалоидов, кроме глауцина, в биомассе мачка жёлтого. Берберин, хелелитрин и сангвинарин не были обнаружены ни в биомассе, ни в траве мачка жёлтого [12].

Заключение. Таким образом нами были выращены объекты растения *Glaucium flavum in vitro* и получены каллусные и суспензионные культуры мачка жёлтого, а также проанализированы образцы полученных культур на предмет нахождения в них алкалоида глауцина.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке НИР Фонда содействия инновациям <https://www.fasie.ru/>

Библиографический список

1. Badea C., Basu SK. Impact of drought on plant proteome and metabolome. In: Proceedings of the UGC State Level Seminar on Emerging Trends in Contemporary Education: Implications for 21st Century; 2010 Apr 9; Howrah, India. p. 104–20.
2. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Plant cell cultures. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp. Cell Res.* 1968. V. 50. P. 151–158.
3. George E.F., Hall M.A., De Klerk G.-J. The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients // *Plant Propagation by Tissue Culture*, V. 1. Springer. 2008. P. 65–113.
4. Jimenez V. M. (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones, *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 13(2), 196–223.
5. Murashige Y., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473–497.
6. Peled B., Waisel Y., Carmeli S. Alkaloid content in various chemocotypes of *Glaucium flavum* from Israel // *Phytochemistry.* 1988. V. 27 (4). P. 1021–1034.
7. Scholar E. Glaucine // *The Comprehensive Pharmacology Reference*, 2007N3, P.1-4.
8. Yang J. L., B. Zhao, E. S. Seong, M. J. Kim, W. H. Kang et al (2010) Callus induction and high-efficiency plant regeneration via somatic embryogenesis in *Papaver nudicaule* L. an ornamental medicinal plant, *Plant Biotechnol. Rep.*, 4(4), 261–267.
9. Мотыгуллина, Л. И. *Glaucium flavum* (Papaveraceae) — компонентный состав и биологическая активность (обзор) / Л. И. Мотыгуллина, Р. Г. Тухбатуллина // *Современные проблемы естественных наук и медицины: С568 сборник статей Всероссийской научной конференции с международным участием (Йошкар-Ола, 17–21 мая 2021 г.)* / Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет»; под редакцией: О. Л. Воскресенской, А. Е. Алябышевой. — ЙошкарОла : Марийский гос. ун-т, 2021. — Вып. 10. — С. 388-395.
10. Рожанец В.В. Мачок желтый (*Glaucium flavum*) // *Наркология.* 2004. №5. С. 69–72.
11. Абделаиз В.М.А., Костюкова Ю.А., Хуснетдинова Л.З. и др. Гистологический анализ каллусной культуры белены египетской (*Hyoscyamus muticus* L.). *Цитология.* 2019; 61(7): 571–579.
12. Куркин В.А., Куркина А.В., Трифонова П.В., Тухбатуллина Р.Г., Мотыгуллина Л.И. Сравнительное хроматографическое и спектральное исследование алкалоидного состава биомассы культуры ткани и травы мачка жёлтого. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2024;27(3):16–22. <https://doi.org/10.29296/25877313-2024-03-03>
13. Тухбатуллина Р.Г. Мотыгуллина Л.И. Патент на изобретение № 2773121. Способ получения стерильных проростков семян мачка желтого. Оpubл. 30.05.2022.
14. Тухбатуллина Р.Г., Мотыгуллина Л.И. Патент на изобретение № 2792813. Способ получения каллусной культуры мачка жёлтого (*Glaucium flavum* Grantz) в условиях *in vitro*. Оpubл. 24.03.2023 г.

УДК 631.53.01+58.085

ВЫРАЩИВАНИЕ СЕЛЕКЦИОННОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ГИБРИДОВ БЕЛЫХ ТОПОЛЕЙ НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ *IN VITRO*

Е.А. Шабанова, Е.Ю. Панова

ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии», г. Воронеж, Россия

Представлены результаты микроразмножения и адаптации к почвенным условиям четырех гибридов белых тополей. Опытная партия микрорастений прошла двухэтапную адаптацию к условиям *ex vitro* в лаборатории и в теплице. Через год после высадки в теплицу сохранность растений составила 92-97%. Лучший рост побегов отмечен у линий гибрида тополя белого и осины 1/03с и тополя белого Е/с.

Ключевые слова: клональное микроразмножение, тополь белый, *in vitro*, *ex vitro*, посадочный материал

Тополь (*Populus L.*) относится к древесным породам, характеризующимся быстрым ростом, скороспелостью, экологической пластичностью. Применение культуры ткани *in vitro* ускоряет процесс селекции и позволяет в короткие сроки размножать необходимые генотипы. Внедрение результатов биотехнологии в практику лесного хозяйства обеспечит надежное воспроизводство ценного генофонда, позволит повысить качество посадочного материала, продуктивность и устойчивость создаваемых насаждений к неблагоприятным условиям среды [2].

В ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех» создана и поддерживается в длительной культуре (более 30 лет) коллекция *in vitro* ценных генотипов (продуктивных, быстрорастущих, устойчивых и др.) листовых древесных растений, которая также является основой для выращивания элитного (сортового) посадочного материала. На основе методов клеточной и тканевой селекции разрабатываются технологии получения солеустойчивых древесных растений. Получены новые солеустойчивые линии различных видов березы и тополя. Ведутся исследования по оценке линий тополя, полученных с применением культуры изолированных пыльников *in vitro* [3, 7].

Целью данного исследования является оценка сохранности и роста новых линий гибридов тополя селекции ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех» в условиях *in vitro* и *ex vitro*.

В исследованиях по получению опытной партии посадочного материала тополя *in vitro* использовались линии клонов, полученные методом тканевой селекции в условиях *in vitro* с применением 1% NaCl (1/03с (*Populus. alba L. × P. tremula L.*), Е/с (*Populus. alba L.*), Тг/с (*Populus. alba L.*) или регенерацией из каллуса пыльничкового происхождения №26/10а (*Populus alba L. × P. bolleana Lauche*) [3, 5, 7, 9]. Исходные деревья характеризуются быстрым ростом, продуктивностью, засухоустойчивостью [6, 8]. Микрорастения хранились в Коллекции клонов *in vitro* ценных генотипов листовых древесных растений ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех» на безгормональных питательных средах ½ WPM (Woody Plant Medium) или ½ WPM с добавлением 1,5% активированного угля при частоте субкультивирования 1 раз в 5-6 месяцев. Для тиражирования переходили на более частое субкультивирование – 1 раз в 1,5-2 месяца на средах ½ WPM или ½ WPM с добавлением 1% активированного угля [1, 4].

Для адаптации к почвенным условиям отбирались микрорастения с нормальной морфологией, хорошо выраженными междоузлиями и развитой корневой системой. Всего отобрано около 80 микрорастений тополя для адаптации к условиям грунта в лабораторных условиях. Применялась двухэтапная адаптация: на первом этапе микрорастения высаживались в пластиковые контейнеры с грунтом на основе верхового торфа, и содержались в лабораторных условиях при комнатной температуре, освещенности 1,5-2 клк. В течение первых двух недель микрорастения укрывали для поддержания высокой влажности (70-90 %). Через 10-14 дней укрытие снимали, постепенно переходя на более редкий полив. Изучаемые линии имеют

спонтанное укоренение (90-95%), высокую сохранность *in vitro* (85,0-93,3%), фактический коэффициент размножения за 2-месячный цикл размножения на безгормональной среде ½ WPM составляет от 4,5 до 7,0 (таблица 1). Средняя длина побега микрорастений опытной партии варьировала от 4 до 7 см, в среднем составила 5,7 см.

Таблица 1

Биотехнологические показатели микрорастений тополя опытной партии

Клон (линия)	Укореняемость микрочеренков, %	Сохранность <i>in vitro</i> , %	Длина побега, см	Коэффициент размножения
26/10а	90	85	5,4	4,5
1/03с	95	90	6,7	7,0
Е/с	95	90	5,5	7,0
Тг/с	95	93	5,2	6,5

В процессе адаптации в лабораторных условиях в условиях грунта прижилось от 85,7 до 96% микрорастений тополя, в среднем приживаемость составила 93,2%. За 1,5 месяца адаптации в лабораторных условиях в среднем прирост побега составил 8,7 см по сравнению с изначально высаживаемыми стерильными растениями.

После адаптации в лаборатории регенеранты высаживали в поликарбонатную летнюю теплицу. Пересадка производилась в конце июля-начале августа, что считается неоптимальным сроком для успешной адаптации микрорастений. Приживаемость регенерантов тополя, зарегистрированная в сентябре спустя 1,5 месяца адаптации в теплице, в среднем составила 98,5%. Длина побега варьировала от 13 до 22 см, в среднем составила 17,6 см (таблица 2).

К июню 2024 года сохранность растений составила 92-97% в зависимости от клона. Средняя длина побега – 42,1 см. Темпы роста анализируемых клонов тополя демонстрируют возможность получения стандартного посадочного материала к осенней посадке в сентябре-октябре 2024 г.

Таблица 2

Рост регенерантов клонов тополя в процессе адаптации к условиям *ex vitro*

№ клона	Вид (гибрид)	Длина побега <i>in vitro</i>	Длина побега после адаптации в контейнере (июль 2023)	Длина побега после адаптации в теплице (сентябрь 2023)	Длина побега после адаптации в теплице (июнь 2024)
26/10	<i>Populus alba</i> L. × <i>P. bolleana</i> Lauche	5,3±0,40	11,0±0,89	14,5±0,55	35,5±1,52
1/03с	<i>Populus. alba</i> L. × <i>P. tremula</i> L.	6,5±0,10	15,8±0,50	18,4±0,50	46,9±1,91
Е/с	<i>Populus alba</i> L.	5,3±0,19	15,2±0,54	18,5±0,56	44,1±1,99
Тг/с		5,7±0,14	15,5±0,58	19,1±0,55	42,1±1,77
Среднее		5,7±0,28	14,4±1,13	17,6±1,05	42,1±2,44

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального агентства лесного хозяйства. Рег. № НИОКТР 123040400004-8.

Библиографический список

- Lloyd G., McCown D. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use shoot tip culture // Plant Ptopagators Soc.Comb. Proc, 1980 – P. 421-427.
- Mashkina O. S. Amineva E. Yu. Assessment of the Ecological and Genetic Potential of Poplar Mixoploids in Voronezh Oblast // Contemporary Problems of Ecology. – 2023. – Vol. 16, No. 5. – P. 600-611.

3. Аминова Е. Ю., Табацкая Т. М., Машкина О. С. Оценка солеустойчивости *Populus L.* в условиях моделируемого стресса *in vitro* // Субтропическое и декоративное садоводство. – 2021. – № 79. – С. 60-66.
4. Корчагин О.М. Табацкая Т.М., Машкина О.С. Сохранение лесных генетических ресурсов на основе коллекции *in vitro*: состояние, перспективы, проблемы (аналитический обзор) // Лесохозяйственная информация. – 2023. – № 2. – С. 75-90.
5. Машкина О.С. Формирование диплоидной пыльцы у тополя под действием повышенной температуры // Известия АН СССР. — 1992. — №1. — С.66–78.
6. Машкина О.С., Табацкая Т.М. Опытные плантационные культуры лиственных древесных растений, созданные на основе клонального микроразмножения // Размножение лесных растений в культуре *in vitro* как основа плантационного лесовыращивания. – Йошкар-Ола, ПГТУ. – 2014. – С.87-93.
7. Табацкая Т.М., Машкина О.С., Шабанова Е.А., Гродецкая Т.А., Кондратьева А.М., Федулова Т.П. Хромосомный и микросателлитный анализ регенерантов тополя, полученных в культуре изолированных пыльников *in vitro* // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2021. – № 3. – С. 49-58.
8. Царев А.П., Царева Р.П., Царев В.А., Евлаков П.М. Гибридизация тополей. – Воронеж : Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова, 2021. – 289 с.
9. Шабанова Е.А., Внукова Н.И., Машкина О.С. Влияние модификаций состава питательных сред на эффективность длительного хранения *in vitro* клонов тополя и осины // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2020. – № 1. – С. 42-49.

УДК 571.27:632.4:632.938:633.11

ВЛИЯНИЕ НАНОКОМПОЗИТОВ ХИТОЗАН - СЕРЕБРО НА ЗАЩИТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ *SOLANUM TUBEROSUM*

Л.Г. Яруллина*¹, Е.А. Заикина¹, Г.Ф. Бурханова¹, Е.А. Черепанова¹, А.В. Сорокань¹, В.О. Цветков², И.С. Марданишин³, И.Я. Фаткуллин¹, Ж.Н. Калацкая⁴, К.С. Гилевская⁵

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, 450054 Россия, Уфа, Проспект Октября, 71, *e-mail: evisheva@yandex.ru

²Уфимский университет науки и технологий, 450076 Россия, Уфа, ул. Заки Валиди, 32

³Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства УФИЦ РАН, 450059 Россия, Уфа, ул. Рихарда Зорге, 19

⁴Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, 220072 Беларусь, Минск, ул. Академическая, 27

⁵Институт химии новых материалов НАН Беларуси, 220141 Беларусь, Минск, ул. Ф. Скорины 36

Исследовали влияние новых наноконкомпозитов на основе серебросодержащего хитозана с массовым соотношением хитозан-серебро 100:1 (ХитAg 100:1) и 50:1 (ХитAg 50:1), на устойчивость картофеля к инфицированию возбудителем фитофтороза *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary и недостатку влаги в почве. Выявлено, что обработка наноконкомпозитом ХитAg 100:1 приводила к снижению степени проявления симптомов фитофтороза на листьях растений до 40% по сравнению с 95% в контроле, увеличивала в них содержание белка и активность антиоксидантных ферментов (каталазы и пероксидазы) при недостатке влаги. Вероятно, увеличение массового содержания хитозана в составе наноконкомпозита ХитAg способствует повышению иммуностимулирующих свойств на растения.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, наноконкомпозиты, хитозан, серебро, пероксид водорода, антиоксидантные ферменты, индуцированная устойчивость.

INFLUENCE OF CHITOSAN - SILVER NANOCOMPOSITES ON PROTECTIVE MECHANISMS OF *SOLANUM TUBEROSUM*

L. Yarullina¹, E. Zaikina¹, G. Burkhanova¹, E. Cherepanova¹, A. Sorokan¹, V. Tsvetkov², I. Mardanshin³, I. Fatkullin¹, J. Kalatskaya⁴, K. Gilevskaya⁵

¹Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, 450054 Russia, Ufa, Prospekt Oktyabrya st., 71

²Ufa University of Science and Technology, 450074 Russia, Ufa, Z. Validi st., 32

³Bashkir Research Institute of Agriculture, 450059 Russia, Ufa, Zorge st., 19

⁴Institute of Experimental Botany named after V.F. Kuprevich, 220072 Belarus, Minsk, Akademicheskaya st., 27

⁵Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, 220141 Belarus, Minsk, F. Skorina st., 36

We investigated the effect of new nanocomposites based on silver-containing chitosan with a chitosan-silver mass ratio of 100:1 (ChitAg 100:1) and 50:1 (ChitAg 50:1) on the resistance of potatoes to infection by the late blight pathogen *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and lack of moisture in the soil. It was revealed that treatment with the nanocomposite ChitAg 100:1 led to a decrease in the degree of manifestation of late blight symptoms on plant leaves by up to 40% compared to 95% in the control, and increased their protein content and the activity of antioxidant enzymes (catalase and

peroxidase) under conditions of lack of moisture. Probably, an increase in the mass content of chitosan in the composition of the ChitAg nanocomposite contributes to an increase in the immunostimulating properties of plants.

Keywords: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, nanocomposites, chitosan, Ag, hydrogen peroxide, antioxidant enzymes, induced resistance.

Введение. Хитозан является природным полисахаридом, обладающим большим потенциалом применения в растениеводстве, поскольку может стимулировать рост растений, повышать их иммунный статус и устойчивость к биотическому и абиотическому стрессу [7]. Макромолекулы хитозана состоят из случайно связанных β -(1-4) D-глюкозаминовых звеньев и N-ацетил-D-глюкозамина. Элиситорные свойства хитозана обусловлены как специфическим связыванием остатков N-ацетилглюкозамина с рецепторами на поверхности растительных клеток, так и неспецифическим взаимодействием остатков глюкозамина за счет свободных аминогрупп с внешними и внутренними клеточными компонентами [9]. Биологическая активность хитозана во многом зависит от его молекулярной массы и степени ацетилирования. Модификация хитозана различными биологически активными веществами позволяет создавать новые полимерные материалы с улучшенными свойствами [8].

В настоящее время в связи с бурным развитием нанотехнологий начинают изучаться перспективы использования наночастиц металлов в сельском хозяйстве, среди которых особое внимание привлекают наночастицы серебра (НЧАg) из-за их способности стимулировать рост и урожайность различных сельскохозяйственных культур. Имеются сведения об иммуномодулирующей активности НЧАg, их фунгицидном и ростостимулирующем действии [6]. Влияние НЧАg на ростовые показатели растений определяется их дозировкой, которая может как усиливать, так и подавлять рост. Токсическое действие наночастиц серебра на растения включает снижение общей массы растений и подавление роста корней, уменьшение размеров стебля и побега, прерывание репликации ДНК и влияние на экспрессию генов [2]. Перспективным способом синтеза наночастиц серебра, снижающим их негативное воздействие на физиологические показатели растений, является химическое восстановление катионов Ag^+ полисахаридами. Следует отметить, что синтезируемые таким способом наноконпозиты полисахарид-Ag являются биосовместимыми и могут обладать свойствами, присущими каждому из компонентов, что позволяет говорить о перспективах разработки на их основе нового типа биопестицидов.

Цель работы – изучение влияния композитов хитозана с наночастицами серебра на формирование защитных механизмов у растений картофеля к инфицированию *Phytophthora infestans* и недостатку почвенной влаги.

Методы

Исследования проводили на растениях, выращенных из безвирусных мини клубней картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Удача башкирской селекции, полученных в Башкирском НИИСХ УФИЦ РАН (г. Уфа). Растения выращивали в климатической камере (световой период 16 ч, 20–22°C) спектр -15KP (Россия).

Для искусственного инфицирования изолированных листьев растений использовали зооспоры возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН. Патоген выращивали на картофельном агаре с декстрозой в течение 7 сут после повторного выделения из инфицированных мини-клубней картофеля для восстановления агрессивности патогена. Поверхность колоний изолята *P. infestans* заливали дистиллированной водой и инкубировали при 4 °C в течение 30 мин. Концентрацию спорангиев оценивали с помощью камеры Фукса – Розенталя, суспензию спор разводили до титра 1×10^5 спор/мл.

Наноконпозиты хитозан-Ag (ХитAg) были получены в Институте химии новых материалов НАН Беларуси путем химического восстановления нитрата серебра хитозаном [4]. Для обработки растений использовали коллоидные растворы наноконпозитов с различным содержанием Ag. Наноконпозит №1 (ХитAg I, соотношение хитозан:Ag=100:1) и наноконпозит

№2 (ХитAg II, соотношение хитозан: Ag =50:1). Концентрация хитозана в обоих гидрозолях была одинаковой и составляла 34,0 мг/мл.

Растения выращивали в условиях оптимального полива (80–85 % от влагоемкости почвогрунта) и при недостатке почвенной влаги (40–45% влагоемкости), которую создавали путем сокращения полива. Через 7 суток после обработки растений растворами Хит-Ag в разведении 1: 50 и 1:100, в них оценивали содержание H_2O_2 и пролина, активность каталазы, пероксидазы и степень пораженности изолированных листьев возбудителем фитофтороза *P. infestans*.

Для определения содержания H_2O_2 использовали метод, описанный в работе Jiang с соавт. [5] с модификациями. Концентрацию пероксида водорода определяли по предварительно построенной калибровочной кривой.

Для определения активности каталазы (КФ 1.11.1.6) использовали метод Hadwan и Abed [3] с модификациями. Активность каталазы рассчитывали по формуле: $U = (A_k - A_o) * K / (V * T)$, где A_k и A_o - абсорбция контрольных (содержащих воду вместо образца) и опытных образцов, соответственно, V – объем пробы, 0.1 мл, T – время инкубации, 600 с, K – коэффициент миллимолярного поглощения H_2O_2 , равный $22.2 * 10^3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Активность КАТ выражали в единицах на 1 мг белка.

Для определения активности пероксидазы (КФ 1.11.1.7, ПО) использовали метод Fornera и Walde [1] с модификациями, путем окисления субстрата 20 mM ортофенилендиамина 10 mM H_2O_2 , развитие окраски прекращали 4 н. H_2SO_4 . Оптическую плотность раствора измеряли при 490 нм на приборе Perkin Elmer LS 55 (США). Единица активности фермента соответствовала изменению оптической плотности раствора за 1 мин. Активность ПО выражали в единицах на 1 мг белка. Для определения содержания пролина навеску растений заливали 2.5 мл стерильной дистиллированной воды. Пробирки помещали в водяную баню, которую затем доводили до кипения, после чего пробирки вынимали и охлаждали. Пробирки, содержащие 2 мл холодного образца, 2 мл реагента нингидрина и 2 мл ледяной уксусной кислоты, помещали на водяную баню и кипятили в течение часа, затем охлаждали. Оптическую плотность продуктов реакции измеряли на оборудовании Ep-Spire («Perkin Elmer», США) при длине волны 522 нм. Опыты проводили в пятикратной биологической повторности. На гистограммах показаны выборочные средние, в качестве показателя погрешности показан 95%-ный доверительный интервал. Для оценки достоверности различий выборочных средних проводили дисперсионный анализ и последующий многогранговый тест Дункана в программе Statistica 13 (уровень надежности 95 %).

Результаты и обсуждение

Исследовали устойчивость растений картофеля, обработанных нанокompозитами на основе серебросодержащего хитозана с массовым соотношением хитозан-Ag 100:1 (ХитAg I) и с массовым соотношением хитозан-Ag 50:1 (ХитAg II), использованных для обработки растений в разведениях 1:50 и 1:100, через 45 дней после высадки мини клубней в контейнеры методом искусственного инфицирования изолированных листьев. Было показано, что через 5 суток после инфицирования площадь развития симптомов фитофтороза на листьях обработанных водой растений, растущих в условиях оптимальной увлажнённости, достигала 95-100% от всей листовой пластинки, конъюгатом ХитAg I в разведении 1:50 - чуть более 40% (рис. 1). Действие ХитAg II (разведение 1:100) приводило к меньшему снижению степени проявления симптомов фитофтороза на листьях растений (60-65% листа). Другие варианты не были эффективны.

При анализе содержания пероксида водорода, пролина, активности каталазы и пероксидазы в растениях, растущих в нормальных условиях обеспечения почвенной влагой, было продемонстрировано отсутствие стрессового воздействия исследуемых серебросодержащих нанокompозитов хитозана. В условиях недостатка влаги обработка растений нанокompозитом ХитAg I увеличивала содержание белка и активность антиоксидантных ферментов (каталазы и пероксидазы). Обработка ХитAg I значительно снижала пероксидазную активность в нормальных условиях увлажнения, а в условиях дефицита влаги уровень ее активности значительно превышал все остальные варианты. Обработка композитами ХитAg

способствовали увеличению концентрации пероксида водорода в растениях, как в нормальных условиях, так и при недостатке влаги.

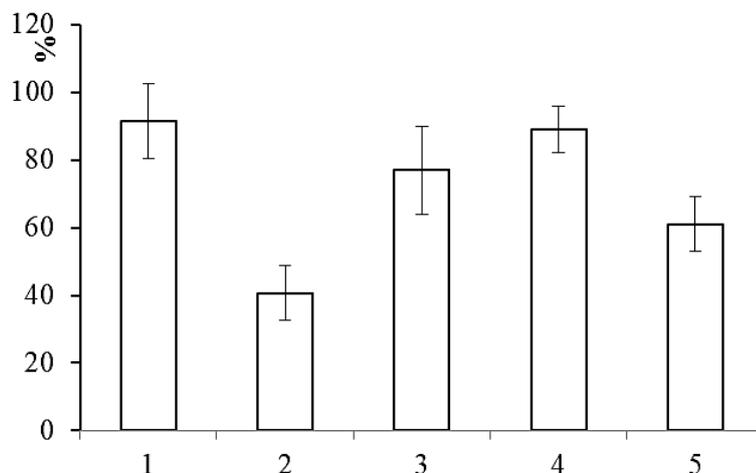


Рис. 1. Симптомы фитофтороза на листьях растений картофеля Удача, обработанных нанокompозитами хитозана с серебром (ХитAg I и ХитAg II) в разведении 50 и 100 раз через 5 суток после искусственного инфицирования *P. infestans*.

1 - контроль, 2 – ХитAg I (1:50), 3 – ХитAg II (1:50), 4 - ХитAg I (1:100), 5 - ХитAg II (1 :50).

Возможно, повышение уровня H_2O_2 было связано со снижением активности каталазы под влиянием обработок ХитAg в исследуемых вариантах. Причем, при обработке растений ХитAg I снижение активности каталазы в условиях засухи было менее значительным, чем при обработке ХитAg II. Полученные данные свидетельствуют о связи между структурой нанокompозита и его биологической активностью: увеличение массового содержания хитозана в составе композита способствует повышению его иммуностимулирующих свойств на растения.

Благодарности. Работа выполнялась при финансовой поддержке гранта РФФ № 23-16-00139

Библиографический список

1. Fornera S, Walde P. Spectrophotometric quantification of horseradish peroxidase with o-phenylenediamine. *Analytical Biochemistry* 2010, 407(2), 293-295. DOI: 10.1016/j.ab.2010.07.034.
2. Geisler-Lee J., Brooks M., Gerfen J.R. et al. Reproductive toxicity and life history study of silver nanoparticle effect, uptake and transport in *Arabidopsis thaliana* // *Nanomaterials*. – 2014. – Vol. 4, № 2. – P. 301-318.
3. Hadwan M.H., Abed H.N. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data in Brief*. 2016, 6, 194-99. DOI: 10.1016/j.dib.2015.12.012.
4. Hileuskaya K.S., Mashkin M.E., Kraskouski A.N. et al. Hydrothermal Synthesis and Properties of Chitosan–Silver Nanocomposites // *Russian Journal of Inorganic Chemistry*. – 2021. – Vol. 66. – P. 1128-1134.
5. Jiang Z.Y., Woollard A.C.S., Wolff S.P. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett.*, 1990, 268, 69-71. DOI: 10.1006/abio.1999.4208.
6. Khan S., Zahoor M., Khan R.S. The impact of silver nanoparticles on the growth of plants: The agriculture applications // *Heliyon*. – 2023. – Vol. 8, Is. 6. – P. e16928.
7. Kou S. G., Peters L. M., Mucalo M. R. Chitosan: A review of sources and preparation methods // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – Vol. 169. – P. 85-94.
8. Kumaraswamy R.V., Kumari S., Choudhary R.C. et al. Engineered chitosan based nanomaterials: Bioactivities, mechanisms and perspectives in plant protection and growth // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2018. – Vol. 113. – P. 494-506.
9. Li K., Xing R., Liu S. et al. Chitin and chitosan fragments responsible for plant elicitor and growth stimulator // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2020. – Vol. 68, №. 44. – P. 12203-12211.

БИОРЕФАЙНИНГ И БИОКОНВЕРСИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

УДК 663.18

ПРИМЕНЕНИЕ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА СОЕВОГО МОЛОКА В БИОТЕХНОЛОГИИ КСАНТАНОВОЙ КАМЕДИ

Р.В. Асасе, Д.А. Середович, М.В. Пирогов, Т.В. Глухарева

Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Химико-технологический институт, 620002 Екатеринбург, Россия

Оценена возможность использования окары – богатого питательными веществами отхода производства соевого молока – в качестве субстрата для производства ксантановой камеди, широко используемого полисахарида. Предложена питательная среда на основе окары и изучен процесс ферментации *X. campestris* B6720 для получения ксантана. Проведена оценка роста клеточной культуры, изменения pH, содержания остаточного сахара и белка в течение процесса культивирования, а также измерен выход ксантановой камеди, который составил 8,12 г/л.

Ключевые слова: ксантановая камедь, окара, утилизация отходов, устойчивая биотехнология, ферментация, циклическая экономика, производство биополимеров, валоризация отходов.

Keywords: xanthan gum, okara, waste utilization, sustainable biotechnology, fermentation, circular economy, biopolymer production, waste valorization.

APPLICATION OF WASTE FROM SOYMILK PRODUCTION IN XANTHAN GUM BIOTECHNOLOGY

R.V. Asase, D.A. Seredovich, M.V. Pirogov, T.V. Glukhareva

Ural Federal University of the first President of Russia B. N. Yeltsin, Institute of Chemical Engineering, 620002 Yekaterinburg, Russia

The potential of using okara, a nutrient-rich waste product of soy milk production, as a substrate for the production of xanthan gum, a widely used polysaccharide, was evaluated. An okara-based nutrient medium was proposed, and the fermentation process of *X. campestris* B6720 to obtain xanthan was studied. The cell culture growth, pH change, residual sugar and protein content during the cultivation process were evaluated, and the xanthan gum yield was measured, which was 8.12 g/L.

Keywords: Xanthan gum, Okara, Waste utilization, Sustainable biotechnology, Fermentation, Circular economy, Biopolymer production, Waste valorization.

Растущий спрос на устойчивые технологии и сокращение отходов в различных отраслях промышленности вызывает значительный интерес к использованию побочных продуктов и отходов. Одной из быстрорастущих отраслей пищевой промышленности является производство соевого молока, что обусловлено увеличивающейся популярностью растительных диет [1]. Отходы производства соевого молока, часто называемые окарой, богаты питательными веществами и являются перспективным сырьем для повторного использования в биотехнологических процессах. Применение окары в производстве ксантановой камеди, на наш взгляд, может не только решить проблему управления этими отходами, но и увеличить их экономическую ценность за счет повышения производства такого важного биополимера как ксантан [5].

Ксантановая камедь – полисахарид, широко используемый благодаря своим уникальным реологическим свойствам в качестве загустителя и стабилизатора в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности, также он применяется в процессах добычи нефти и газа. Традиционно ксантановую камедь получают путем ферментации *Xanthomonas campestris* [2, 4]. Однако зависимость от индивидуальных источников углеводов, таких как глюкоза или сахароза, увеличивает производственные затраты и воздействие на окружающую среду. Исследование

альтернативных, экономически эффективных субстратов для производства ксантановой камеди имеет решающее значение для ее устойчивой биотехнологии [3].

Окара, нерастворимый осадок, остающийся после извлечения соевого молока из соевых бобов. Большое количество этого отхода представляет серьезную проблему его утилизации. Окара, состоящая в основном из полисахаридов, белка и липидов, является отличным кандидатом для процессов ферментации [6]. Ее потенциал выступать субстратом для производства ксантановой камеди не только представляет устойчивое решение для утилизации окары, но и снижает зависимость технологии от традиционных источников углеводов.

Целью данного исследования является изучение возможности использования отходов соевого молока для производства ксантановой камеди. Для оценки потенциала этого отхода пищевой промышленности нами была предложена питательная среда для культивирования *Xanthomonas campestris* на основе окары, изучен рост микроорганизмов, определено изменение рН, содержания остаточного сахара и белка в течение процесса культивирования, а также измерен выход ксантановой камеди.

Материалы и методы

Коммерческая ксантановая камедь была приобретена у ИП Нимченко В.В. (Москва, Россия). Соя была приобретена в ООО Амальгама (Ижевск, Россия). Бактерии, штамм *X. campestris* B6720, были приобретены в Национальном биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» (Москва, Россия).

Получение окары. Соевые бобы взвешивали (120 г), промывали и замачивали в дистиллированной воде (в соотношении 1:10) на ночь при комнатной температуре. Воду сливали, а соевые бобы измельчали до получения мелкой кашицы и нагревали до кипения и кипятили 5 мин, после чего процеживали для извлечения соевого молока, остаток полученной окары промывали 1,2 л горячей воды (90°C). Затем окару высушивали и измельчали до порошкообразного состояния.

Выращивание и поддержание микроорганизмов. Лиофилизированные бактериальные клетки регидратировались в течение 15 минут в стерильной среде, содержащей 1,7 г солодового экстракта, 1,0 г пептона и 100 мл дистиллированной воды. Аликвоту объемом 1 мл регидратированной клеточной культуры высевали на пластину агаризованной питательной среды (глюкоза 2,0 г, дрожжевой экстракт 1,0 г, пептон 1,0 г, агар 1,7 г и дистиллированная вода 100 мл). Культуру инкубировали при 28 °С в течение 48 часов. Затем хранили при 4 °С и пересевали каждые две недели.

Подготовка инокулята. Одну бактериальную петлю 48-часовой чистой культуры *X. campestris* с агаризованной среды помещали в стандартную среду для биосинтеза, содержащую 2,0 г глюкозы, 0,3 г дрожжевого экстракта, 0,01 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 г K_2HPO_4 и 0,2 г KH_2PO_4 в 100 мл дистиллированной воды. Культуру клеток инкубировали при 28 °С и 250 об/мин в течение 24 часов с использованием орбитального шейкера-инкубатора Biosan Orbital-Incubator ES-20 (Biosan, Латвия).

Биосинтез ксантановой камеди. Среда для биосинтеза была приготовлена объемом 2,5 л с использованием дистиллированной воды, 100 г окары, 15 г KH_2PO_4 , 5 г K_2HPO_4 и 0.25 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. После автоклавирования при 121 °С в течение 40 минут среду охлаждали до комнатной температуры. Для начала биосинтеза было использовано 10% (об./об.) инокулята. Биосинтез протекал в 5-литровом ферментаторе Winpact Evo System FS-07 (Major Science, Тайвань) с рабочим объемом 2,5 л при 28 °С и 250 об./мин в течение 96 часов.

Измерение оптической плотности. Оптическую плотность (OD) культуральной жидкости (на 0, 1, 2, 3 и 4 день) определяли с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Япония) при $\lambda = 600$ нм.

Измерение рН. рН образцов измеряли при 25 °С с помощью рН-метра FiveEasy (Mettler Toledo Ltd., Виктория, Австралия).

Определение количества сахаров. Общее содержание растворимого сахара определяли фенол-серноокислотным методом, как описано Нильсеном [8]. Показания снимали при длине волны 487 нм с использованием раствора глюкозы в качестве стандарта в концентрациях 10–50 мг/л.

Определение содержания белка. Содержание белка в ферментационном бульоне определяли с помощью метода Лоури [7]. Поглощение измеряли с помощью спектрофотометра Shimadzu 1800-UV при $\lambda = 750$ нм. После этого содержание белка рассчитывали с использованием калибровочной кривой, полученной с использованием сывороточного альбумина.

Осаждение и количественное определение ксантановой камеди. Культуральную жидкость центрифугировали при 5000 об/мин в течение 20 мин при 4 °С для удаления клеток (биомассы) и остатков окары. Камедь, содержащуюся в супернатанте, осаждали с использованием изопропанола в соотношении 1: 2 (об./об.), затем выдерживали при 4 °С в течение 24 часов и отделяли центрифугированием. Осадок (камедь) высушивали при 50 °С в течение 24 часов в термостате и взвешивали.

Статистический анализ. Все статистические анализы выполняли с использованием статистического программного пакета GraphPad Prism 8. Полученные данные анализировали с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), а для сравнения средних значений использовали критерий множественного сравнения Тьюки.

Обсуждение результатов

На рисунке 1 (А) представлено изменение оптической плотности культуральной жидкости (OD) при 600 нм в течение четырех дней, отражающее рост микробной культуры во время ферментации. Результаты показывают, что окара может эффективно поддерживать рост *X. campestris*, при этом значительное накопление биомассы наблюдается в течение первых суток. Однако для максимизации выхода ксантана крайне важно устранить факторы, приводящие к снижению биомассы на 4 сутки. Выявление этих факторов и оптимизация процесса ферментации может помочь в поддержании роста и повышении общей производительности процесса.

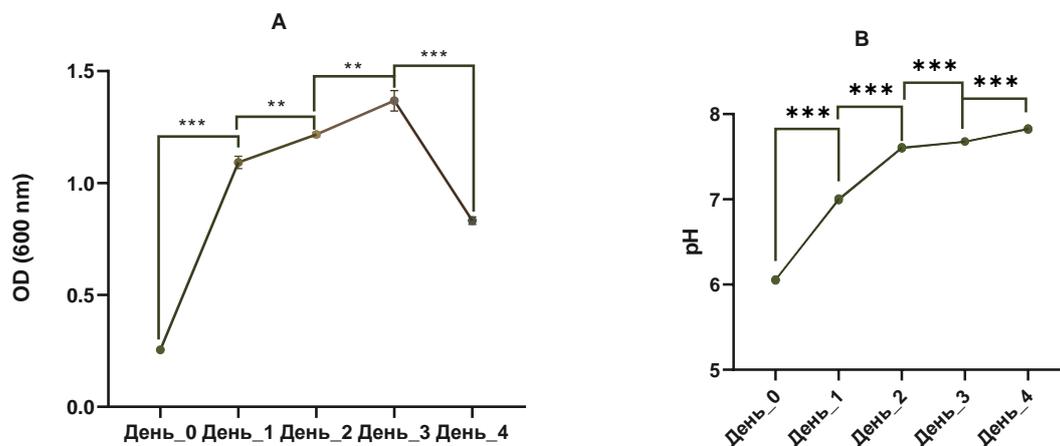


Рис. 1. Изменение оптической плотности, OD (А) и pH (В) культуральной жидкости в течение ферментации. Точки – средние значения (n=3), ** достоверное отличие ($p < 0.0002$) *** достоверное отличие ($p < 0.0001$).

На рис. 1 (В) представлены изменения pH в течение четырех дней процесса ферментации. Значения pH указывают на кислотно-щелочной баланс в среде, который может влиять на микробную активность и общую эффективность ферментации. Наблюдаемые изменения pH в процессе ферментации подчеркивают динамическую природу микробной активности и использования субстрата. Мониторинг и поддержание pH в оптимальном диапазоне имеют важное значение для максимизации выхода продукта и обеспечения успешного процесса ферментации. На начальном этапе наблюдается значительное увеличение pH, что коррелирует с активным ростом клеточной массы. Однако со 2-го дня существенных изменений pH не происходит, возможно это связано с достижением критических значений для роста культуры, а также с нейтрализацией среды ксантаном, содержащим кислотные группировки.

Содержание сахара (г/л) и белка (мг/л) в культуральной жидкости в течение четырехдневного периода (с 1-го по 4-й день) в процессе ферментации показаны на рис. 2.

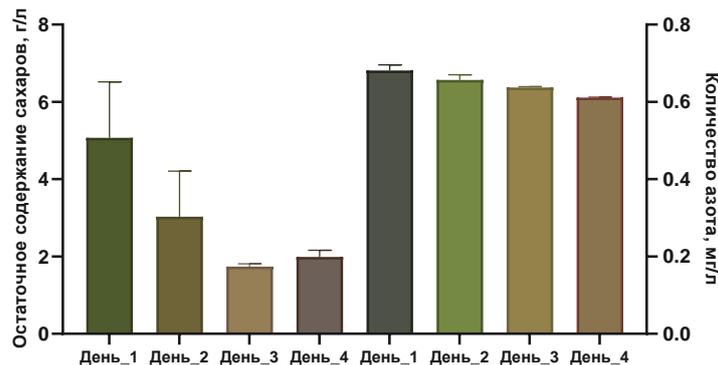


Рис. 2. Остаточный сахар (г/л) и содержание белка (мг/л). Столбики – средние значения ($n=3$), а планки погрешностей – стандартное отклонение средних значений.

Содержание остаточного сахара указывает на количество углеводов, оставшихся в среде, в то время как содержание белка отражает доступность азота, необходимого питательного вещества для роста микроорганизмов. Результаты показывают, что бактерии эффективно использовали сахар в процессе ферментации, с заметным снижением, наблюдаемым к 3-му дню. Количество азота слабо изменилось за последние три дня, поскольку замедлился рост микроорганизмов. Для оптимизации процесса культивирования в дальнейшем необходимо оптимизировать соотношение источников углерода и азота в питательной среде, чтобы максимизировать выход продукта.

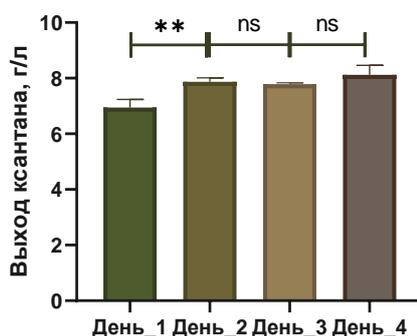


Рис. 3. Выход ксантановой камеди. Столбцы – средние значения ($n = 3$), а планки погрешностей – стандартное отклонение средних значений, где ** – достоверное отличие ($p = 0,003$), а ns – отсутствие достоверного отличия ($p < 0,05$).

На рис. 3 показано изменение количества ксантановой камеди (г/л) в процессе ферментации. Значительное увеличение с 1-го по 2-ой день, за которым следуют лишь незначительные изменения, свидетельствует, что максимальная скорость производства ксантана достигается на ранней стадии процесса ферментации. Со 2 дня и далее значительного увеличения выхода ксантана не наблюдается. Эти результаты подчеркивают важность оптимизации условий ферментации для достижения высоких выходов ксантановой камеди.

Заключение

Таким образом, в ходе исследования показана возможность получения ксантановой камеди культивированием *X. campestris* B6720 в среде на основе окары с выходом 8.12 г/л. В дальнейшем для увеличения выхода ксантана планируется оптимизировать состав питательной среды и условия культивирования.

Благодарность. Исследования выполнены за счет совместного гранта Российского научного фонда и Правительства Свердловской области № 24-16-20054, <https://rscf.ru/project/24-16-20054/>.

Библиографический список

1. Asase R.V., Seredovich D., Selezneva I., Glukhareva T. Xanthan gum production using *Xanthomonas campestris* B6720: Fermentation process and application in fermented soymilk // *BIO Web of Conferences*. 2024. Vol. 121. 01005.
2. Asase R. V., Glukhareva T. V. Production and application of xanthan gum—prospects in the dairy and plant-based milk food industry: a review // *Food Science and Biotechnology*. 2024. Vol. 4, № 33. P. 749–767.
3. Felicia Katherine R., Muthukumar C., Sharmila G., Manoj Kumar N., Tamilarasan K., Jaiganesh R. Xanthan gum production using jackfruit-seed-powder-based medium: optimization and characterization // *3 Biotech*. 2017. Vol. 4, № 7. P. 248.
4. Kang Y., Li P., Zeng X., Chen X., Xie Y, Zeng Y, Zhang Y., Xie T. Biosynthesis, structure and antioxidant activities of xanthan gum from *Xanthomonas campestris* with additional furfural // *Carbohydrate Polymers*. 2019. Vol. 216. P. 369–375.
5. Li B., Qiao M., Lu F. Composition, Nutrition, and Utilization of Okara (Soybean Residue) // *Food Reviews International*. 2012. Vol. 3, № 28. P. 231–252.
6. Lin D., Long X., Huang Y., Yang Y. Effects of microbial fermentation and microwave treatment on the composition, structural characteristics, and functional properties of modified okara dietary fiber // *LWT*. 2020. Vol. 123. 109059.
7. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A. L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // *Journal of Biological Chemistry*. 1951. Vol. 1, № 193. P. 265–275.
8. Nielsen S. S. Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates // *Food Analysis Laboratory Manual, Food Science Texts Series, Springer Science+Business Media, LLC* 2010. P. 47–53.

УДК 631*232.22

ВЛИЯНИЕ БИОУГЛЯ, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ СМЕСИ ДРЕВЕСНЫХ ОПИЛОК И ОСАДКА СТОЧНЫХ ВОД, НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ

Бакланова О.В., Брындина Л.В.

Воронежский государственный лесотехнический университет им Г.Ф. Морозова

Аннотация: Исследовано воздействие биоугля из древесных отходов и осадка сточных вод очистных сооружений на онтогенез растений на примере ярового рапса сорта «Ратник» и озимой пшеницы сорта «Московская 39». Внесение биоугля в почву усиливало развитие корневой системы ярового рапса по сравнению с контрольным вариантом в 1,6 раза, биологическую урожайность – на 23,5 %. Урожайность и основные характеристики зерна озимой пшеницы сорта «Московская 39» также в опытных вариантах превышали контрольные образцы.

Ключевые слова: биоуголь, осадки сточных вод, рост растений, биомасса растений, корневая система

THE EFFECT OF BIOCHAR OBTAINED FROM A MIXTURE OF SAWDUST AND OSV ON PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT

Baklanova O.V., Bryndina L.V.

Voronezh State University of Forestry and Technologies named after G.F. Morozov

Abstract: The effect of biochar from wood waste and sewage sludge from sewage treatment plants on plant ontogenesis was studied using the example of spring rapeseed of the Ratnik variety and winter wheat of the Moskovskaya 39 variety. The introduction of biochar into the soil increased the development of the root system of spring rapeseed by 1.6 times compared with the control variant, and biological yield by 23.5%. The yield and main characteristics of winter wheat grain of the Moskovskaya 39 variety also exceeded the control samples in experimental versions.

Keywords: biochar, sewage sludge, plant growth, plant biomass, root system

Статистические данные по образованию перерабатываемых древесных отходов свидетельствуют о том, что большая их часть не используется, оставаясь лежать на земле и создавая серьезную экологическую опасность. Проблема переработки осадков сточных вод, образующихся после их очистки, также стоит очень остро. Утилизация осадков сточных вод на сегодняшний день оставляет желать лучшего. Очистные системы городов накапливают эти отходы в больших объемах, загрязняя почву, грунтовые воды, обостряя тем самым экологическую ситуацию мегаполисов. Решением сложившейся ситуации может стать производство из них биоугля. Положительное воздействие биоуглей на почвенные процессы и гумусообразование подтверждено большим количеством исследований [1-3]. Употребление биоугля разрешает в комплексе немало вопросов: снижение концентрации парниковых газов за счет поглощения углерода почвой на длительное время; повышение плодородия почв; оптимизацию почвенного микробиома; конверсию органических отходов.

В связи с вышеизложенным целью работы было оценить влияние биоугля из древесных опилок и осадка сточных вод на рост растений.

В качестве компонентов для производства биоугля использовались опилки дуба и ясеня и осадки сточных вод (ОСВ) Левобережных Воронежских очистных сооружений. Карбонизацию проводили при температуре 500 °С со скоростью 15 °С/мин в течение 3 ч при соотношении компонентов смеси 1:1. В почву вносили 10 % биоугля по массе. Исследования по влиянию биочара на физиологические и биологические процессы, протекающие в растениях, проводили на примере ярового рапса (сорт «Ратник») на территории Питомнического комплекса

Воронежской области. Оценка экспериментальных данных (таблица 1) выявила значительное благоприятное воздействие биоугля на силу роста растений на начальном этапе развития.

Таблица 1

Влияние биоугля на рост ярового рапса

Опыт	Воздушно-сухая масса растений в фазе 2-х пар настоящих листьев, г	Прирост	
		г	%
Контроль	0,056± 0,015	-	-
Биоуголь	0,076±0,013	0,020	35,7

Образование корней у ярового рапса на начальном этапе развития происходит очень медленно, однако под действием биоугля происходит их интенсивное формирование. Так в присутствии биоугля увеличение корневой массы превышало контроль в 1,6 раза (таблица 2).

Таблица 2

Формирование корневого аппарата рапса сорта «Ратник» по фазам развития, см

Вариант опыта	Посев-всходы	Всходы-бутонизация	Бутонизация-цветение	Цветение-созревание стручков
Контроль	2,0±0,3	26,7±0,01	38,5±0,2	46,4±0,2
Биоуголь	3,4±0,2	32,2±0,01	44,1±0,2	52,5±0,2

Прибавка роста корней в контроле к завершающей стадии формирования растения составила 7,9 см. В опытных образцах корневая система была более развита. Прирост в почве с биоуглем составил 8,4 см. Таким образом, внесение биоугля, полученного в результате пиролиза биомассы древесины и осадков сточных вод, оказывает положительное воздействие на рост и развитие растений, особенно на начальном этапе, усиливая скорость перехода ярового рапса на автотрофное питание, и формирует мощную корневую систему.

Исследование влияния биоугля на параметры формирования урожая ярового рапса сорта «Ратник» представлено в таблице 3.

Таблица 3

Влияние биоугля на структуру и биологическую урожайность ярового рапса

Показатели	Контроль	Опыт
Высота растений, см	95,0± 3,2	106,0±2,2
Плотность стеблестоя, шт/м ²	120±0,1	124±0,1
Количество стручков, шт./растение	47±1,5	52±1,3
Количество семян в стручке, шт.	11±0,2	14±0,3
Количество семян в растении, шт.	560±0,5	628±0,4
Масса 1000 семян, г.	3,12±0,01	3,28±0,01
Масса семян с растения, г.	1,70±0,002	2,03±0,002
*Биологическая урожайность, т/га	2,04±2,1	2,52±1,5

*Для расчета биологической урожайности плотность стеблестоя на 1 гектаре пашни перед уборкой умножили на массу семян в одном растении и полученный результат перевели в т/га.

Экспериментальные данные, представленные в таблице 3, показывают, что под влиянием биоугля растения были выше контроля на 11,6 %. При этом у опытных образцов отмечены и более высокие значения плотности травостоя. Анализ параметров формирования урожая позволил установить высокую эффективность обработки почвы предлагаемым биопрепаратом. Увеличение количества стручков в растении по отношению к контролю составило 10,6%, количество семян в растении возросло на 12,1 %, масса семян с растения превысила контрольное значение на 19,4%, биологическая урожайность активизировалась на 23,5% для биоугля по сравнению с контрольным вариантом.

На территории ФГБУ «Опытная станция имени А.Л. Мазлумова» в период с 2020 по 2021 гг были проведены полевые испытания по исследованию влияния биоугля на морфофизиологические характеристики озимой пшеницы сорта «Московская 39».

Проведенные исследования показали, что биоуголь положительно влиял на формирование посевов озимой пшеницы (таблица 4). Отмечено достоверное увеличение продуктивного стеблестоя в сравнении с контролем.

Таблица 4

Влияние биоугля на продуктивность, структуру урожая озимой пшеницы сорта «Московская 39»

Показатели	Контроль	Опыт
Высота растений, см	95,0±2,3	106,0±1,5
Плотность стеблестоя, шт/м ²	540±0,1	624±0,1
Количество зерен в колосе, шт.	26± 1,3	31±1,2
Масса 1000 зерен, г.	37,12±0,02	39,68±0,02
Масса зерна с одного колоса, г.	1,24±0,001	1,63±0,001
Урожай биомассы, г/м ²	2043±3,3	2115±3,2
Урожай зерна, г/м ²	564± 2,5	587±1,5

Обработка почвы биоуглем улучшала качество зерна озимой пшеницы (таблица 5). Содержание белка и клейковины находятся в прямой зависимости от морфофизиологических показателей (таблица 4).

Таблица 5

Влияние биоугля на показатели качества зерна

Показатели	Контроль	Опыт
Сырая клейковина, %	23,2	25,1
Белок, %	13,4	14,5

Полученные экспериментальные данные позволили установить благоприятное воздействие биоугля на продуктивность рапса и пшеницы, свидетельствующие о положительном изменении морфометрических характеристик растений и повышении доступности питательных веществ в присутствии биоугля.

Библиографический список

1. Дурова А.С. Биоуголь для плодородия. АгроБизнес: [сайт]. - 2022.-23 июнь. - URL: <https://agbz.ru/articles/biougol-dlya-plodorodiya/> (дата обращения:12.06.2024).
2. Никитин А.Н., Шамаль Н.В., Наумова Г.И. и др. Влияние биоугля на переход тяжелых металлов в надземную биомассу озимой пшеницы. Экологическая культура и охрана окружающей среды: 1 Дорофеевские чтения: материалы междунар. науч.-практ. конференции. Витебск, 2013, С.288-289. – URL: <https://lib.vsu.by/jspui/handle/123456789/4862> (дата обращения: 20.06.2024).
3. Мишустин О.А., Желтобрюхов В.Ф., Грачева Н.В., Хантимирова С.Б. Обзор развития и применения технологий пиролиза для переработки отходов. Молодой ученый, 2018, №45 (231), С. 42-45. URL: <https://moluch.ru/archive/231/53604/> (дата обращения: 23.06.2024).

УДК 663.18

БИОВАЛОРИЗАЦИЯ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ В КСАНТАНОВУЮ КАМЕДЬ*Д.А. Баратова, А.К. Юргенсон, Т.В. Глухарева**Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина,
г. Екатеринбург, Россия*

Ксантановая камедь – биополимер, получивший широкое применение во многих отраслях пищевой, фармацевтической, нефтяной и косметологической промышленности благодаря уникальным реологическим свойствам. Целью настоящей работы являлось определение способности *Xanthomonas campestris B-6719* к биосинтезу ксантановой камеди с использованием молочной сыворотки в качестве компонента питательной среды с целью частичной замены дорогостоящего сырья – глюкозы. В ходе работы был установлен элементный состав молочной сыворотки, на основании результатов которого были рассчитаны оптимальные количества вносимых компонентов питательной среды. Добавление молочной сыворотки позволило сократить содержание глюкозы в ферментационной питательной среде более чем в 20 раз. На предложенной питательной среде получен продукт с выходом 3,7 г/л.

Ключевые слова: ксантановая камедь, молочная сыворотка, биовалоризация, переработка, вторичный ресурс, биосинтез.

BIOVALORIZATION OF WHEY INTO XANTHAN GUM*D.A. Baratova, A.K. Jurgenson, T.V. Glukhareva**Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin,
Yekaterinburg, Russia*

Xanthan gum is a biopolymer that has been widely used in many sectors of the food, pharmaceutical, petroleum and cosmetology industries due to its unique rheological properties. The purpose of this work was to determine the ability of *Xanthomonas campestris B-6719* to biosynthesize xanthan gum using whey as a nutrient medium component in order to partially replace expensive raw materials – glucose. In the course of the work, the elemental composition of whey was established, based on the results of which the optimal amounts of the introduced components of the nutrient medium were calculated. The addition of whey made it possible to reduce the glucose content in the fermentation nutrient medium by more than 20 times. A product with a yield of 3.7 g/l was obtained on the proposed nutrient medium.

Keywords: xanthan gum, whey, biovalorization, processing, secondary resource, biosynthesis.

Подход комплексного рационального использования сырья, заключающийся в наиболее полном, экономически оправданном использовании всех полезных компонентов, содержащихся в сырье, а также в отходах производства, является приоритетным направлением развития промышленности. Почти все виды отходов промышленных предприятий содержат ряд ценных органических и минеральных компонентов, которые потенциально могут быть использованы в цикле получения других продуктов.

Сыворотка – основной побочный продукт молочной промышленности – образуется в результате свертывания молока при приготовлении сыра после отделения казеина и жира. Благодаря высокому содержанию в ней питательных органических веществ, молочная сыворотка представляет серьезную угрозу для окружающей среды и считается основной проблемой в молочной промышленности. Ежегодно молочная промышленность производит около 145 миллионов тонн молочной сыворотки [2 с. 453]. В молоке сыворотка составляет от 80 до 90 % от общего объема, поступающего в промышленный процесс, и содержит от 6,0 до 6,4 % сухих компонентов. Приблизительно 55 % питательных веществ исходного молока остаются в сыворотке, в том числе ценные растворимые белки, лактоза, витамины и минеральные соли [1, с. 1938]. Богатый состав молочной сыворотки позволяет считать ее привлекательным и

экономически эффективным для ферментационных процессов вторичным сырьевым ресурсом. Так, разработаны технологии [2, с. 454; 3 с. 2], позволяющие путем биоконверсии получать этанол, метан, дрожжевой белок, лактат, пропионат, ацетат и др.

Биовалоризация молочной сыворотки в ксантановую камедь – еще одно перспективное направление биотехнологии. Ксантановая камедь – это водорастворимый гетерополисахарид с уникальными реологическими свойствами, которые способствуют его широкому применению во многих отраслях промышленности [1, с. 1937], включая производство пищевых продуктов, фармацевтических препаратов, керамической глазури, бумаги, сельскохозяйственных химикатов.

В промышленности при производстве ксантановой камеди используют дорогие субстраты, что значительно увеличивает стоимость производства, и, как следствие, конечную стоимость продукта. Использование менее дорогих и более распространенных субстратов может повысить экономическую эффективность ферментативного процесса производства ксантана. Согласно литературным данным, некоторые штаммы продуцентов ксантановой камеди способны к росту, развитию и синтезу ксантана на питательных средах, содержащих молочную сыворотку в качестве источника углерода.

Цель исследования заключается в изучении способности продуцента ксантана *Xanthomonas campestris* B-6719 к биосинтезу ксантановой камеди на питательной среде на основе молочной сыворотки.

В качестве продуцента ксантана был выбран производственный штамм ВКПМ *Xanthomonas campestris* B-6719. Предварительно для адаптации культуру пересеивали и выращивали в пробирках на скошенном агаре, содержащим в качестве источника углерода лактозу. Количество вносимого компонента рассчитывали исходя из оптимального содержания углерода в питательной среде (по паспорту штамма B-6719 оптимальная концентрация углерода – 18,9 г/л).

Для получения инокулята двухсуточную культуру с агаризованной среды засеивали в колбы с 50 мл питательной среды, содержащей 18,9 г/л лактозы, 10,0 г/л дрожжевого экстракта, 10,0 г/л пептона. Культивацию проводили в шейкере-инкубаторе при 28 °С, 250 об/мин, 24 ч. Для биосинтеза ксантана использовали среду с сухой деминерализованной молочной сывороткой. На основании результатов элементного анализа выбранного сырья установили, что фактором, ограничивающим применение молочной сыворотки, является высокое содержание азота (1,77 %) (табл. 1).

Таблица 1

Элементный состав молочной сыворотки*

Элемент	Содержание, %
C	39,75±3,95
H	6,90±2,79
N	1,77±0,63

*Число параллельных опытов n = 3, доверительная вероятность p = 95%

Исходя из данных элементного анализа сырья рассчитали количество компонентов питательной среды (табл. 2) с целью сохранения оптимального соотношения C:N в среде. В качестве контроля использовалась стандартная среда (табл. 2), указанная в паспорте штамма, с концентрацией глюкозы 20 г/л. Посевной материал – двухсуточный инокулят продуцента – вносили в количестве 5 %. Биосинтез ксантана осуществляли в шейкере-инкубаторе в аналогичных условиях в течение 72 ч в колбах со 100 мл питательной среды. Ксантан осаждали из нативного раствора ацетоном (осч). Очистку проводили трехкратным переосаждением ацетоном из воды. Выход продукта на экспериментальной среде составил 3,70 г/л, что ниже контрольного опыта на 18,1 % (4,52 г/л).

Идентификацию продукта проводили методом ИК-спектроскопии. В качестве эталона использовали коммерческую ксантановую камедь (ИП Нимченко, Москва). Как видно из ИК спектров, все образцы имеют идентичные полосы поглощения при одинаковых волновых числах (рис. 1).

Компонент	Содержание г/л	
	Экспериментальная среда	Контрольная среда
Сухая молочная сыворотка	18,8	–
Глюкоза	4,5	20,0
Дрожжевой экстракт	–	3,0
KH_2PO_4	2,0	2,0
K_2HPO_4	2,0	2,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,1

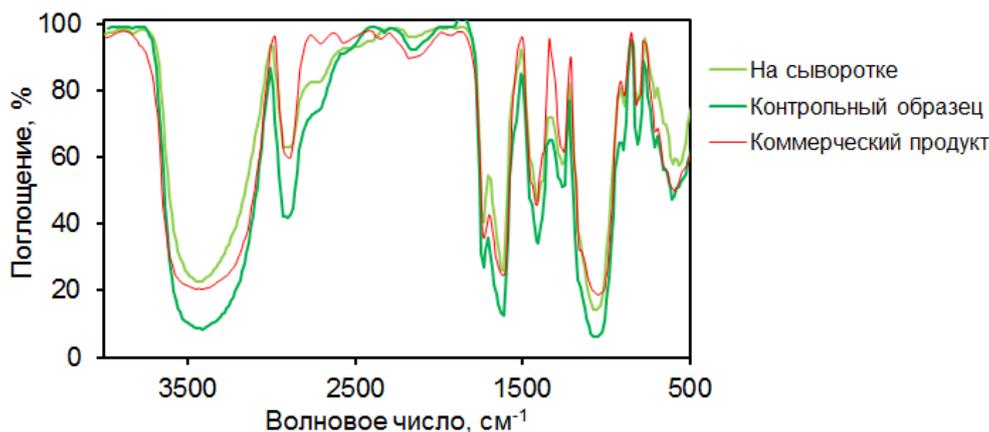


Рисунок 1. ИК-спектры образцов ксантана

На основе полученного результата сделали вывод, что выделенный полисахарид имеет те же спектральные характеристики, что и используемый стандарт. Таким образом, было установлено, что применение молочной сыворотки в биосинтезе ксантана с использованием выбранного нами штамма *X. campestris* В-6719 является возможным и перспективным. Дальнейшие исследования по предварительной подготовке сырья, направленной на снижение количества N в сыворотке до оптимальной концентрации, например, с отделением белков методом микрофльтрации, а также эксперименты по оптимизации питательной среды с целью увеличения выхода продукта позволят сократить расход дорого компонента (глюкозы), снизить себестоимость ксантановой камеди, а также целесообразно утилизировать крупномасштабный пищевой отход.

Благодарности. Исследования выполнены за счет совместного гранта Российского научного фонда и Правительства Свердловской области № 24-16-20054, <https://rscf.ru/project/24-16-20054/>.

Библиографический список

1. Nery T., Brandão L., Esperidião M., Druzian J. Biosíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade. *Quimica Nova*, 2008. Vol. 31. №8. P. 1937-1941.
2. Niknezhad S., Asadollahi M. A., Zamani A., Biria D., Doostmohamadi M. Optimization of Xanthan Gum Production using Cheese Whey and Response Surface Methodology. *Food science and biotechnology*, 2015. Vol. 24. №2. P. 453-460.
3. Savvides A., Katsifas E., Hatzinikolaou D., Karagouni A.D. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* using whey permeate medium. *World journal of microbiology & biotechnology*, 2012. Vol. 28. P. 2759-2764.

УДК 502/504

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОФИКСАЦИИ УГЛЕРОДА РАЗЛИЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ

Е.С. Белик, А.С. Соловьёва, С.М. Мактиева, Л.В. Рудакова

Пермский национальный исследовательский политехнический университет, г. Пермь, Россия

В статье представлены результаты экспериментальных исследований по утилизации углекислого газа различными культурами микроскопических водорослей, выделенных из природной среды или полученных в лабораторных условиях. Концентрация углекислого газа составила 5 %. Лучшие результаты по биофиксации углерода показали микроводоросли, выделенные из природного пресного водоема. В процессе культивирования растительная биомасса увеличилась в восемь раз, по сравнению с начальной биомассой.

Ключевые слова: утилизация углекислого газа, биофиксация, микроводоросли, растительная биомасса.

EVALUATION OF THE BIOFIXATION EFFICIENCY OF DIFFERENT MICROALGAE CULTURES

E.S. Belik, A.S. Solovyova, S.M. Maktieva, L.V. Rudakova

Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia

The article presents the results of experimental studies on the utilisation of carbon dioxide by various cultures of microscopic algae isolated from the natural environment or obtained under laboratory conditions. The carbon dioxide concentration was 5%. The best results in carbon biofixation were obtained with microalgae isolated from a natural freshwater body. During the cultivation process, plant biomass increased eight times compared to the initial biomass.

Keywords: Carbon dioxide utilization, biofixation, microalgae, plant biomass.

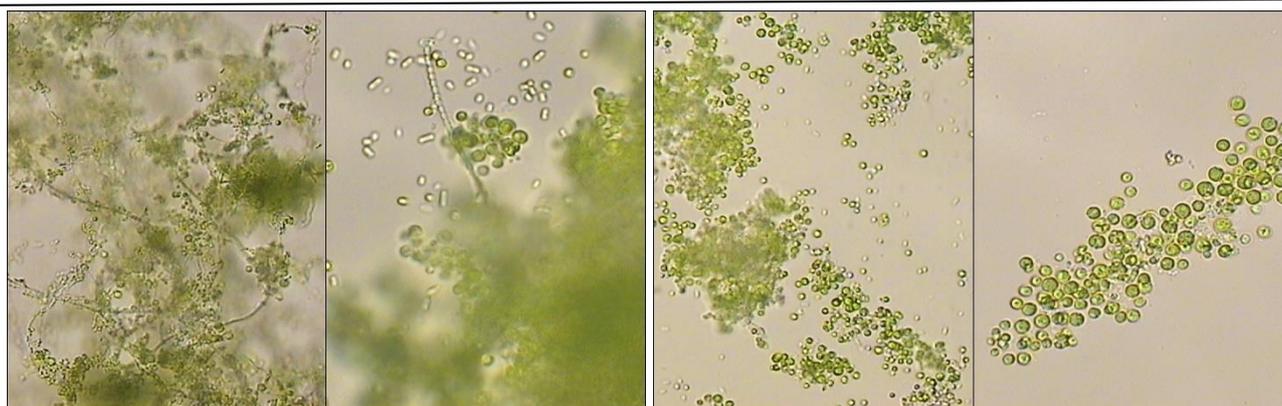
В связи с переходом России к низкоуглеродному развитию большой интерес представляет реализация новых проектов по утилизации выбросов углекислого газа. Одним из перспективных способов утилизации углекислого газа является биотехнологический с использованием микроскопических водорослей.

Исследования в данном направлении ведут специалисты ФГАОУ ВО «СПбПУ», разработавшие способ утилизации углекислого газа (15-39 об.%) с применением микроводоросли рода *Chlorella*. Эффективность утилизации составляла до 0,127 г CO₂ одним литром суспензии микроводорослей *Chlorella Vulgaris* за одни сутки [1]. В НГТУ им. Алексева также исследуют подходы к утилизации выбросов углекислого газа с использованием микроскопических водорослей [2]. Специалисты компании ООО «РИТЭК» занимаются изучением вопроса утилизации отходящих газов с помощью микроводорослей и их переработкой в бионефть [3].

Цель работы заключалась в оценке эффективности биофиксации углерода различными культурами микроводорослей.

Объектами экспериментальных исследований были культуры микроскопических водорослей, выделенных из природной среды или полученных в лабораторных условиях. Микрофотографии культур микроводорослей представлены на рис. 1–4.

Культура № 1 – консорциум сине-зеленых микроскопических водорослей (цианобактерий) и частых включений колоний зеленых микроводорослей с нитями грибов, выделенных из лишайников (рис. 1а).

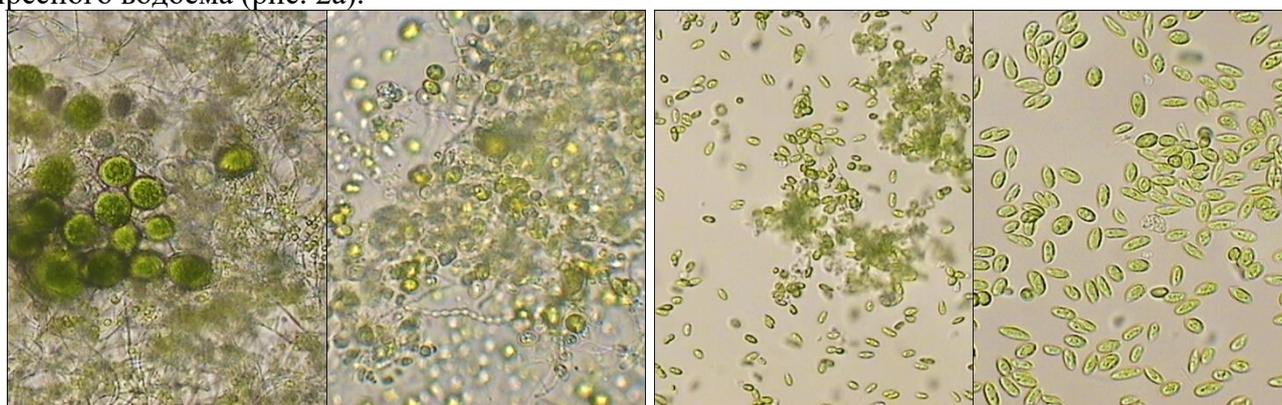


а – культура № 1 (увеличение x400/x800) б – культура № 2 (увеличение x400/x800)

Рис. 1. Микрофотографии культур микроводорослей

Культура № 2 – микроводоросли, выращенные в лабораторных условиях путем длительной адаптации к питательной среде Тамия при комнатных условиях.

Культура № 3 – зеленые микроводоросли различных видов, выделенные из природного пресного водоема (рис. 2а).



а – культура № 3 (увеличение x400/x800) б – культура № 4 (увеличение x400/x800)

Рис. 2. Микрофотографии культур микроводорослей

Культура № 4 – штамм микроводоросли рода *Chlorella*, выращенный из готового биопрепарата и показавший наилучшие результаты на основании предыдущих исследований (рис. 2б). Программа исследования по поглощению углекислого газа микроскопическими водорослями представлена в табл. 1.

Таблица 1.

Программа исследования по поглощению углекислого газа микроскопическими водорослями

Показатели исследований	Применяемые методики	Оборудование
1. Изменение оптической плотности микроводорослей;	ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04 Токсикологические методы контроля. Методика измерений оптической плотности культуры водоросли хлорелла (<i>Chlorella vulgaris</i> Beijer) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления;- Микроскопический анализ.	Инкубатор BC-J80/BC-J160;
2. Микроскопирование микроводорослей.		Климатостат КС-200 СПУ; Спектрофотометр. Микроскоп Carl Zeiss.

Для выращивания культур микроводорослей использовали жидкую среду Тамия. Культивирование микроводорослей осуществляли при постоянных концентрациях CO₂ в

инкубаторе углекислого газа ВС-J80, обеспечивающем непрерывное нагнетание CO_2 и поддержание температуры 35°C . Культивирование образцов контрольной группы осуществляли в климатостате КС-200 СПУ при аналогичных условиях без подачи углекислого газа (концентрация CO_2 была равна атмосферной – 0,03%). Уровень pH на протяжении эксперимента для всех проб находился в диапазоне 6–7,5. Определение концентрации клеток микроводорослей в суспензии производили по показателю оптической плотности на спектрофотометре В-1200 ЭКОВЬЮ (толщина стенки кюветы – 10 мм, светофильтр – 560 нм). Периодичность контроля – 1 раз в 3-4 дня. Начальная оптическая плотность готовых суспензий находилась в диапазоне 0,1–0,4 ед.

С целью оценки жизнеспособности и устойчивости исследуемых культур микроводорослей к повышенным концентрациям углекислого газа в процессе эксперимента осуществляли визуальный анализ проб и микроскопирование с использованием микроскопа марки Carl Zeiss при разном увеличении. На основании проведенных экспериментальных исследований были выявлены закономерности по адаптации объектов исследования к увеличению концентрации углекислого газа, так и по определению наиболее эффективной культуры. На рис. 3-6 представлено изменение оптической плотности культур микроводорослей.

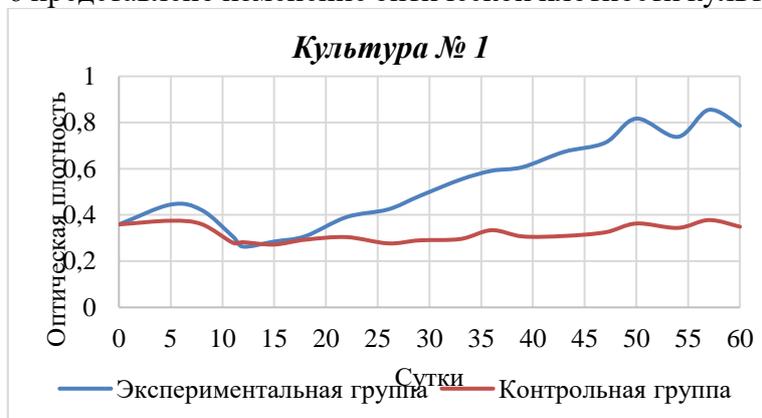


Рис. 3. Изменение оптической плотности культуры №1: экспериментальная группа – 5 % углекислого газа, контрольная группа – 0,03 % углекислого газа

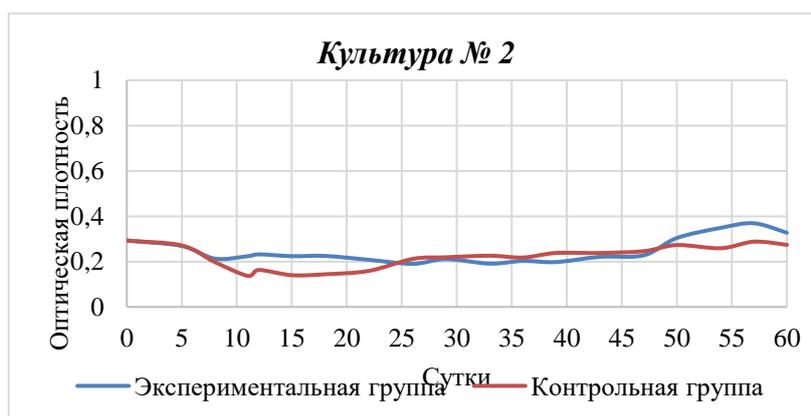


Рис. 4. Изменение оптической плотности культуры №2: экспериментальная группа – 5 % углекислого газа, контрольная группа – 0,03 % углекислого газа

При сравнении экспериментальной и контрольной группы образцов ингибирующий эффект от повышения концентрации CO_2 от 0,03% до 5 % ни для одной из исследуемых культур зафиксирован не был. На основании проведенного исследования можно сделать вывод, что при культивировании микроскопических водорослей культур №1, №3 и №4 добавление углекислого газа в концентрации 5 % оказывает стимулирующее действие на рост биомассы, что подтверждают кривые изменения оптической плотности растворов (рис. 3, 5, 6) и результаты визуального анализа проб.

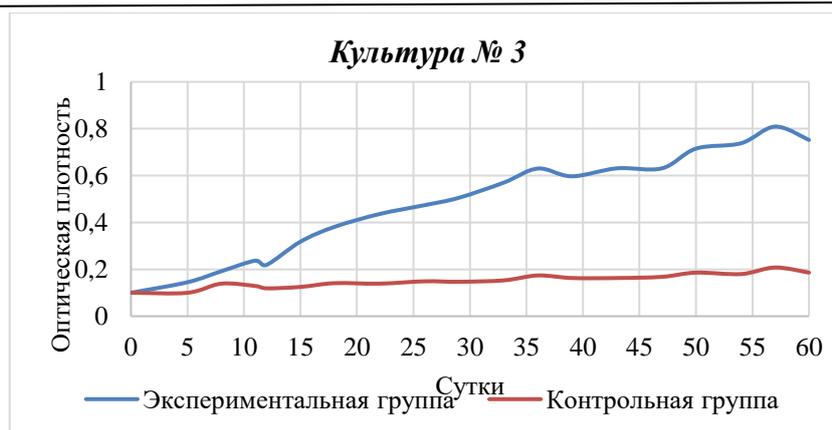


Рис. 5. Изменение оптической плотности культуры № 3: экспериментальная группа – 5 % углекислого газа, контрольная группа – 0,03 % углекислого газа

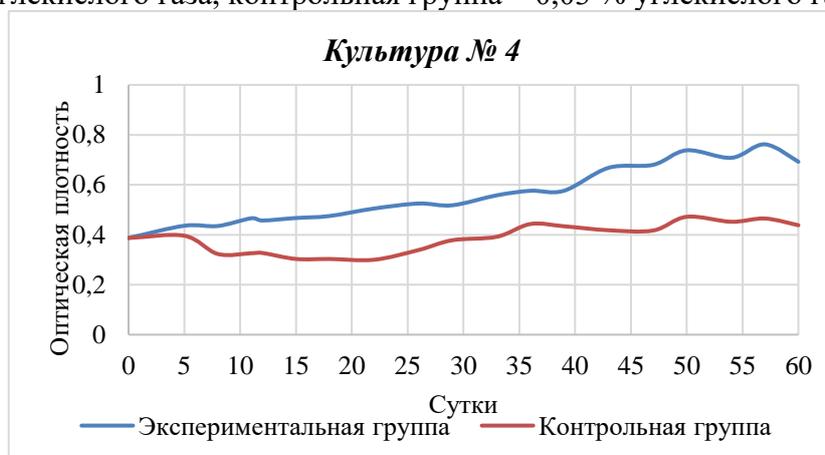


Рис. 6. Изменение оптической плотности культуры № 4: экспериментальная группа – 5 % углекислого газа, контрольная группа – 0,03 % углекислого газа

Наилучший результат по увеличению растительной биомассы наблюдался у культуры № 3 и составлял 0,809 ед., что в 8 раз больше исходного значения (0,1 ед.). Следующим этапом экспериментальных исследований является увеличение концентрации углекислого газа в 2-3 раза, что позволит определить наиболее эффективные культуры для биофиксации углерода и применения их для очистки газовых выбросов на предприятии. Полученную растительную биомассу микроводорослей можно использовать в качестве удобрений в сельском хозяйстве, получения кормовой добавки в животноводстве, а также для очистки от загрязнений в области охраны окружающей среды.

Библиографический список

1. Патент № 2 797 838, Российская Федерация, В01D 53/62 (2022.08); В01D 53/84 (2022.08). Способ утилизации углекислого газа с применением микроводоросли рода *Chlorella*: № 2022119015 : заявл. 12.07.2022 : опубл. 08.06.2023 / Политаева Н. А., Жажков В. В., Зибарев Н. В., Вельможина К. А., Шинкевич П. С. – 12 с.
2. В НГТУ разрабатывают способ утилизации CO₂ с помощью микроводорослей // Нижегородский государственный технический университет им. Алексева – URL: <https://www.nntu.ru/news/detail/nauka-i-innovacii/0/v-ngtu-razrabatyvayut-sposob-utilizacii-so2-s-romoshhu> (дата обращения: 11.06.2024).
3. Нургалиев Р, Славкина О.В. Технология утилизации дымовых газов с помощью микроводорослей и их переработка в бионефть // Энергетическая политика. – 2024. – №1 (192). – С. 28-37.

УДК 543.422:628.3

ОБРАБОТКА ОЗОНОМ КАК МЕТОД ПОВЫШЕНИЯ РЕАКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ СОЛОМЫ ПШЕНИЦЫ В ПРОЦЕССАХ БИОКОНВЕРСИИ В МОНОСАХАРИДЫ

Бенько Е.М., Мамлеева Н.А., Харланов А.Н.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 3, ГСП-1

E-mail:benko_elena@mail.ru

Исследована делигнификация соломы пшеницы при обработке озоном. Определена зависимость содержания остаточного лигнина от удельного поглощения озона. Данные ИК- и КР-спектроскопии образцов соломы различной степени делигнификации отражают динамику озонолитической деструкции лигнина. Показано согласованное удаление лигнина и гемицеллюлоз соломы. В широком интервале расходов озона аморфизации целлюлозы не наблюдается. Установлена связь между расходом озона и реакционной способностью озонированной соломы в процессах ферментативного гидролиза в сахара. Оптимальный расход озона составляет ~2-3 мол. экв. О₃ на фенилпропановую структурную единицу (ФПЕ) содержащегося в соломе лигнина.

Ключевые слова: озон, лигнин, делигнификация, солома пшеницы, растительное сырье

Биотехнологическая переработка возобновляемого растительного сырья позволяет получать разнообразные коммерчески востребованные продукты, включая этанол из целлюлозы (биотопливо второго поколения). Помимо отходов от заготовки и переработки древесины, перспективным сырьём для биоконверсии могут быть сельскохозяйственные отходы, состоящие, в основном, из однолетней биомассы. В России - это преимущественно солома злаковых культур [1].

Характерными особенностями однолетних растений являются относительно низкое содержание лигнина и тонкостенная структура. Это, в целом, облегчает процесс предварительной делигнификации лигноцеллюлозной биомассы, цель которой повысить доступность целлюлозы для ферментов. Обработка растительного сырья озоном имеет ряд преимуществ перед другими методами делигнификации, что обусловлено высокой активностью и селективностью озона по отношению к лигнину и экологической безопасностью процесса [2].

Для выяснения общих закономерностей деструкции лигноцеллюлозной биомассы при озонировании и оптимизации метода озонной делигнификации в настоящей работе изучена динамика структурных превращений лигноуглеводного комплекса соломы пшеницы с помощью ИК-спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния. Также проанализирована взаимосвязь между расходом озона, содержанием лигнина, структурными характеристиками растительного субстрата и его реакционной способностью в процессах ферментативного гидролиза в сахара.

Исследовали образцы соломы пшеницы (*Triticum L.*) с содержанием лигнина (ЛГ) - 20%, целлюлозы (ЦЛ) - 40%, гемицеллюлоз (ГЦ) - 24%. Размер частиц 0,6-1,0 мм. Для озонирования использовали образцы с содержанием воды ~ 100% на грамм абсолютно-сухого материала. Озонирование проводили в проточном реакторе при комнатной температуре. Методика озонирования и расчет количества поглощенного озона (удельный расход) описаны в [3-5]. Озонированные образцы промывали водой и высушивали на воздухе.

Содержание лигнина определяли по стандартной методике с помощью двухстадийного гидролиза серной кислотой.

ИК-спектры образцов регистрировали на ИК-Фурье спектрометре Equinox 55/S (Bruker) в режиме пропускания. Воздушно-сухие образцы предварительно промытой соломы дополнительно измельчали, смешивали с KBr в соотношении 1:850 и прессовали.

Спектры КР регистрировали на приборе Bruker Equinox 55/S, с приставкой FRA 106/S. Длина волны возбуждающего излучения 1064 нм, мощность лазера 850 мВт, размер пятна 0,1 мм. Экспериментальные спектры КР корректировались вычитанием фона и нормировались к интенсивности полосы 1096 см^{-1} в программе OPUS 6.0 (Bruker).

Ферментативный гидролиз проводили с использованием коммерческого препарата целлюлазного комплекса *Trichoderma Viride* «Целловиридин Г 20 X» (50°C ; pH5,0; 48 час) Общее количество восстанавливающих сахаров определяли по методу Шомоди-Нельсона. Содержание глюкозы анализировали колориметрически глюкозо-оксидазным методом, используя набор реактивов «Глюкоза-Агат» фирмы ООО «Агат-Мед».

Характеристика исследованных образцов (время озонирования, удельный расход озона, содержание лигнина и степень делигнификации) приведены в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика образцов соломы пшеницы

№ образца	1	2	3	4	5
Время озонирования, мин	0	15	30	90	240
Удельный расход озона, ммоль/г	0	0,8	2,0	3,2	7,0
Содержание лигнина, %	19,1	15,5	10,1	7,3	6,6
Степень делигнификации, %	0	42	53	62	65

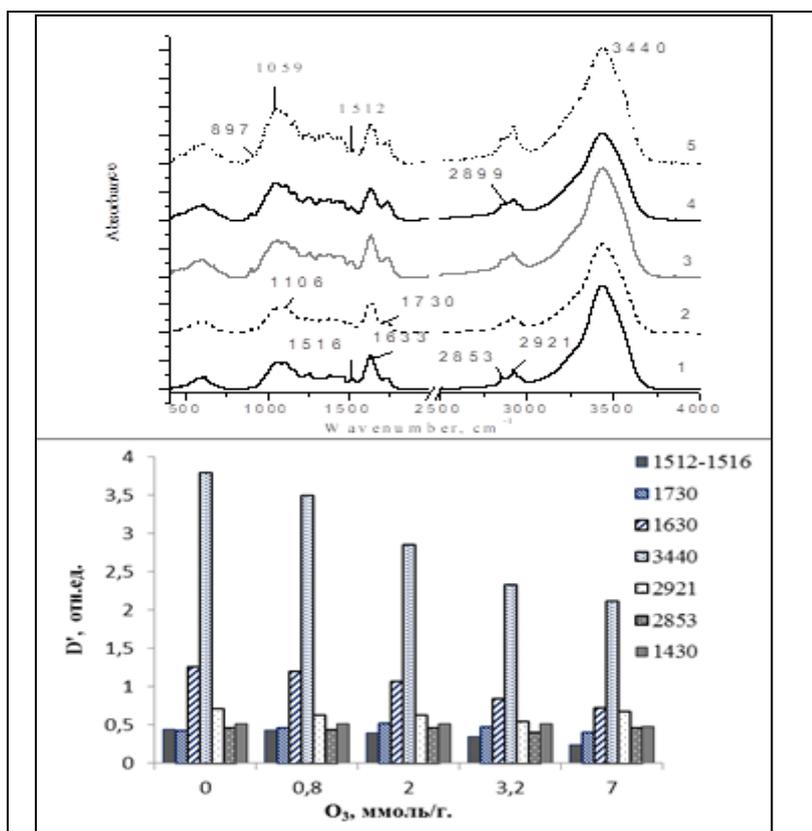


Рис.1. ИК спектры поглощения образцов озонированной соломы (а). Относительная оптическая плотность ($D'_v = D_v/D_{1059}$) ИК-полос поглощения озонированных образцов (б). Удельный расход озона, ммоль/г: 0 (1); 0,8 (2); 2,0 (3); 3,2 (4); 7,0 (5).

D'_{1430} валентных колебаний ароматических структур также уменьшается.

Полоса поглощения 1730 см^{-1} валентных $\text{C}=\text{O}$ колебаний карбоксильных групп кислот и сложных эфиров, а также карбонильных групп, характерных для гемицеллюлоз. Значение D'_{1730} возрастает при поглощении первых порций озона. Содержание карбоксильных и карбонильных групп в образце, невелико и уменьшается при увеличении расхода озона (образцы 4 и 5).

На рис. 1 представлены ИК спектры поглощения образцов соломы пшеницы при различных значениях удельного расхода озона. Обработка озоном приводит к изменениям оптической плотности многих полос поглощения. Особенно заметно возрастание оптической плотности (D) полосы поглощения 1059 см^{-1} , соответствующей $\text{C}-\text{O}$ валентным колебаниям $\text{C}_3\text{H}-\text{OH}$ группы целлюлозы [1], что указывает на возрастание содержания целлюлозы в озонированных образцах. На рисунке 2 приведены значения относительной оптической плотности $D'_v = D_v/D_{1059}$ некоторых полос поглощения. Полоса 1630 см^{-1} представляет собой суперпозицию валентных $\text{C}-\text{C}$ колебаний ароматического кольца (1595 см^{-1}) и деформационных $\text{O}-\text{H}$ колебаний кристаллизационной воды. Симбатный характер изменения D'_{1630} и D'_{1513} по мере увеличения расхода озона свидетельствует о разрушении ароматики. Значение

Интенсивность полосы поглощения при 3430 см^{-1} (валентные колебания ОН - групп, участвующих в водородных связях) в спектрах озонированных образцов снижена.

Полуширина полосы увеличивается в направлении области с более низкими волновыми числами от 240 см^{-1} (исходный образец) до 300 см^{-1} в (спектр 5) по мере увеличения количества поглощенного озона, что свидетельствует об образовании более сильных водородных связей и является следствием удаления части аморфной фазы (лигнина и гемицеллюлозы). Таким образом, анализ ИК- спектров показывает, что обработка озоном соломы пшеницы приводит к удалению части лигнина и увеличению содержания целлюлозы.

На рис. 2 приведены спектры КР и изменения относительной интенсивности некоторых характеристических полос поглощения структурных элементов биомассы в зависимости от количества поглощенного озона. Интерпретация полос поглощения представлена в табл. 2.

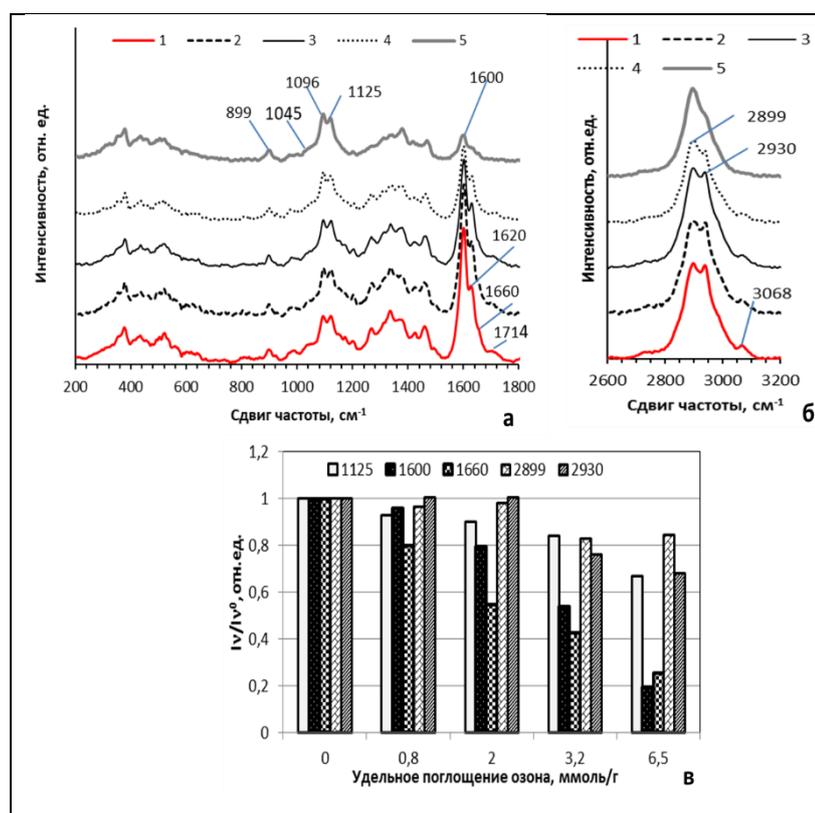


Рис.2. Спектры КР образцов озонированной соломы в интервале $200\text{-}1800\text{ см}^{-1}$ (а) и $2600\text{-}3200\text{ см}^{-1}$ (б). Интенсивность полос в спектре КР в зависимости от удельного расхода озона (в). Удельный расход озона, ммоль/г: 0 (1); 0,8 (2); 2,0 (3); 3,2 (4); 7,0 (5).

разрушению. Согласно данным спектров КР, в широком интервале расходов озона аморфизации целлюлозы не происходит.

Спектры КР также свидетельствуют о том, что обработка соломы озоном вызывает деструкцию ароматических структур макромолекулы ЛГ. Это соответствует данным химического анализа содержания лигнина (таблица 1), согласно которым при удельном расходе озона ~ 2 ммоль/г содержание остаточного лигнина падает на $\sim 50\%$, а при расходе озона 7 ммоль/г, – на $\sim 70\%$.

В спектрах КР отчетливо видно уменьшение содержания структур ксилана в составе гемицеллюлоз озонированных образцов. Особенности состава гемицеллюлоз соломы пшеницы, в которых преобладают структуры ксилана, позволили с помощью спектров КР наблюдать корреляцию между содержанием лигнина и гемицеллюлоз в озонированных образцах и сделать вывод об их взаимосвязанном

Таблица 2. Характеристические полосы структурных элементов биомассы в спектре КР

Волновое число, см^{-1}	Компонент биомассы	Отнесение полосы
2930	ЛГ	валентные С-Н в CH_3 и OCH_3 (асимм.)
2899	ЦЛ+ГЦ (ксилан)	валентные С-Н и С-Н ₂
1660	ЛГ	валентные С=C, сопр. с ар. кольцом в кониферил. альдегиде
1600	ЛГ	валентные С-С ароматического кольца (симм)
1125	ГЦ (ксилан)	валентные глюкопиранозного кольца

Данные КР и ИКС показывают, что и даже при относительно высоких значениях удельного поглощения озона (~ 7 ммоль/г) интенсивность полос, характерных для ароматического кольца лигнина, остается достаточно высокой., т.е. часть лигнина мало доступна озону [3-5].

В процессе озонолитической деструкции лигнина образуются кислоты (щавелевая, глиоксалева, муравьиная и др.) с высокой концентрацией. В условиях кислой среды происходит частичный гидролиз сложноэфирных связей в структуре биомассы. При последующей обработке озонированных образцов водой продукты озонирования и гидролиза удаляются. В результате содержание лигнина и гемицеллюлоз в образце существенно уменьшается.

Зависимость выхода восстанавливающих сахаров (ВС) и глюкозы (ГЛ) при ферментативном гидролизе соломы от количества поглощенного озона приведена на рис.3. Пунктирная кривая отражает процесс удаления лигнина в ходе озонирования.

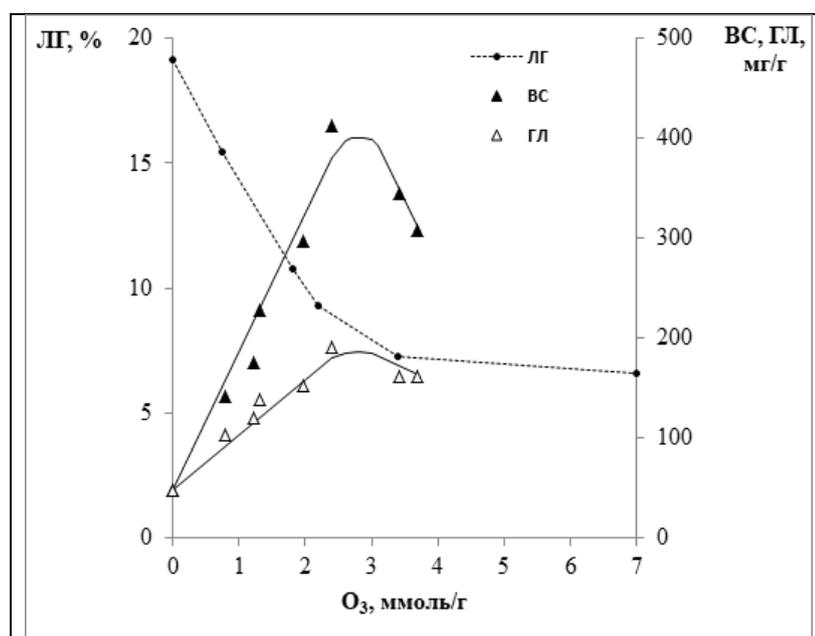


Рис.3. Содержание остаточного лигнина (ЛГ) и выход восстанавливающих сахаров (ВС) и глюкозы (ГЛ) при ферментативном гидролизе соломы пшеницы в зависимости от количества поглощенного озона.

Как видно из рисунка, содержание лигнина практически линейно падает, а выход сахаров линейно возрастает по мере увеличения дозы поглощенного озона. Максимальное значение выхода ВС на порядок выше, чем у необработанного субстрата. Оно достигается при расходе O_3 2,5-3 ммоль O_3 /г, что в пересчете на фенилпропановую (ФПЕ) структурную субъединицу ЛГ, содержащегося в образце, составляет $\sim 2,5-3$ экв. O_3 /ФПЕ. Полученные результаты косвенно свидетельствуют о том, что на начальной стадии озонирования озон преимущественно расходуется на взаимодействие с неопределёнными структурными фрагментами лигнина. Однако при удалении более 60% лигнина эффективность делигнификации

резко падает, а выход продуктов ферментативного гидролиза уменьшается. Полученный результат находится в соответствии с представлением о том, что лигнин, содержащийся в лигноцеллюлозной биомассе, является основным препятствием для ферментов в процессе гидролиза целлюлозы.

В результате обработки озоном в растительном субстрате происходят структурные изменения. Согласно данным сканирующей электронной микроскопии [4], клеточные стенки озонированной соломы теряют жесткость, деформируются. При частичном удалении лигнина и гемицеллюлозы между микрофибриллами целлюлозы (МФЦ) образуется пространство для свободного проникновения воды и реагентов, диаметр МФЦ заметно увеличивается, что является следствием набухания целлюлозы. Такие превращения приводят к возрастанию реакционной способности субстрата. Однако при больших дозах озона МФЦ слипаются, образуя более компактную структуру.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии оптимальной степени делигнификации соломы пшеницы - расход озона 2-3 ммоль/г (2-3 моль O_3 /моль ФПЕ), содержание остаточного лигнина 10%, когда целлюлоза становится более доступной для ферментов в процессах биоконверсии в сахара.

Благодарности. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Нанохимия и наноматериалы» при Химическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках Госбюджетной темы: «Физикохимия поверхности, адсорбция и катализ» ААА-А21-121011990019-4.

Библиографический список

1. Сеницын А.П., Сеницына О.А. Биоконверсия возобновляемой растительной биомассы на примере биотоплива второго поколения: сырье, переработка, ферменты, процессы, экономика // Успехи биологической химии, т. 61, 2021, с. 347–344.
2. Travaini R.S. Ozonolysis: An advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited // *Bioresour. Technol*, 2016, Vol. 199, pp.2-12.
3. Бенько Е.М., Чухчин Д.Г., Мамлеева Н.А., Харланов А.Н., Лунин В.В. Озонолитическая делигнификация соломы пшеницы // *Ж. физ. химии*, 2020, т. 94, № 8, с. 1153-1160.
4. Ben'ko E.M., Chukhchin D.G., Lunin V.V. Changes in wheat straw cell walls during ozone pretreatment // *Holzforschung*, 2020, v. 74, N 12, P. 1157-1167.
5. Мамлеева Н.А., Бенько Е.М., Харланов А.Н., Шумянцев А.В. Превращения лигноуглеводного комплекса *Triticum L.* при делигнификации озоном // *Ж. физ. химии*, 2022, т. 96, № 11, с. 1584-1592.

УДК 637.072:664.292

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЯБЛОК МЕЛКОПЛОДНЫХ СОРТОВ АЛТАЙСКОГО КРАЯ

Д.И. Болдинов, Е.В. Аверьянова, М.А. Стасюк
ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет
им. И.И. Ползунова», Барнаул, Россия

Аннотация. В связи с ухудшением экологических условий актуальным становятся вопросы разработки и применения в технологии продуктов питания физиологически функциональных компонентов, способных оказывать благоприятное воздействие на метаболические процессы в организме человека и нивелировать влияние отрицательных факторов внешней среды. Рассмотрена возможность выделения пектиновых веществ из мелкоплодных сортов яблонь, районированных в Алтайском крае; доказано высокое качество экспериментальных образцов пектина, соответствующее требованиям нормативной документации. Незначительное отклонение свойств пектинов различных сортов яблок позволяет при масштабировании перерабатывать сырье совместно.

Ключевые слова: мелкоплодные сорта яблони, пектин, органолептические свойства, физико-химические показатели

QUALITY ASSESSMENT OF PECTIN SUBSTANCES ISOLATED FROM SMALL- FRUIT APPLE VARIETIES OF THE ALTAI REGION

D.I. Boldinov, E.V. Averyanova, M.A. Stasyuk
Altai State Technical University named after I.I. Polzunov, Barnaul, Russia

Annotation. Due to the deterioration of environmental conditions, the issues of development and application in food technology of physiologically functional components capable of exerting a beneficial effect on metabolic processes in the human body and neutralizing the influence of negative environmental factors are becoming relevant. The possibility of isolating pectin substances from small-fruited apple varieties zoned in the Altai Territory is considered; the high quality of experimental pectin samples, corresponding to the requirements of regulatory documentation, is proven. Minor deviations in the properties of pectins of different apple varieties allow for joint processing of raw materials during scaling.

Key words: pectin, small-fruited apples, organoleptic and physicochemical properties of pectin

Ухудшение экологических условий, сопровождающихся загрязнением всех компонентов биосферы, в том числе пищевых продуктов тяжелыми металлами, токсическими веществами и радионуклидами, оказывают негативное влияние на здоровье населения. В связи с этим важной задачей является создание и применение в технологии продуктов питания физиологически функциональных компонентов, способных оказывать благоприятное воздействие на процессы в организме и нивелировать влияние отрицательных факторов. Таким эффектом обладают вещества, обладающие высокой сорбционной и комплексообразующей способностью, к которым относят и природные пищевые волокна. Как известно, существует шесть основных типов пищевых волокон, среди которых лидирующие позиции для пищевых систем занимают пектиновые вещества [1].

По химической структуре пектиновые вещества относятся к классу полисахаридов, содержащихся в растительном сырье, и являются основным его функциональным компонентом, выполняя множество различных жизненно важных функций. Согласно принятой в отрасли

классификации, различают нерастворимый протопектин, растворимые пектиновые полисахариды и сопутствующие им галактаны, арабинаны и арабиногалактаны. Гликаногалактуронаны – кислые растительные полисахариды, главную углеводную цепь которых составляют 1,4-связанные остатки α -D-галактопиранозилуруновой кислоты [2].

Пектиновые вещества входят в состав растительных клеток в виде частично этерифицированных метанолом по карбоксильной группе полимеров часто в виде солей кальция, натрия и магния [3] (рис. 1).

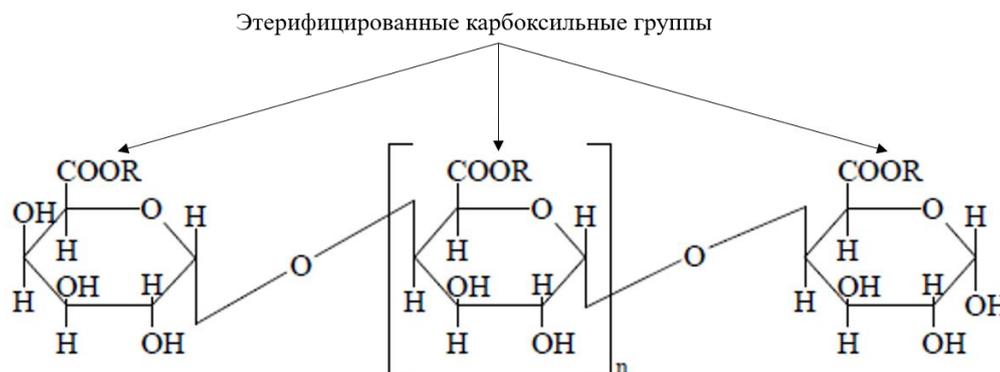


Рисунок 1 – Химическое строение пектиновых веществ [3]

Благодаря комплексообразующей способности пектиновые вещества обладают широким спектром лечебно-профилактических свойств: нормализуют работу желудочно-кишечного тракта и сердечно-сосудистой системы, обладают свойством коррекции липидного обмена, что предполагает применение пектинсодержащих пищевых продуктов в комплексной терапии синдрома раздраженного кишечника, желчнокаменной болезни, атеросклероза и связанных с ним заболеваний, ожирения, сахарного диабета и др. [4].

Основные промышленные виды пектина – цитрусовый и яблочный, крупнейшими производителями которых являются компании «Yantai Andre Pectin» (Китай), «CP Kelco» (США), «Kopenhagen pectin fabric» (Дания), «Herbstreith & Fox KG» (Германия) [5]. В России в настоящее время отсутствует промышленное производство пектина. Возможные причины:

1) отсутствие технологии производства пектина в России. Классическая технология производства пектина имеет негативное влияние на окружающую среду в виду использования кислот и образования вредных отходов [6];

2) отсутствие сырья в необходимом количестве. Предприятия производства соков из яблок за последние 10 лет начали масштабно применять ферменты для повышения выхода сухих веществ при отжиме, поэтому содержание пектина в выжимках снизилось [6].

Регионами-лидерами по производству яблок являются Кабардино-Балкария, Краснодарский и Ставропольский края, Тульская, Тамбовская, Липецкая, Волгоградская области [6].

Алтайский край так же известен своими яблоневыми садами, представленными в основном насаждениями мелкоплодных яблонь (ранеток) зимних сортов. Наряду с высокими вкусовыми качествами ранеток, известно, что в их плодах содержится большое количество пектиновых веществ, массовая доля которых составляет от 0,93 % у сорта «Красноярский снежирек» до 2,00 % и более «Добрыня», «Ранетка пурпуровая», «Фонарик» [7], «Янтарная» [8].

На основании литературных данных по содержанию пектина и распространенности на территории Алтайского края для выделения пектина и оценке его качества были выбраны плоды мелкоплодных яблонь зимних сортов «Добрыня», «Сибирячка», «Золотая», «Янтарная», «Красная» урожая 2023 года. Из выжимок яблок исследуемых сортов был получен пектин традиционным способом, ключевым этапом которого является процесс экстракции в кислой среде при температуре 80 °С, pH = 3, с гидромодулем 1:4 в течение 1 ч. Пектин из раствора осаждали этиловым спиртом, центрифугировали и высушивали до влажности 7,7 – 9,2 % конвективным способом [3]. Выход пектина, в пересчете на выжимки, в порядке уменьшения,

составил: 3,64 % для сорта «Добрыня», 3,46 % – «Янтарная», 3,33 % – «Золотая», 2,98 % – «Сибирячка» и 2,74 % – «Красная».

Внешний вид экспериментальных образцов пектина, в сравнении с контрольным образцом (коммерческий образец яблочного пектина «Yantai Andre Pectin» (Китай)) показан на рис. 2.



Рисунок 2 – Внешний вид образцов яблочного пектина

Исследование органолептических и физико-химических свойств экспериментальных образцов пектина в сравнении с контрольным образцом проводили в соответствии с ГОСТ 29186-91 Пектин. Технические условия. Результаты определения органолептических свойств образцов пектина представлены в табл. 1.

Таблица 1

Органолептические показатели экспериментальных образцов пектина

Сорт яблок/ нормативный документ	Внешний вид	Вкус	Запах	Цвет
По ГОСТ 29186-91	Порошок тонкого помола без посторонних примесей. Допускается наличие волокнистой фракции пектина в виде хлопьев	Слабокислый	Отсутствует	От светло- серого до кремового
«Добрыня»	Порошок тонкого помола без посторонних примесей	Слабокислый, вяжущий	Легкий яблочный флёр	Светло- коричневый
«Сибирячка»		Кисло-сладкий, вяжущий		Светло- розовый
«Золотая»		Кисло-сладкий, вяжущий		Бежевый
«Янтарная»		Слабокислый, вяжущий		Кремовый
«Красная»		Слабокислый, вяжущий		Кремовый

Из табл. 1 видно, что пектины сортов мелкоплодных яблок отличаются друг от друга по цвету и вкусу, что связано, по-видимому, с выделением из кожуры красящих веществ (антоцианов) при экстракции пектина. Для стандартизации пектина и соответствия органолептических свойств ГОСТ необходимо проводить промывку сырья водой для удаления водорастворимых веществ: сахаров, антоцианов, органических кислот.

Таблица 2

Физико-химические показатели экспериментальных образцов пектина, $M \pm m, n=3$

Наименование показателя	Характеристика / Количественный показатель					
	По ГОСТ 29186-91	«Добрыня»	«Сибирячка»	«Золотая»	«Янтарная»	«Красная»
Массовая доля влаги, %	Не более 10	7,7±0,1	8,3±0,1	9,1±0,1	9,2±0,1	7,9±0,1
Степень этерификации, %	Тип А >70	67,3±0,2	64,4±0,3	65,9±0,3	67,0±0,2	61,1±0,2
	Тип Б 67-69					
	Тип В 60-66					
Желеобразующая способность, мин	-	120±5	120±5	120±5	120±5	120±5
Посторонние примеси, видимые невооруженным глазом	Не допускаются	Отсутствуют				
Массовая доля частиц волокнистой фракции размером более 0,5 мм, %	Не более 20	2	5	5	6	3

По данным табл. 2 можно сделать вывод, что пектиновые вещества мелкоплодных яблок Алтайского края по физико-химическим свойствам соответствуют ГОСТ, при этом обладают желеобразующей способностью, определяющей использование пектина в пищевой промышленности. Пектин сортов «Добрыня» и «Янтарная» относятся к типу Б (средней садки), пектин сортов «Сибирячка», «Золотая» и «Красная» – к типу В (медленной садки).

Таким образом, сорта мелкоплодных яблок Алтайского края «Добрыня», «Янтарная», «Золотая», «Сибирячка», «Красная» могут являться сырьем для производства пектина для отечественного рынка функциональных пищевых ингредиентов. Пектиновые вещества из перечисленных сортов яблок по своим физико-химическим свойствам соответствуют ГОСТ 29186-91, обладают выраженной желеобразующей способностью. Отклонения органолептических свойств от нормы указывает на необходимость введения в технологию дополнительной операции очистки сырья от водорастворимых соединений: сахаров, красящих веществ (антоцианов) и органических кислот. Незначительное отклонение свойств пектинов различных сортов яблок позволяет перерабатывать сырье совместно для получения качественного пектина.

Благодарности. Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки РФ (№ 075-03-2024-105, номер темы FZMM-2024-0003, рег. № НИОКТР 124013000666-5).

Библиографический список

1. Зобкова, Н.В. Пектины как средства детоксикации. Комплексообразующие свойства пектинов / Н.В. Зобкова, Е.И. Глушихина // Оренбургские горизонты: прошлое, настоящее, будущее: сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 275-летию Оренбургской губернии и 85-летию Оренбургской области (г. Оренбург, 2019 г.). – Оренбург, 2019. – С. 314-317.
2. Новейшие сведения о пектиновых полисахаридах / Р.Г. Оводова, В.В. Головченко, С.В. Попов, Ю.С. Оводов // Известия Коми научного центра УРО РАН. – 2010. – № 3 (3). – С. 37-45.
3. Аверьянова, Е.В. Пектин: методы выделения и свойства: методические рекомендации / Е.В. Аверьянова, М.Н. Школьников – Бийск: Изд-во АлтГТУ, 2015. – 42 с.
4. Донченко, Л.В. Пектин: основные свойства, производство и применение: монография / Л.В. Донченко, Г.Г. Фирсов. – М. : ДеЛиПринт, 2007. – 276 с.

5. Павлова, И.О. Анализ рынка пектиносодержащей продукции / И.О. Павлова, Н.В. Изгарышева // Пищевые инновации и биотехнологии: сборник тезисов X Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (г. Кемерово, 2022 г.). – Кемерово, 2022. – С. 601-603.
6. БИОТЕХ 2030: [сайт]. – URL: <http://biotech2030.ru/pochemu-v-rossii-ne-proizvodyat-pektin-prichiny-fakty-perspektivy/> (дата обращения: 08.07.2024). – Текст: электронный.
7. Типсина, Н.Н. Мелкоплодные яблоки Сибири в функциональном питании / Н.Н. Типсина, Н.В. Цугленок // Вестник КрасГАУ. – 2009. – № 1. – С. 152-155.
8. Ершова, И.В. Биологически активные соединения плодов алтайских сортов яблони / И.В. Ершова // Садоводство и виноградарство. – 2017. – № 6. – С. 48-53.

ПЕРЕРАБОТКА ЛЬНА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

В.С. Болтовский, В.Л. Флейшер, М.В. Андрюхова

Белорусский государственный технологический университет, г. Минск, Республика Беларусь

Аннотация. Рассмотрено состояние и перспективы новых направлений переработки льна в Республике Беларусь с учетом его компонентного состава для получения инновационных видов продукции. Приведены результаты исследований по определению состава семян льна белорусской селекции, основных компонентов волокон льна-долгунца и после различных стадий его обработки. Разработан способ получения альфа-целлюлозы из котонизированного волокна льна для последующего использования ее в технологии высокоэнергетических материалов. Показано, что волокна льна-долгунца могут быть использованы для получения альфа-целлюлозы наряду с хлопком. Из семян льна белорусской селекции перспективно не только извлечение масла, но и камеди как альтернативы импортным гуаровой и ксантановой камедям, а также других биологически активных компонентов.

Ключевые слова: лен-долгунец, масличный лен, волокно льна, альфа-целлюлоза, семена льна, льняное масло, камедь

Введение. В настоящее время в мире возрастает интерес к промышленной переработке постоянно возобновляемых ресурсов растительного сырья, в т. ч. льна. По мнению Организации Объединенных Наций, лен является ценным материалом XXI века, что определяет его значимость и перспективность использования [7]. Лен (преимущественно масличный и долгунец) традиционно возделывается и перерабатывается во многих странах мира, в т. ч. Республике Беларусь, и является одним из приоритетных направлений развития агропромышленного комплекса и перерабатывающих отраслей промышленности. Наиболее крупными его производителями являются Франция, Бельгия, Беларусь, Россия, Китай, Украина, Египет и др. [6].

Республика Беларусь занимает одно из лидирующих мест в мире по объемам производства и переработки льна-долгунца. В Беларуси в настоящее время работают более 20 льнозаводов, одним из наиболее крупных является РУПТП «Оршанский льнокомбинат». Посевная площадь льна-долгунца по данным Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь в 2023 г. составила 45,7 тыс. га. На 2021–2025 гг. запланировано 49,6 тыс. га, что достаточно для производства 180 тыс. т льнотресты в год. Однако основной областью промышленной переработки льняных волокон является производство текстильных материалов. В то же время благодаря достаточно высокому содержанию целлюлозы перспективно использование волокон льна в качестве источника сырья для получения целлюлозы и альфа-целлюлозы.

Наряду с переработкой волокон льна актуально получение новых видов функциональных продуктов из семян льна. Традиционно переработка семян льна заключается в получении льняного масла, в то время как в некоторых странах из них выделяют растительные белки, лигнаны, водорастворимые полисахариды и другие биологически активные вещества.

По данным [4, 2] стоимость извлекаемых из 1 т льна биологически активных веществ может составлять 80 тыс. долларов США. Поэтому исследования, направленные на создание технологии комплексной и глубокой переработки волокон и семян льна являются актуальными. В данной статье на основе литературных данных и собственных исследований предложены наиболее перспективные направления переработки волокон и семян льна в Республике Беларусь.

Методы и методики исследований. В волокнах льна-долгунца, предоставленных РУП «Институт льна» НАН Беларуси и РУПТП «Оршанский льнокомбинат», определяли содержание альфа-целлюлозы, лигнина и зольных элементов. В различных сортах семян льна масличного

(Дар, Альянс, Славянин) и долгунца (Гранд, Эверест, Лада, Дукат, Акцент, Мара, Фалер) белорусской селекции, предоставленных РУП «Институт льна» НАН Беларуси, определяли содержание легкогидролизуемых полисахаридов (ЛГПС), протеина и жира. Все показатели определяли по ГОСТ и принятым в химии растительного сырья методам [3]. Жирнокислотный состав масла определяли методом ГЖХ (на хроматографе Agilent 7820A GC (Agilent Technologies, США), оснащенный пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой HP-Innowax 0,25мм×30м×0,25мкм (полиэтиленгликоль). Анализ проводили при скорости потока гелия 20 см³/с; температуре колонки 220°C, инжектора и детектора – 250°C).

Для получения альфа-целлюлозы *волокна льна* подвергали обработке в две стадии: 1 – кислотами (уксусной, серной, азотной) или щелочью в присутствии пероксида водорода и 2 – облагораживание химическими реагентами с использованием или без пероксида водорода. Важно отметить необходимость использования дистиллированной воды в процессе обработки. Продолжительность обработки 0,5–2,0 ч, температура 25–100 °С.

Результаты исследований и их обсуждение. Перспективность использования целлюлозы льна вместо хлопковой целлюлозы для изготовления высокоэнергетических материалов обусловлена повышенными на 5–10% энергетическими характеристиками изготавливаемых порохов, а также большей их стабильностью [1, 5].

Результаты определения основных компонентов в длинном *волокне*, предоставленном РУП «Институт льна» НАН Беларуси, и *волокнах* льна после различных стадий обработки на РУПТП «Оршанский льнокомбинат» (табл.) позволили выбрать волокно для дальнейшей переработки с целью получения альфа-целлюлозы.

Как видно из таблицы, все образцы волокна имеют сопоставимые значения по содержанию альфа-целлюлозы, лигнина и золы, но существенно уступают хлопковому, в котором содержание лигнина составляет 0,42%, альфа-целлюлозы и золы, соответственно 97,24 и 0,12% от массы абсолютно сухого сырья (а. с. с.). Таким образом, в качестве перспективного сырья для получения альфа-целлюлозы из волокон льна можно использовать котонизированное отбеленное волокно льна, однако для получения альфа-целлюлозы, или так называемой целлюлозы для химической переработки, с последующим использованием ее в технологии высокоэнергетических материалов (нитратов целлюлозы) необходимо дополнительно уменьшить содержание лигнина и зольных элементов, что будет способствовать улучшению качества целевых продуктов.

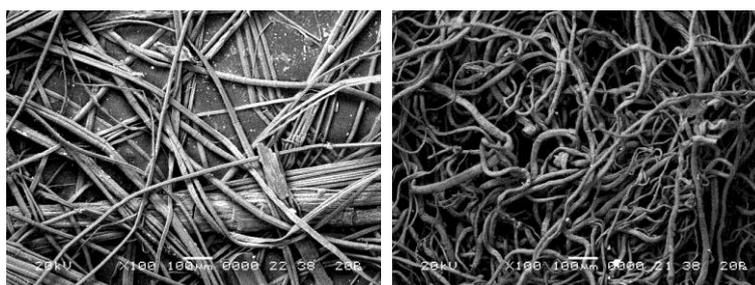
Таблица 1.

Содержание ЛГПС*, лигнина, альфа-целлюлозы и золы в волокне льна

Волокно	Содержание, % от массы а.с.с.			
	ЛГПС*	Лигнин (по методу Комарова)	Альфа- целлюлоза, ГОСТ 6840–78	Зольность, ГОСТ 18461-93
Отбеленное волокно	6,85	2,00	87,35	0,79
Отваренное волокно	4,99	2,80	89,23	1,36
Котонизированное волокно	7,86	3,46	83,37	0,98
Котолен исходный	7,29	4,70	80,32	1,17
Очес	8,18	4,70	81,89	1,31
Длинное волокно	8,77	5,70	80,04	1,78

* ЛГПС – легкогидролизуемые полисахариды в пересчете на пентозаны.

Важно отметить, что в основе принципов снижения содержания лигнина и повышения содержания альфа-целлюлозы в волокне льна лежат способы их обработки, отличающиеся от применяемых для древесной целлюлозы. Кроме этого, необходимо не только достижение требуемых физико-химических свойств получаемой целлюлозы, но и структуры волокон. Разработанный нами способ обработки волокон льна гидроксидом натрия в присутствии пероксида водорода при стандартной температуре с последующим кипячением в воде позволяет значительно увеличить содержание альфа-целлюлозы (до 94% и более), снизить содержание лигнина и улучшить морфологические свойства волокон льна (рис. 1).



a *б*

Рисунок 1. Микрофотографии волокон котольна до (*a*) и после обработки (*б*)

В настоящее время в Беларуси в рамках Государственных программ выполняются работы, в задачи которых входит определение сорта льна, условий его возделывания и переработки для получения льноволокна с максимальным содержанием альфа-целлюлозы и минимальным содержанием примесей (БГТУ, РУП «Институт льна» НАН Беларуси), разработка технологии получения альфа-целлюлозы и высокоэнергетических материалов (нитратов целлюлозы и образцов порохов) на основе целлюлозы из растительного сырья, произрастающего в Республике Беларусь, в том числе льна, и изучение возможности организации производства сульфитной целлюлозы и ее использования для получения пороха в смеси с целлюлозой хлопка или льна.

Результаты определения компонентного состава *семян* показали, что семена масличного льна наиболее перспективных сортов белорусской селекции содержат 40,64–42,89% жира, 18,80–20,60% сырого протеина и 11,36–13,70% ЛГПС. Семена льна долгунца содержат 29,73–34,92% жира, что незначительно меньше, чем в масличных семенах при сопоставимых значениях сырого протеина (22,71–25,75%) и ЛГПС (13,19–14,86%) в пересчете на пентозаны. В выделенном из семян льняном масле определено содержание жирных кислот, в котором преобладает α -линоленовая кислота и составляет в зависимости от вида и сорта 48,81–55,46%.

Состав и содержание основных компонентов семян льна свидетельствует о возможности и целесообразности получения в качестве товарных продуктов не только масла, но и камеди, пищевого белка и клетчатки.

Таким образом, разнообразие компонентного состава волокон и биохимического состава семян льна свидетельствует о целесообразности осуществления их глубокой переработки с получением востребованной продукции с высокой добавленной стоимостью.

Библиографический список

1. Лен в пороховой промышленности: научное издание / под ред. С.И. Григорова. – М.: ФГУП «ЦНИИМ», 2012. 248 с.
2. Миневич И.Э. Функциональная значимость семян льна и практика их использования в пищевых технологиях // *Heatch, Food & Biotechnology*. 1 (2). Р. 97–119.
3. Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. М.: Экология, 1991. 320 с.
4. Одинцов А.А., Шумаев В.А. Развитие комплексной переработки льна // *Дизайн и технология*. 2017. № 60(102). С. 92–100.
5. Сакович Г.В., Будаева* В.В., Корчагина А.А., Гисматулина Ю.А. Перспективы нитратов целлюлозы из нетрадиционного сырья для взрывчатых составов // *Химия растительного сырья*. 2019. № 1. с. 259–268.
6. Тавгень Е., Вразалица А. Мировой рынок льняной продукции: обзор // *Наука и инновации*. 2021. № 8 (222). С. 61–67.
7. Шаршунов В.А., Алексеенко А.С., Цайц М.В. Состояние льноводческой отрасли Республики Беларусь и пути повышения ее эффективности // *Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии*. 2019. № 2. С. 267–271.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ СОКА ИЗ ЯГОД *SORBUS AUCUPARIA*

Е.Е. Веремей, Н.А. Фролова

Калининградский государственный технический университет, Калининград, Россия

Аннотация. В последние десятилетия многие травы и плодово-ягодные сырьевые ресурсы вызывают повышенный интерес в качестве основных и дополнительных физиологически ценных ингредиентов. Вследствие нарушения сбалансированности питания с позиции недостаточного потребления минеральных компонентов, антиоксидантов, витаминов и т.д. Ресурсный сырьевой потенциал Калининградской области позволяет активно использовать растительные (плодово-ягодные) сырьевые ресурсы в технологиях пищевых продуктов для их обогащения микронутриентами. Объектами исследований в работе явились ягоды боярышника обыкновенного (*Sorbus aucuparia*), произрастающие на территории Калининградской области, собранные в сентябре 2023 года. В работе установлена оптимальная дозировка и вид ферментного препарата, влияющий на выход сока. Наилучшие результаты установлены при использовании пектолитических ферментов, причем увеличении дозы ферментных препаратов равномерно увеличивается выход сока в среднем при обработке Фруктоцим Коллор на 13 %, при обработке Рестинех XXL выход сока увеличивается в среднем на 17,7 % по сравнению с контролем. Однако стоит отметить, что наиболее активный предел насыщения пектолитическими ферментами происходит при дозе 0,03 %, при дальнейшем увеличении дозы происходит незначительное снижение выхода сока.

Ключевые слова: ферментные препараты, доза, ягоды, сок, химический состав.

Введение. Ресурсный сырьевой потенциал Калининградской области позволяет активно использовать растительные (плодово-ягодные) сырьевые ресурсы в технологиях пищевых продуктов для их обогащения микронутриентами.

Сырьевые ресурсы растительного происхождения по своему химическому составу относятся к источнику природных биологически ценных ингредиентов, физиологическое действие которых, достаточно изучено [1]. В отличие от фармакологических препаратов они безвредны при длительном употреблении, однако некоторые из них имеют определенные противопоказания. Ягоды обладают определённым физиологическим действием, в том числе способствуют восполнению дефицита нутриентов в питании, повышают неспецифическую резистентность организма к стресс-факторам среды обитания и экологически неблагоприятным природно-климатическим условиям.

Обычно для профилактики и лечения повреждающих эффектов стресса и повышения неспецифической резистентности организма используются препараты общеукрепляющего действия - адаптогены, антиоксиданты, витамины (А, Е, С и т.д.), препараты посредников и метаболитов стресс-лимитирующих систем [2]. Введение натуральных БАВ в пищевые продукты возможно только в определенных формах (соках, экстрактах и т.д.), что послужило целью настоящих исследований.

Цель исследования – установление дозы и типа ферментного препарата для получения сока из ягод *Sorbus aucuparia*. с наибольшим выходом.

Методы исследований. Химический состав сока ягод был определен на приборе методом ВЭЖХ.

Результаты исследований. К основным стадиям получения сока можно отнести: инспектирование ягод, обработка водой, подсушивание, извлечение сока прессованием, концентрирование соков и их хранение [3]. Для максимального извлечения сока применяют

ферментные препараты. В данной работе использовались следующие ферментные препараты: Фруктоцим колор, Pectinex XXL, Целлолюкс-А. Мацерацию растительной ткани обеспечивают выбранные ферментные препараты (Фруктоцим Колор, Pectinex XXL) пектолитического действия за счет последовательно-параллельного действия всех компонентов комплекса. Ферментные препараты (Целлолюкс-А) глюканолитического действия обладают способностью расщеплять целлюлозу и гемицеллюлозу и обладают комплексом элементов способных гидролизовать пектиновые вещества.

Дозировка ферментного препарата для исследования была выбрана в пределах от 0,01 – 0,04 % к массе перерабатываемого сырья. При этом была зафиксирована температура выдержки 40° С. По выходу сока путем прессования после ферментной обработки определяли оптимальную дозировку. В качестве контрольного образца выступал образец сока из ягод *Sorbus aucuparia* без предварительной ферментной обработки. Зависимости выхода сока от количества вносимого ферментного препарата представлена на рис. 1.

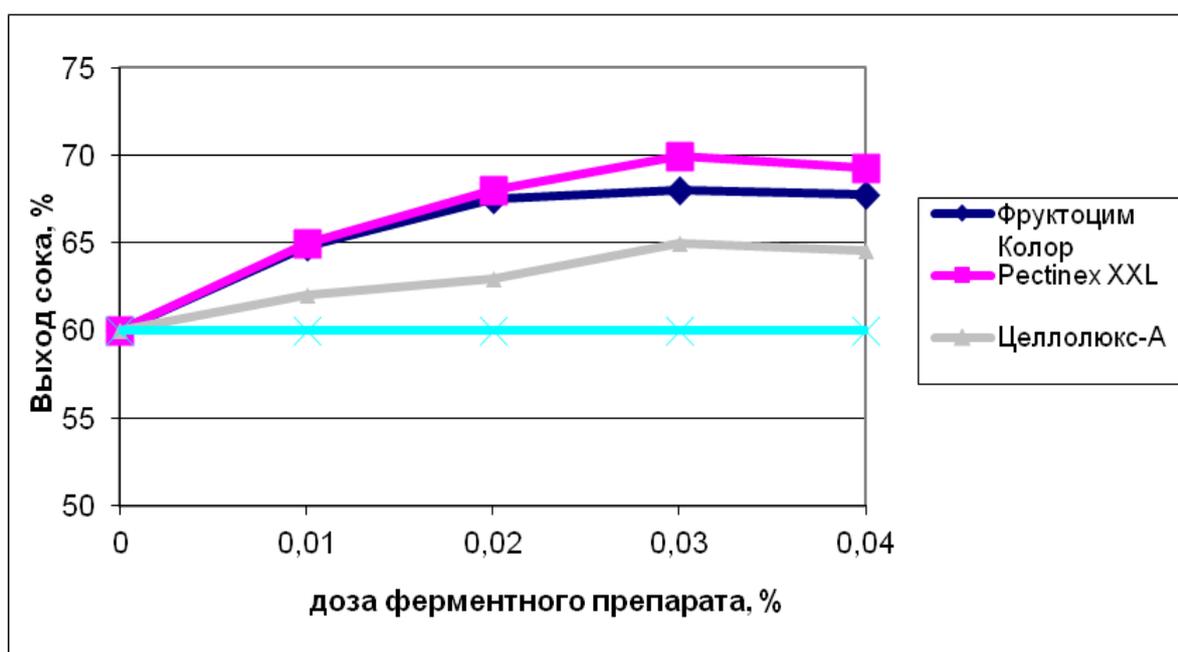
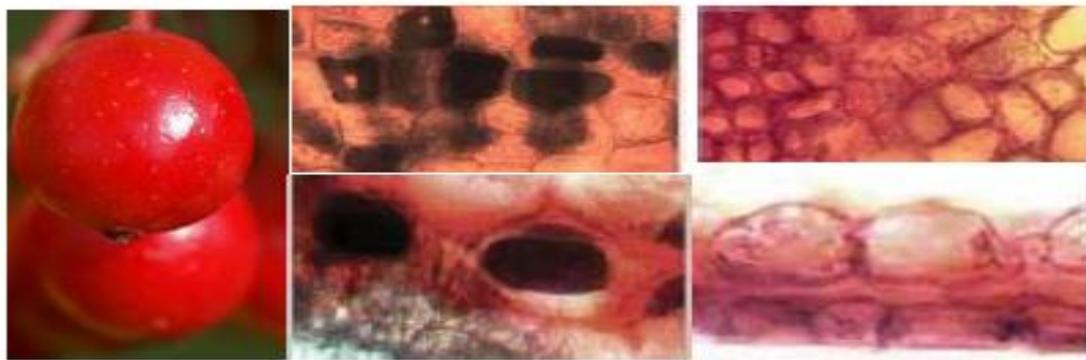


Рисунок 1. Зависимости выхода сока из ягод *Sorbus aucuparia* от количества вносимого ферментного препарата

Данные, полученные в ходе экспериментальных исследований, позволяют сделать вывод, что применение анализируемых ферментных препаратов для обработки ягодного растительного сырья при получении сока способствуют его увеличению. Наилучшие результаты установлены при использовании пектолитических ферментов, причем увеличении дозы ферментных препаратов равномерно увеличивается выход сока в среднем при обработке Фруктоцим Колор на 13 %, при обработке Pectinex XXL выход сока увеличивается в среднем на 17,7 % по сравнению с контролем.

Однако стоит отметить, что наиболее активный предел насыщения пектолитическими ферментами происходит при дозе 0,03 %, при дальнейшем увеличении дозы происходит незначительное снижение выхода сока.

Хотелось бы также отметить, что предварительное бланширование ягод перед получением сока разрушает полифенолоксидазу и помогает смягчить мембраны растительных клеток, высвобождая таким образом больше антоцианов из ткани и пектиновых веществ. Вовремя бланширования происходит процесс диффузии антоцианов из пигментированного эпидермиса. Так как антоцианы чувствительны к нагреванию процесс бланширования стимулирует разложение антоцианов в кожуре ягоде и способствует их переходу в сок.



1

2

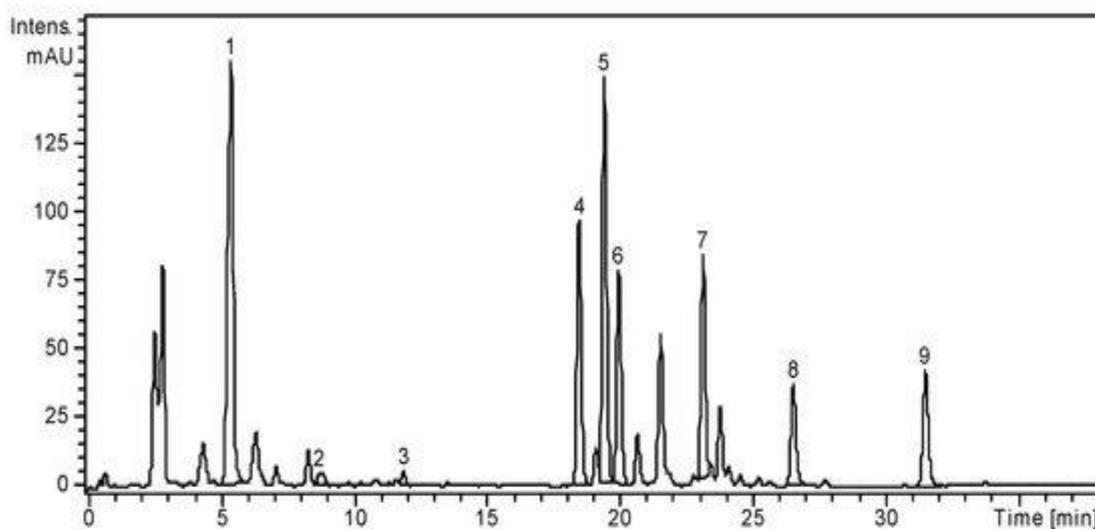
Рисунок 2. Влияние парового бланширования на диффузию пигмента (продольный разрез ягод): 1- не бланшированные ягоды *Sorbus aucuparia*, 2 - бланшированные ягоды *Sorbus aucuparia*

Таблица 1

Химический состав сока из ягод *Sorbus aucuparia*

Показатели	Сок <i>Sorbus aucuparia</i>
Массовая доля железа, мг/100 г	4,94±0,06
Пектиновые вещества, мг/100 г	0,82 ±0,02
Массовая доля витамина С, мг/100 г	72,41±2,42

Результаты (табл. 1 и рис. 2) свидетельствуют о том, что полученный сок из ягод *Sorbus aucuparia* содержит большое количество пектиновых веществ и витамина С. Если сравнивать с анализом литературных источников, содержание исследуемых микронутриентов выше в соке из ягод *Sorbus aucuparia*, чем, например, в яблочном [4].

Рисунок 3. ВЭЖХ хроматография сока из ягод *Sorbus aucuparia*

Заключение. Таким образом, общая схема получения сока из ягод включает в себя: инспектирование ягод (отбор целых неповрежденных плодов, исключение примесей органического и неорганического происхождения), обработку водой с температурой 25-28 °С, в течение 2 минут, подсушивание ягод, обработку ферментным препаратом Рестинех XXL в количестве 0,03 % к массе обрабатываемого сырья при температуре 40 °С в течение 110 минут, с последующим прессованием, концентрацией сока при помощи роторно-распылительной

установки при температуре 80-75 °С и давлении 4,9 кПа, с дальнейшей их обработкой и хранение соков в течение 1- 3 месяцев в стеклянной таре.

Библиографический список

1. Ульрих Е.В., Верхотуров В.В., Дышлюк Л.С., Фролова Н.А. Развитие биотехнологии в России // Актуальные проблемы прикладной биотехнологии и инженерии: Сборник материалов Международной научно-практической конференции, Оренбург, 21 июня 2023 года. – Оренбург: Оренбургский государственный университет, 2023. – С. 92-96.
2. Koryakina N. A., Stepanova N. N., Frolova N. A. [et al.] Natural plant raw materials in food design // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2022. Vol. 1045. No. 1. P. 012071.
3. Фролова Н.А., Резниченко И.Ю., Помозова В.А., Шкрабтак Н.В. Научно-практические основы биотехнологической переработки сырьевых ресурсов Амурской области для разработки технологий продуктов специализированного назначения. – Благовещенск: Амурский государственный университет. 2022. 140 с.
4. Хоконов А. Б. Исследование химического состава яблочного сока и спирта-сырца // Поколение будущего : сборник избранных статей Международной студенческой научной конференции, Санкт-Петербург, 31 марта 2022 года. – Санкт-Петербург: ГНИИ «Нацразвитие». 2022. С. 44-47.

УДК 54.05:547.972

КОМПЛЕКС ОЛИГОМЕРНЫХ ПРОАНТОЦИАНИДИНОВ ЛУБА КОРЫ БЕРЕЗЫ *BETULA PENDULA ROTH*: ВЫДЕЛЕНИЕ И СОСТАВ

Н.В. Гарынцева, А.В. Левданский, В.А. Левданский

Институт химии и химической технологии СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

Проведен сравнительный анализ выходов проантоцианидинов, выделенных из луба коры березы (*Betula pendula* Roth) водой, 15% водно-этанольным раствором и этилацетатом в аппарате Сокслета. Средний выход проантоцианидинов при экстракции луба коры березы составил, соответственно, при экстракции водой 1,20 %; 15 %-ным водно-спиртовым раствором – 1,44 % и этилацетатом в аппарате Сокслета – 1,46 %. Методами УФ-, ИК- и ¹³C ЯМР – спектроскопии изучен состав проантоцианидинов, выделенных 15 % водно-спиртовым раствором и этилацетатом в аппарате Сокслета. Показано, что в составе полученных проантоцианидинов присутствует галлоильная группа, что увеличивает антирадикальную активность полученных веществ. Установлено, что проантоцианидины луба коры березы в основном состоят из процианидина и прodelьфинидина.

Ключевые слова: луб коры березы, экстракция, этилацетат, проантоцианидины, процианидин, прodelьфинидин, галловая кислота

Введение

В настоящее время наиболее успешно и широко среди антиоксидантов применяются комплексы олигомерных проантоцианидинов (КОПЦ), которые считаются одними из наиболее важных биологически активных добавок [1]. В основе данных комплексов лежат две мономерные единицы – катехин и (-)-эпикатехин, а также их галлоильные производные. Благодаря способности этих соединений образовывать полимерные структуры из двух и более субъединиц, формируются КОПЦ [2].

Проантоцианидины представляют значительный интерес для современной медицины как группа биологически активных веществ, обладающих разнообразной фармакологической активностью: антиоксидантной, противовоспалительной, антиаритмической, гипотензивной и антирадикальной [3-5]. Они способны эффективно инактивировать радикалы, превосходя в этом в несколько раз витамины С и Е.

Источниками промышленного получения КОПЦ являются косточки винограда (*Vitis Sinifera*) и кора сосны (*Pinus maritima*). Несмотря на то, что КОПЦ встречаются во многих растениях, их содержание в подавляющем большинстве достаточно низкое и даже при оптимальных условиях экстракции выход конечного продукта не превышает 0,1 - 0,5 % от массы сухого исходного сырья, поэтому конечный продукт имеет высокую цену [6].

Это делает актуальным поиск новых источников сырья для получения КОПЦ. Работы, опубликованные нами ранее, были посвящены выделению и изучению проантоцианидинов коры деревьев хвойных пород - пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb), сосны обыкновенной (*Pinus Sylvestris* L.) и кедра сибирского (*Pinus sibirica*) [7-9]

Анализ литературных данных показал, что большинство работ, посвящены получению проантоцианидинов из коры хвойных пород деревьев, а также из пищевого сырья фруктов, ягод, виноградных косточек, из отходов (отжим) производств соков калины и других подобных отходов [10]. Широкий спектр биологической активности проантоцианидинов стимулирует поиск новых распространенных и дешевых растительных источников, а также разработку новых эффективных способов их выделения. Береза относится к числу основных лесобразующих пород деревьев средней полосы России. При её механической обработке образуется значительное количество отходов березовой коры, которые до настоящего времени не находят квалифицированного применения и чаще всего сжигаются.

Однако, в березовой коре содержится ряд ценных химических веществ, что стимулирует исследование по разработке эффективных и экономически приемлемых методов их извлечения. Березовая кора состоит из внешнего слоя (бересты) и внутреннего слоя (луба), которые значительно отличаются друг от друга по механическим характеристикам и химическому составу. Береста содержит большое количество тритерпеновых соединений (до 35 мас.%), среди которых преобладает бетулин [11]. Луб березовой коры содержит много полифлаваноидов, из которых наиболее ценными являются проантоцианидины.

В патентах [12-14] нами впервые было предложено осуществлять выделение проантоцианидинов из луба коры березы, из коры березы без предварительного разделения на бересту и луб наряду с выделением бетулина извлекать и проантоцианидины, а также получать проантоцианидины из бересты после извлечения из неё бетулина.

Целью работы являлось проведение сравнительного анализа выходов ПЦ, выделенные из луба коры березы с использованием различных растворителей и изучение их флавоноидного состава.

Экспериментальная часть

В качестве исходного сырья использовали луб коры березы повислой (*Betula pendula Roth*), заготовленный в июне 2023 г. в Емельяновском районе Красноярского края. Образцы коры отбирали с одновозрастных (45-50 лет) берез на расстоянии 1-2 м от комля. Перед использованием кору высушивали при температуре 100 ± 5 °С в течение 5–6 ч, измельчали. После просеивания отбирали фракцию 1-3 мм и досушивали ее до постоянного веса. Химический состав луба березы определяли по общепринятым в химии древесины методикам [15]. Содержание основных компонентов луба березы (% от массы а.с. коры): полисахариды – 48,9, из них легкогидролизуемые полисахариды – 25,4, трудногидролизуемые полисахариды – 23,1, лигнинные вещества – 34,9, водорастворимые вещества – 13,9, минеральные вещества – 3,4.

Выделение проантоцианидинов луба коры березы проводили двумя способами. Первый способ – выделение проантоцианидинов экстракцией луба водой и 15% водно-этанольным раствором. Второй способ выделения проантоцианидинов – экстрагированием луба этилацетатом в аппарате Сокслета.

Для изучения химического состава полученных проантоцианидинов их превращали в антоцианидины известным методом – нагреванием в этаноле в присутствии соляной кислоты [16,17]. Для разделения смеси антоцианидинов применяли колоночную хроматографию на полиамидном сорбенте. Элюирование проводили 96% этанолом, содержащим 0.01 соляной кислоты. По ходу движения элюента по колонке наблюдали две четко выраженные зоны окрашивания. После отбора фракций, их анализировали методом УФ-спектроскопии, затем концентрировали до сухого состояния и определяли выход.

Электронные спектры поглощения полученных антоцианидинов записывали на сканирующем УФ-спектрометре Leki SS2109-UV (Leki Instruments, Финляндия) в 1 см кварцевой кювете в диапазоне длин волн 600–450 нм. Термостатирование (± 0.1 °С) проводили с помощью термостата Naake K15, оснащенного контроллером Naake DC10, при температуре 20 °С. Спектры образцов были сняты одномоментно при выделении из колонки без дополнительной очистки. Все спектры образцов были получены в этаноле с содержанием воды не более 10%.

ИК-спектры проантоцианидинов снимали с использованием ИК-Фурье спектрометра IR Tracer-100 (Shimadzu, Япония) в области длин волн 400–4000 см⁻¹. Обработку спектральной информации проводили по программе OPUS (версия 5.0). Твердые образцы для анализа готовили в виде таблеток в матрице KBr (2 мг образца / 1000 мг KBr).

ЯМР ¹³C-спектры проантоцианидинов регистрировали с использованием спектрометра Bruker Avance III 600 МГц при температуре 25 °С с привязкой к дейтериевому резонансу растворителя - (CD₃)₂DO.

Результаты и обсуждение

В таблице 1 приведены данные о выходе проантоцианидинов из луба коры березы при экстракции водой, 15% водно-этанольным раствором и этилацетатом в аппарате Сокслета. Максимальный выход проантоцианидинов наблюдается при экстракции луба коры этилацетатом в аппарате Сокслета: 1,57 мас.%.

Строение проантоцианидинов, полученных из луба коры березы 15% водно-этанольным раствором и этилацетатом в аппарате Сокслета, изучено методами УФ, ИК и ^{13}C ЯМР спектроскопии.

Таблица 1

Выход проантоцианидинов при экстракции луба коры березы водой, 15% водно-этанольным раствором и этилацетатом в аппарате Сокслета

№ опыта	вода	15% водно-этанольный раствор	этилацетат в аппарате Сокслета
1	1,19	1,43	1,59
2	1,20	1,45	1,56
3	1,21	1,44	1,57
среднее значение	1,20±0,01	1,44±0,01	1,57±0,02

В ИК спектрах проантоцианидинов, выделенных из луба коры березы независимо от способа их выделения, присутствуют все полосы поглощения характерные для проантоцианидинов в области 3374,2930, 1703, 1613, 1515, 1447, 1374,1228, 1172, 1157, 1102, 1073, 1043, 896, 825, 760. Присутствие в ИК спектре полосы поглощения в области 1703 см^{-1} , принадлежащей $\text{C}=\text{O}$ группе означает наличие в положении 3 кольца C флавоноида *галлоильной группы* [18].

В ^{13}C ЯМР спектрах проантоцианидина луба коры березы (рис. 1) присутствуют сигналы всех атомов углерода, определяющих основную структуру флавоноида, а их положения соответствуют литературным данным [16].

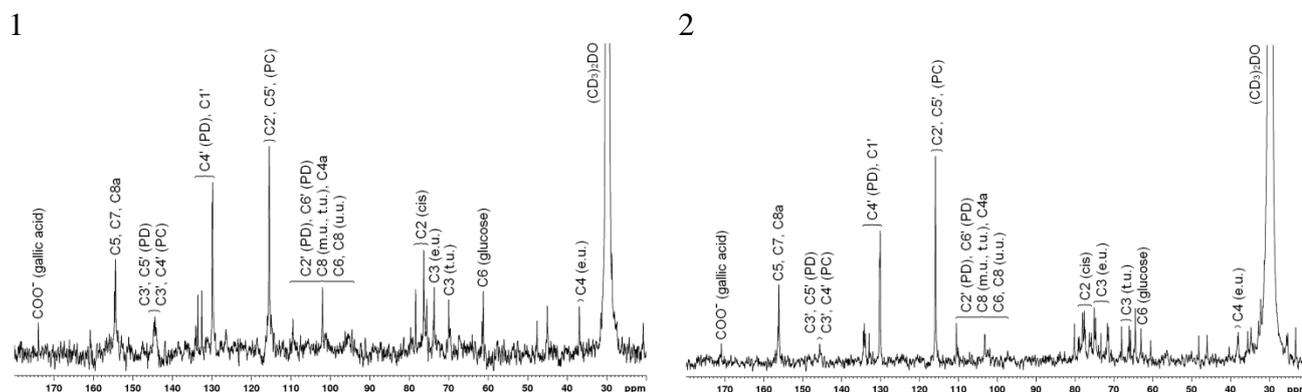


Рис. 1. ^{13}C ЯМР-спектр проантоцианидинов, выделенных из луба коры березы 15 % водно-этанольным раствором (1) и этилацетатом в аппарате Сокслета (2) (PC – процианидины, PD – продельфинидины, m.u. – среднее звено, t.u. – концевое звено, e.u. – удлиняющее звено, u.u. – верхнее звено)

В области 173.2–174.0 м.д. присутствует сигнал атома углерода сложноэфирной группы ($-\text{O}-\text{C}=\text{O}$) галлокатехина. В области 154.0–157.0 м.д. сигналы атомов углерода $\text{C}5$, $\text{C}7$ кольца А. Сигналы атомов углерода кольца В трудноразличимы и находятся в ^{13}C ЯМР-спектре в области 148.9 м.д. для процианидина и в области 144.4 м.д. для продельфинидина. Сигналы при 115.5 м.д. ($\text{C}2'$, $\text{C}5'$), 112–115.3 м.д. ($\text{C}6'$) и 144.4 м.д. ($\text{C}3'$, $\text{C}4'$) принадлежат кольцу В. Известно [16], что область 70–90 м.д. чувствительна к стереохимии кольца С флавоноидов поэтому сигнал в области 76.0–79.0 м.д. относят к $\text{C}2$ цис (эпикатехин/эпигаллокатехин) стереоизомерам, а сигнал при 78.0–82.0 м.д. к $\text{C}2$ транс (катехин/галлокатехин) стереоизомерам. Как видно из ^{13}C ЯМР-спектров (рис. 2) интенсивный сигнал в области 76.0–79.0 м.д. указывает на то, что в проантоцианидинах луба коры березы присутствуют цис-стереоизомер, состоящий в основном из звеньев эпикатехина и производных. По данным работы [16] в области 61.0–63.0 м.д. – атому углерода $\text{C}6$ глюкозидного остатка.

Анализ флавоноидного состава проантоцианидинов луба коры березы осуществляли после их превращения в красные антоцианидины. Подтверждением того, что антоцианидины луба коры березы в основном состоят из цианидина и дельфинидина является их способность образовывать устойчивые комплексы с Fe^{3+} , Al^{3+} , Sn^{4+} с углублением окраски и смещением максимума поглощения в видимой области УФ спектра батохромно на 15-35 нм [3,7].

Методом колоночной хроматографии антоцианидины луба коры березы разделены на цианидины и дельфинидины. В таблице 2 приведены спектральные и хроматографические характеристики цианидинхлоридов, полученных при обработке проантоцианидинов луба коры березы соляной кислотой в этаноле.

Таблица 2

Спектральные и хроматографические характеристики антоцианидинхлоридов луба коры березы

Вещество	Окраска	Значения R_f (x 100)*	λ_{max} видимой области электронного спектра, нм		$\Delta\lambda$, нм
			этанол	этанол + AlCl_3	
Цианидинхлорид	ярко-малиновая	51	547	569	22
Дельфинидинхлорид	розовато-сиреневая	33	556	581	25

УФ-спектр цианидина имеет максимум поглощения в видимой области $\lambda_{\text{max}}=547$ нм, а дельфинидина – $\lambda_{\text{max}}=556$ нм, при взаимодействии в растворе этанола с хлоридом алюминия их максимумы поглощения смещаются в более длинноволновую область для цианидина к 569 нм, а дельфинидина к 581 нм. Полученные данные показывают, что основными проантоцианидинами луба коры березы являются процианидин и продельфинидин.

Заключение

Сопоставлен выход проантоцианидинов, выделенных из луба коры березы водой, 15% водно-этанольным раствором и этилацетатом в аппарате Сокслета. Показано, что выход проантоцианидинов при экстракции луба коры березы водой и 15% водно-этанольным раствором соответственно составляет 1,44 и 1,57 %, при экстракции этилацетатом в аппарате Сокслета выход проантоцианидинов достигает 1,60 %. Методами УФ-, ИК- и ^{13}C ЯМР-спектроскопии установлено, что полученные проантоцианидины в основном состоят из процианидина и продельфинидина и их состав не зависит от способа выделения. Установлено присутствие галлоильной группы в составе выделенных проантоцианидинов.

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-23-00336, <https://rscf.ru/project/23-23-00336/> с использованием оборудования Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН.

Библиографический список

1. Кузьмичева Н.А., Бузук Г.Н., Курлюк О.В. Содержание проантоцианидинов в коре ив в зависимости от проточности увлажнения почвы // Вестник фармации. 2016. Т. 71, №1. С. 72–75.
2. Осипов В.И., Поляков Н.А., Сидельников А.Н., Хазиева Ф.М. Проантоцианидины корней и корневищ *Potentilla alba* (*Rosaceae*) // Растительные ресурсы. 2017. Т. 53, №1. С. 114–125.
3. Sprygin V.G., Kushnerova N.F. A method for evaluation and standardization of oligomeric proanthocyanidin com-plexes isolated from various raw plant materials // Pharm. Chem. J. 2002. V. 36, N. 3. P. 139–143.
4. Chang Q., Zhu M., Zuo Z., Chow M., Ho W.K.K. High-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of Hawthorn active components in rat plasma // J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl. 2001. V. 760, N. 2. P. 227–235.
1. 5.Kim S.H., Kang K.W., Kim K.W., Kim N.D. Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasore-laxation in rat aorta // Life Sciences. 2000. V. 67, N. 2. P. 121–131.
5. Sprygin V.G., Kushnerova N.F. A method for evaluation and standardization of oligomeric proanthocyanidin complexes isolated from various raw plant materials // Pharm. Chem. J. 2002. V. 36, N. 3. P. 139–143.

6. Левданский В.А., Левданский А.В., Кузнецов Б.Н. Выделение и изучение проантоцианидинов коры кедра *Pinus sibirica* // Хим. растит. сырья. 2022. № 4. С. 101–107.
7. Левданский В.А., Королькова И.В., Левданский А.В., Кузнецов Б.Н. Выделение и изучение проантоцианидинов коры сосны *Pinus sylvestris* L. // Хим. растит. сырья. 2020. № 4. С. 227–233.
8. Levdansky V.A., Kondrasenko A.A., Levdansky A.V., Lutoshkin M.A. Isolation and study of abies bark proanthocyanidins // J. Sib. Fed. Univ. Chem. 2019. V. 12, N. 4. P. 604–613.
9. Neto R.T., Santos S.A.O., Oliveira J., Silvestre A.J.D. Biorefinery of high polymerization degree proanthocyanidins in the context of circular economy // Ind. Crops Prod. 2020. V. 151. 112450
10. Amiri S., Dastghaib S., Ahmadi M.
2. Mehrbod P., Khadem F., Behrouj H., Aghanoori M.-R., Machaj F., Ghamsari M., Rosik J., Hudecki A., Afkhami A., Hashemi M., Los M.J., Mokarram P., Madrakian T., Ghavami S. Betulin and its derivatives as novel compounds with different pharmacological effects // Biotechnol. Adv. 2020. V. 38. 107409.
11. Патент №2363486 (РФ). Способ получения биологически активных веществ из коры березы / В.А. Левданский, А.В. Левданский, Б.Н. Кузнецов. – 2009.
12. Патент №2367460 (РФ). Способ получения проантоцианидинов из луба коры березы / В.А. Левданский, А.В. Левданский, Б.Н. Кузнецов. – 2009.
13. Патент №2381031 (РФ) Способ получения биологически активных веществ из бересты / В.А. Левданский, А.В. Левданский, Б.Н. Кузнецов. – 2010.
14. Дейнеко И.П. Фаустова Н.М. Элементный и групповой химический состав коры и древесины осины // Хим. растит. сырья. 2015. № 1. С. 51–62.
15. Diouf P.N., Tibirna C.M., García-Pérez M.-E., Royer M., Dubé P., Stevanovic T. Structural elucidation of condensed tannin from *Picea mariana* bark. // JBNB. 2013. V. 4, N. 3A. P. 1–8.
16. Ku C.S., Mun S.P. Characterization of proanthocyanidin in hot water extract isolated from *Pinus radiata* bark. // Wood Sci. Technol. 2007. V. 41, N. 3. P. 235–247.
17. Takahashi T., Nagatoishi S., Kuroda D., Tsumoto K. Thermodynamic and computational analyses reveal the functional roles of the galloyl group of tea catechins in molecular recognition // PLoS One. 2018. V. 13, N. 10. e0204856.

УДК 665.572.9:543.544.45

ИССЛЕДОВАНИЕ КОСМЕТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ МАСЛА ГОРЬКОЙ ПОЛЫНИ

А.Б. Гасанова, К.Т. Алиева

*Институт Биоресурсов Министерства Науки и Образования Азербайджанской Республики
Гянджа, Азербайджан*

Одной из важнейших проблем, стоящих перед химической промышленностью в наше время, является процесс переработки промышленных и бытовых отходов с целью эффективного использования природных ресурсов и экономии сырья, защиты окружающей среды. Полынь (*Artemisia absinthium* L.) – широко распространенный вид растений в западном регионе Азербайджана. Косметические лосьоны приготовлены на основе богатого ароматическими компонентами эфирного масла, полученного из надземной части растения полыни горькой, произрастающей в диком виде в биоценозах Газахского района, Западного региона Азербайджана. Изучены оптимальный состав и физико-химические свойства образцов. С наличием масла полыни горькой и добавок к лосьону приготовлено 6 видов образцов лосьона и определены его оптимальные варианты. Полученный образец лосьона обладает очищающими, отбеливающими, успокаивающими, разглаживающими, смягчающими свойствами для жирной кожи, сужает расширенные поры кожи и может быть использован для устранения жирного блеска.

Ключевые слова: полынь, эфирное масло, биологически активное вещество, сесквитерпен, лосьоны.

STUDY OF COSMETIC PREPARATIONS BASED ON BITTER WORMWOOD OIL

A.B. Gasanova, K.T. Aliyeva

*Institute of Bioresources of the Ministry of Science and Education of the Republic of Azerbaijan
Ganja, Azerbaijan*

One of the most important problems facing the chemical industry in our time is the process of processing industrial and household waste in order to effectively use natural resources, save raw materials, and protect the environment. Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) is a widespread plant species in the western region of Azerbaijan. Cosmetic lotions are prepared on the basis of essential oil rich in aromatic components, obtained from the aerial part of the wormwood plant, which grows wild in the biocenoses of the Gazakh region, Western region of Azerbaijan. The optimal composition and physicochemical properties of the samples were studied. With the presence of wormwood oil and lotion additives, 6 types of lotion samples were prepared and its optimal options were determined. The resulting lotion sample has cleansing, whitening, soothing, smoothing, softening properties for oily skin, tightens enlarged skin pores and can be used to eliminate oily shine.

Keywords: wormwood, essential oil, biologically active substance, sesquiterpene, lotions.

Растения — это природный ресурс с идеальной структурой, который может удовлетворить многие потребности людей и проявлять разнообразие на протяжении сотен лет. Во всем мире и в нашей стране растения издавна используются при приготовлении чая, пряностей, парфюмерии, мазей и лекарств, применяемых при лечении заболеваний [1, с. 33]. С 1926 года в лабораториях изучаются важные для здоровья человека свойства растений. В последние годы такие причины, как возросшее количество побочных эффектов и резистентность

организма к синтетическим ингредиентам, используемым при кожных заболеваниях и уходе за кожей, особенно в качестве антимикробных средств, повысили значимость натуральных медицинских препаратов растительного происхождения [2, с. 4].

В центре внимания всегда находились культурные, дикорастущие и лекарственные растения, богатые биологически активными веществами, имеющие важное значение в различных областях медицины [3, с. 56]. Потому что такие соединения играют важную роль в приобретении фармацевтических форм, что является основной областью фармакологии. Получение и применение терапевтических важных масел, мазей и косметических средств из природных ресурсов и полученных из них биологически активных веществ является одной из актуальных проблем [4, с. 237].

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) сообщила, что количество лекарственных растений, используемых для лечения, составляет около 20 000. С 1940 года эфирные масла, полученные из натуральных растений в качестве сырья, используются во многих отраслях промышленности, таких как медицина, пищевая, парфюмерная и косметологическая. В частности, изучены антимикробные свойства и получены важные результаты [5, с. 204].

Лекарственные растения широко распространены во флоре Азербайджана, особенно благодаря географическому положению, климату, разнообразию растений, сельскохозяйственному потенциалу и большой площади поверхности [6, с. 564]. Растительные вещества занимают первое место среди лекарственных средств в современной медицине. В мировой фармацевтической практике более 40% медицинских препаратов изготавливаются на основе растительного сырья. Основная причина этого заключается в том, что растительные средства по своим структурным особенностям близки к естественным метаболитам организма, они безвредны и могут применяться в течение длительного времени, не вызывая побочных эффектов [7, с. 213]. Основными элементами, определяющими лечебные свойства лекарственных растений, являются действующие вещества, входящие в его состав. Соотношение эфирного масла в эфиромасличных растениях варьируется в зависимости от генетической структуры растения, органов растения (морфогенетическая изменчивость), периода развития растения (онтогенетическая изменчивость), изменения температуры в течение дня (суточная изменчивость) и многих факторов, таких как климат и факторы окружающей среды.

Во флоре Азербайджана семейство *Asteraceae* Varcht.et J. Presl представлено 5550 видами, объединенными в 125 родов. Самый крупный род семейства, включенный в наше исследование, — *Artemisia* L. — Полынь. Во флоре мира известно более 500 видов рода полыни, из них 174 включены во флору [7, с. 213]. *Artemisia absinthium* L. семейства *Asteraceae* Varcht.et J. Presl относится к роду *Artemisia* L. во флоре Азербайджана.

Помимо изучения химического состава растений, из них получают биологически активные вещества и изучают области применения. Эфирное масло, полученное из различных видов растений, широко используется в пищевых добавках, приготовлении лекарств и косметики [7, с. 213]. В последнее время изучены распространение, запас, хемотаксономия, биоэкологические свойства видов полыни (*Artemisia* L.), произрастающих во флоре Азербайджана, и их использование в различных областях косметологии и фармакологии.

В связи с этим большое значение имеет определение источников биологически активных веществ, которые могут быть использованы при приготовлении новых лечебных и косметических препаратов. Среди лекарственных веществ в последние 40-50 лет большое внимание уделяется терпеноидным соединениям, в том числе сесквитерпеновым лактонам и кумаринам. Эти вещества широко распространены в растительном мире и как природные вещества обладают большим фармакологическим действием. Следует отметить, что одним из богатых источников этих соединений является полынь. В 1964 г. по решению Фармакологического Комитета Минздрава бывшего СССР препарат вводили внутримышечно, полученные из вида (*Artemisia Taurica Willd* L.) полыни таврической, широко применяемого в медицинской практике в качестве кардиотанического средства [8, с. 131].

Среди биологически активных соединений характерными веществами для полыни являются преимущественно сесквитерпеновые лактоны. Помимо сесквитерпеновых лактонов, эти растения содержат эфирные масла, фенолы, вакцины, кумарины, флавоноиды, органические

кислоты, витамины и др. По литературным данным, содержащим некоторые свойства сесквитерпеновых лактонов, они принципиально связаны с углеродным скелетом лактона и природой функциональных групп в структурной формуле.

В исследовательской работе надземная часть растения полыни горькой, произрастающей в диком виде в биоценозах Газахского района (43°05' 35" с.ш. - 46°21' 59" в.д.), западного региона Азербайджана, была собрана в 2023 г. во вторую неделю августа. Растительный материал анализировали в высушенном виде. Сухое сырье приобреталось в соответствии с правилами сбора и сушки лекарственных растений [8, с. 131]. С целью предотвращения разрушения биологически активных веществ и устранения избыточной влаги сырье сразу после сбора сушат и хранят в темном месте широко распространенным методом - воздушной сушкой, основанным на свободном поступлении воздуха в растительное сырье.

После сушки надземную часть полыни горькой (500 г) измельчали до толщины 2-3 мм с помощью лабораторной мельницы (SM-450L, MRCLab, Израиль). Эфирное масло из промытых проб получали методом паровой дистилляции на аппарате типа Клевенджера по Европейской фармакопее 35, в течение 4-5 часов [9, с. 49]. Полученное масло сушили безводным сульфатом натрия и отделяли от сушки декантацией. До использования хранили при температуре 4°C. Продолжительность процесса перегонки с водяным паром была определена экспериментально на основании изучения динамики выхода эфирного масла во времени. Выход эфирного масла определяли в процентах (%) от массы сухого сырья. Определено, что в массе 500 г полыни горькой содержится 1.70% эфирного масла, полученного из сухих проб надземной части в период цветения.

На основе масел, богатых биологически активными веществами, полученных из природных ресурсов различными способами, можно приготовить косметические препараты различного наименования с терапевтическим эффектом, соответствующего состава, с использованием множества добавок.

В эфирном масле, полученном методом паровой дистилляции, сохраняются биологически активные компоненты (витамины группы E, ди- и тритерпены). Они стерильны и обладают антиоксидантными свойствами. Полученные экстракты содержат помимо эфирного масла большое количество масел, что имеет положительную ценность. Потому что масляная часть вместе с ароматическим компонентом представляет собой биологически активный комплекс, пригодный для использования в косметических продуктах. Высушенная трава и листья полыни горькой – дикорастущей многолетней травы – являются качественным сырьем и лекарственным растением. Из этих экстрактов готовят различные мази, кремы и лосьоны для косметологических препаратов.

Травы и цветы содержат эфирное масло, основной компонент туйон, туил, фелландрен, сесквитерпеновые лактоны - абсинтин, анабсинтин, артабсин, флавоноиды, которые являются горьким на вкус сырьем, и вакцины. Растения содержат иммунизирующие вещества, флавоноид полыни, органические кислоты, каротин и аскорбиновую кислоту. Корень содержит инулин.

Особый запах горькой полыни создают эфирное масло, тулиловый спирт, перекись водорода (туйон, пинен, кадинен, фелландрен, бизаболен, β-кариофиллин, сепинен), 10 сесквитерпеновых лактонов (абсинтин, анабсинтин, артабсин). Его состав богат мочегонными и противовоспалительными веществами [10, с. 67].

Некоторые виды косметических веществ, применяемых в косметологии, в том числе лосьоны для лица, рук и ног, имеют растительное происхождение. Научная медицина установила, что главным образом содержащееся в нем горькое вещество снимает воспаление на коже и оказывает на кожу отбеливающее действие. Учитывая указанные характеристики полученного масла полыни горькой, на его основе приготовили лосьон и изучили оптимальный состав образцов. Лосьон, приготовленный на основе масла полыни, наносится в виде примочек на кожу разных типов. Полученное масло горькой полыни применяли при приготовлении косметических лосьонов. В эксперименте в качестве основы лосьона использовалось масло горькой полыни, а в качестве дополнительных компонентов — этиловый спирт и термальная вода. Эксперименты проводились в 6 вариантах, результаты представлены в табл. 1. Как видно из таблицы, показатели V и VI компонентов опыта можно считать оптимальными.

Таблица 1.

Взятие пробы лосьона на основе масла полыни

Название компонентов	Варианты											
	I		II		III		IV		V		VI	
	г	%	г	%	г	%	г	%	г	%	г	%
Масло полыни	30	60	31	62	32	64	33	66	34	68	35	70
Этиловый спирт	1	2	2	4	3	6	4	8	5	10	6	12
Термальная вода	18	36	16	32	14	28	12	24	10	20	8	16
Квасцы	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2

Определены физико-химические параметры образцов, полученных по различным вариантам, и результаты анализа представлены в табл. 2. Как видно из таблицы, плотность связи меньше единицы. Можно отметить, что показатель преломления постоянен для всех соединений.

Таблица 2.

Физико-химические показатели образцов, полученных из масла горькой полыни

Оптимальные варианты	Цвет	Запах	pH	Показатель преломления 20°C	Плотность 20°C, q/sm ³
I	прозрачный	слабый специфический	6.98	1.3475	0.8436
II	прозрачный	слабый специфический	6.79	1.3785	0.9874
III	прозрачный	слабый специфический	7.0	1.3493	0.8339
IV	прозрачный	слабый специфический	7.0	1.3679	0.8973
V	прозрачный	слабый специфический	7.0	1.3568	0.9457
VI	прозрачный	слабый специфический	7.0	1.3453	0.9784

Таким образом, образец лосьона на основе масла горькой полыни предназначен для использования на жирной коже. Поскольку масло горькой полыни содержит бисаболон и β-кариофиллин, обладающие противовоспалительным действием, данные лосьоны применяют как противовоспалительное, антисептическое и обезболивающее средство, в косметологии. Также его можно использовать при очистке прыщей и предотвращении сухости кожи, как дезинфицирующее средство при кожных заболеваниях Наряду с очищающими, отбеливающими, успокаивающими, разглаживающими, смягчающими свойствами кожи, он сужает расширенные поры кожи и может использоваться для устранения жирного блеска, активации роста волосяных фолликулов, ломкости волос и придания им блеска. Масло полыни можно добавлять в различные косметические средства, способные за короткий промежуток времени бороться с перхотью на волосах. Хотя действие компонентов в составе масла горькой полыни в чем-то похоже на препараты, используемые в медицине, оно не имеет побочных эффектов. Масло полыни также используется в ароматерапии.

Библиографический список

1. Анисимова М.М., Куркин В.А., Рыжов В.М., Тарасенко Л.В. Анатомо-морфологическое исследование травы гречихи посевной (*Fagopyrum sagittatum Gilib.*) // Медицинский альманах. 2010. Т. 3 (12). С. 204–206.
2. Borovaya S.A., Klykov A.G. Some aspects of flavonoid biosynthesis and accumulation in buckwheat plants // Plant Biotechnol. Rep. 2020. Vol. 14. pp. 213–225.
3. Демина Г.В., Кадырова Л.Р., Прохоренко Н.Б., Тимофеева О.А., Хуснетдинова Л.З. Атлас лекарственных растений Республики Татарстан. Казань, 2022. 456 с.
4. Коробко В.В., Касаткин М.Ю. Физиология растений: большой практикум: учебное пособие для студентов биологического факультета. Саратов, 2017. 120 с

5. Логвиненко И.Е., Логвиненко Л.А. Интродукция лекарственных растений на Украине // Бюллетень главного ботанического сада. 2003. Т. 186. С. 4–6.
6. Тимашева Л.А., Пехова О.А., Данилова И.Л. О качестве эфирного масла полыни таврической (Крымской) // Естественные и математические науки в современном мире. 2015. No 9(33). С. 56–66.
7. Танашкина Т.В., Пьянкова А.Ф., Семенюта А.А., Кантемиров А.В., Приходько Ю.В. Гречишные травяные чайные напитки: сырье, способы получения и оценка биологической активности // Техника и технология пищевых производств. 2021. No3. С. 564–573.
8. Тринеева О.В., Рудая М.А., Сливкин А.И. Определение в лекарственном сырье витаминов группы В (на примере плодов облепихи крушиновидной и листьев крапивы двудомной) // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2017. No3. С. 131–134.
9. Ханина М.А., Серых Е.А., Покровский М.М., Ткачев А.В. Новые данные по химическому составу эфирного масла *Artemisia absinthium* L. Сибирской флоры // Химия аспительного сырья. 2000. No 3. С. 33–40.
10. Hasanova A.B. Study of the essential oil obtained from juniper plant by physical-chemical methods // *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2023. No 3. С. 237-242.

УДК 663.1

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ МИСКАНТУСА СОРТА КАМИС В ВЫСОКОЦЕННУЮ БАКТЕРИАЛЬНУЮ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗУ

Е.К. Гладышева, Е.И. Кащеева

*Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН,
Бийск, Алтайский край, Россия*

Бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) полимер, схожий по химической структуре с растительной целлюлозой и имеющий более высокие степени полимеризации и кристалличности, высокие влагоудерживающую способность и механическую прочность по сравнению с растительной целлюлозой. Перспективным источником целлюлозосодержащего сырья для получения БНЦ является мискантус сорта Камис. Химическая обработка и биокаталитический гидролиз позволили получить питательные среды для биосинтеза БНЦ. В результате была получена БНЦ с высоким выходом – 10,4-10,7 %, который был сопоставим с выходом на синтетической питательной среде – 11,8 %.

Ключевые слова: мискантус сорта Камис, бактериальная наноцеллюлоза, химическая обработка, биокаталитический гидролиз, симбиотическая культура *Medusomyces gisevii* Sa-12

BIOTECHNOLOGICAL TRANSFORMATION OF KAMIS MISCANTHUS INTO HIGH-VALUE BACTERIAL NANOCELLULOSE

E.K. Gladysheva, E.I. Kashcheeva

*Institute of Problems of Chemical-Energy Technologies, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
Biysk, Altai Territory, Russia*

Bacterial nanocellulose (BNC) is a polymer similar in chemical structure to plant cellulose and has higher degrees of polymerization and crystallinity, high water-holding capacity and mechanical strength compared to plant cellulose. A promising source of cellulose-containing raw materials for the production of BNC is miscanthus variety Kamis. Chemical treatment and biocatalytic hydrolysis made it possible to obtain nutrient media for the biosynthesis of BNC. As a result, BNC was obtained with a high yield of 10.4-10.7%, which was comparable to the yield on a synthetic nutrient medium of 11.8%.

Keywords: miscanthus variety Kamis, bacterial nanocellulose, chemical treatment, biocatalytic hydrolysis, symbiotic culture, *Medusomyces gisevii* Sa-12

Введение. Бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) – представляет собой полимер с высоким потенциалом применения в различных отраслях промышленности. На молекулярном уровне БНЦ имеет химическую структуру, похожую на растительную целлюлозу, состоящую из единиц глюкозы, соединенных β -1,4-гликозидной связью. Однако, БНЦ состоит из трехмерной сети нанофибрилл, что объясняет превосходные механические свойства по сравнению с другими формами целлюлозы. БНЦ имеет высокие степени кристалличности и полимеризации, а также обладает высокой водоудерживающей способностью. Кроме того, БНЦ демонстрирует высокую термическую стабильность при воздействии высоких температур [2]. БНЦ имеет превосходную биосовместимость и низкую цитотоксичность, что делает ее весьма подходящим материалом для применения в медицине. Однако низкая экономическая целесообразность процессов производства БНЦ препятствует их промышленному внедрению [7]. Эта проблема может решиться использованием экономически эффективных питательных сред из гидролизатов целлюлозосодержащего сырья [10]. Перспективным источником целлюлозосодержащего сырья является мискантус сорта Камис, представляющий особый интерес, поскольку сочетает в себе

высокую производительность биомассы и низкое воздействие на окружающую среду [3]. Целлюлозосодержащее сырье представляет собой прочную матрицу, состоящую из целлюлозы, лигнина и гемицеллюлоз, поэтому необходимо вводить дополнительные стадии для его преобразования в питательные среды для биосинтеза БНЦ [9]. В данной работе проводилась биотехнологическая трансформация мискантуса сорта Камис в питательные среды с целью получения БНЦ.

Материалы и методы. Мискантус (*Miscanthus Giganteus*) сорта Камис выращивали в Московской области (п. Кокошкино), посадка плантации 2017 г., сбор урожая в феврале 2019 г., поставщик ООО «Мастер Брэнд» (г. Москва) [3].

Предварительную химическую обработку мискантуса проводили двумя методами:

1. Поэтапная обработка растворами 4%-ной азотной кислоты и 4%-ного гидроксида натрия при температуре 90-96 °С и атмосферном давлении в течении 1-6 часов – целлюлоза (Ц) – азотнокислый способ (АС);

2. Поэтапная обработка растворами 4%-ного гидроксида натрия и 4%-ной азотной кислоты при температуре 90-96 °С и атмосферном давлении в течении 1-6 часов – целлюлоза (Ц) – модифицированный щелочной способ (МЩС).

Полученные продукты отжимали на вакуум-филт্রে и промывали до нейтральной реакции. В сырье и полученных продуктах определяли компонентный состав классическими «мокрыми» методами [5].

Биокаталитический гидролиз полученных продуктов проводили в 0,05 М ацетатном буферном растворе (рН 4,6) согласно методике [5]. Концентрацию редуцирующих веществ (РВ) в пересчете на глюкозу в процессе гидролиза определяли спектрофотометрически на Cary-60 UV-Vis (Agilent Technologies, Санта-Клара, США) с использованием динитросалицилового реактива [8].

Для биосинтеза БНЦ в качестве продуцента использовали симбиотическую культуру *Medusomyces gisevii* Sa-12. Посевной материал вносили в количестве 10 об. %. В качестве контроля использовали синтетическую глюкозную среду, содержащую глюкозы – 20,0 г/л и экстрактивных веществ черного чая – 1,6 г/л. Биосинтез БНЦ на ферментативном гидролизате проводили в ранее выявленных оптимальных условиях [4]. Культивирование проводили в климатической камере Binder-400 (Binder, Берлин, Германия), продолжительность культивирования составила 11 суток.

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

Выход высушенной БНЦ рассчитывали по следующей формуле:

$$W = m / (C * V * 0,9) * 100 \% \quad (1),$$

где W – выход БНЦ, %;

m – масса образца БНЦ в пересчете на абсолютно сухое вещество, г;

C – концентрация РВ в пересчете на глюкозу в питательной среде, г/л;

V – объем среды, л;

0,9 – коэффициент пересчета, обусловленный отщеплением молекулы воды при полимеризации глюкозы в целлюлозу.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлен компонентный состав мискантуса сорта Камис и образцов ЦАС и ЦМЩС, полученных из него.

Исследование компонентного состава мискантуса показало, что данный вид целлюлозосодержащего сырья имеет высокую массовую долю целлюлозы по Кюршнеру и пентозанов, а также низкую массовую долю лигнина и золы по сравнению с другими известными источниками целлюлозосодержащего сырья [11]. Из представленных данных видно, что химическая обработка мискантуса приводит: к повышению массовой доли целлюлозы – в 1,7-1,8 раз (96,9 % у ЦАС и 94,0 % у ЦМЩС); к снижению массовой доли пентозанов – в 4,3-9,1 раз (2,5 % и 5,3 %); к снижению массовой доли лигнина – в 35-42 раза (0,5 % и 0,6 %); к снижению

массовой доли золы – в 17-28 раз (менее 0,1 %). Таким образом, данные методы обработки показывают высокую эффективность для использования полученных продуктов в дальнейших биотехнологических процессах [5].

Таблица 1

Компонентный состав мискантуса и образцов ЦАС и ЦМЩС

	Массовая доля, %				Выход, %
	Целлюлоза	Пентозаны	Лигнин	Зола	
Сырье					
Мискантус	54,0	22,8	21,0	1,7	–
Продукты					
ЦАС	96,9	2,5	0,5	0,1	32,0
ЦМЩС	94,0	5,3	0,6	0,06	38,0

На рис. 1 представлена зависимость концентрации РВ от продолжительности биокаталитического гидролиза образцов ЦАС и ЦМЩС.

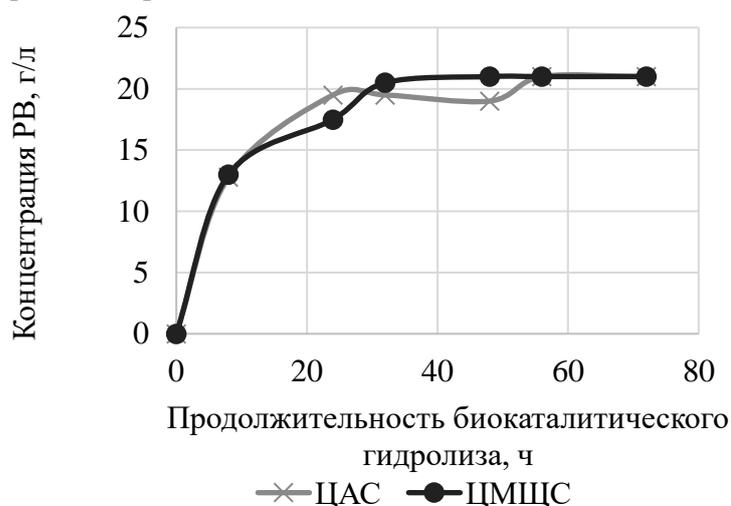


Рис. 1. Зависимость концентрации РВ от продолжительности биокаталитического гидролиза образцов ЦАС и ЦМЩС

Выявлено, что образцы ЦАС и ЦМЩС имели схожую реакционную способность к биокаталитическому гидролизу. Концентрация РВ через 72 часа составила 21,0-21,5 г/л. Выход РВ от массы субстрата для полученных продуктов варьировался от 63,0 % до 64,5 %. Полученные данные ниже, чем данные представленные в аналогичных исследованиях для мискантуса сахароцветного [5]. Несмотря на меньшую реакционную способность к биокаталитическому гидролизу продуктов предварительной обработки мискантуса сорта Камис, полученные гидролизаты потенциально пригодны для получения питательных сред на их основе, так как концентрация РВ в них достаточна для дальнейшего синтеза БНЦ.

На рис. 2 представлены показатели биосинтеза БНЦ через 11 суток культивирования.

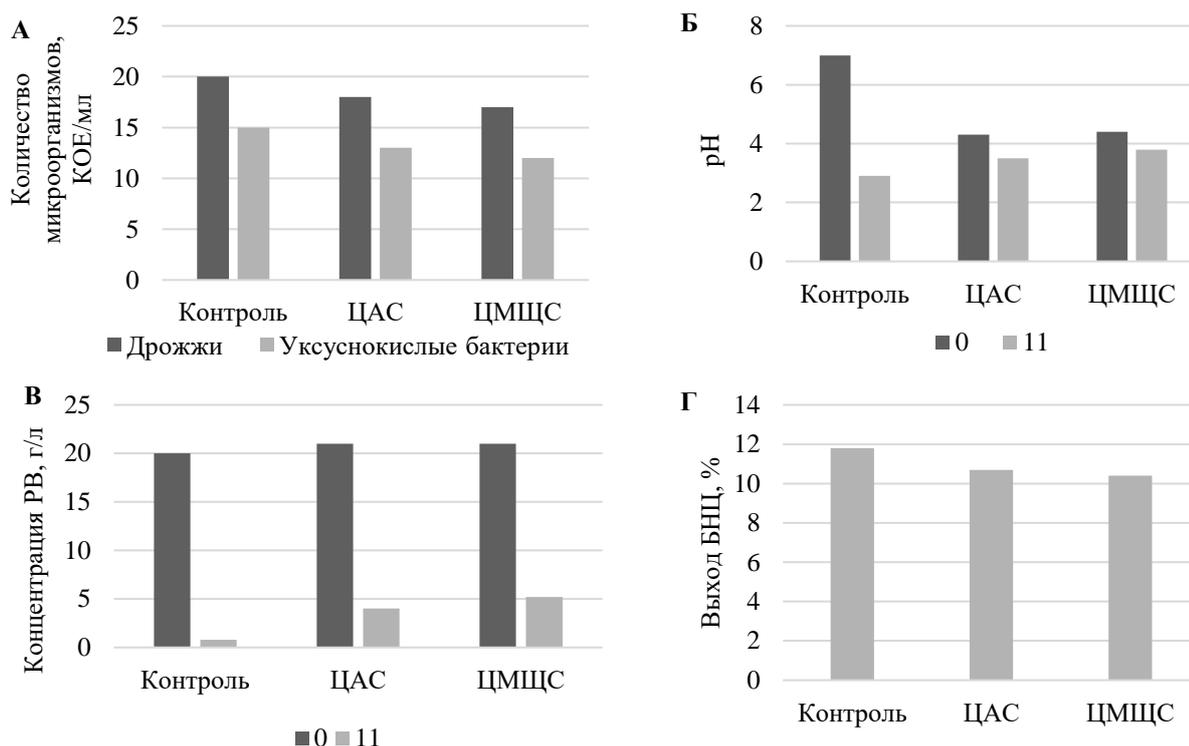


Рис. 2. Показатели биосинтеза БНЦ в контроле и на питательных средах, полученных из гидролизатов ЦАС и ЦМЩС: А) количество дрожжей и уксуснокислых бактерий; Б) pH; В) концентрация РВ; Г) выход БНЦ

Medusomyces gisevii Sa-12, представляет собой консорциум различных видов и родов дрожжей и уксуснокислых бактерий. Из литературных данных известно, что дрожжи синтезируют этанол для стимуляции роста количества уксуснокислых бактерий, а те в свою очередь синтезируют БНЦ для защиты дрожжей от влияния окружающей среды [6], из этого следует, что количество дрожжей превышает количество уксуснокислых бактерий. Следует отметить, что содержание дрожжей и уксуснокислых бактерий на разных питательных средах незначительно отличается между собой (рис. 2А). Снижение pH в процессе культивирования (рис. 2Б) происходит в результате активной жизнедеятельности уксуснокислых бактерий и образования таких метаболитов как уксусная кислота, янтарная кислота, глюконовая кислота и др. [6]. Остаточная концентрация РВ на 11 сутки культивирования была минимальной на синтетической питательной среде (контроль) и составила менее 1 г/л. Концентрация РВ на питательных средах ферментативных гидролизатов ЦАС и ЦМЩС составила 3,2 и 5,2 г/л.

Выход БНЦ полученный на питательных средах ферментативных гидролизатов ЦАС и ЦМЩС составил 10,7 и 10,4 %, соответственно. Полученный выход является высоким и сопоставим с выходом на синтетической питательной среде – 11,8 %. В работе [1] при биосинтезе БНЦ на альтернативной питательной среде, полученной из яблочных отходов, с использованием в качестве продуцента Kombucha Original Bio, выход БНЦ составил от 1 % до 4 %, что в 2,6-10,7 раз ниже, чем выход БНЦ, полученный в данном исследовании.

Заключение. Таким образом, мискантус сорта Камис является пригодным источником целлюлозосодержащего сырья для биотехнологической трансформации с целью получения БНЦ с высоким выходом 10,4-0,7 %.

Благодарности. Работа выполнена при использовании оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск) и за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00107, <https://rscf.ru/project/22-13-00107/>

Библиографический список

1. Amorim L.F.A., Li L., Gomes A.P., Fangueiro R., Gouveia I.C. Sustainable bacterial cellulose production by low cost feedstock: evaluation of apple and tea by-products as alternative sources of nutrients // *Cellulose*. – 2023. – Vol. 30. – P. 5589–5606.
2. Girard V. D., Chaussé J., Vermette P. Bacterial cellulose: A comprehensive review // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2024. – Vol. 141(15). – P. e55163.
3. Gismatulina Y.A., Budaeva V.V., Kortusov A.N., Kashcheyeva E.I., Gladysheva E.K., Mironova G.F., Skiba E.A., Shavyrkina N.A., Korchagina A.A., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Evaluation of Chemical Composition of *Miscanthus x giganteus* Raised in Different Climate Regions in Russia // *Plants*. – 2022. – No. 11. – P. 2791
4. Gladysheva E.K., Skiba E.A., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Study of the Conditions for the Biosynthesis of Bacterial Cellulose by the Producer *Medusomyces gisevii* Sa-12 // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2018. – No. 54(2). – P. 179-187.
5. Kashcheyeva E.I., Gismatulina Y.A., Budaeva V.V. Pretreatments of Non-Woody Cellulosic Feedstocks for Bacterial Cellulose Synthesis // *Polymers*. – 2019. – Vol. 11, No. 10. – P. 1645.
6. Krystynowicz A., Czaja W., Wiktorowska-Jeziarska A., Gonçaves-Miśkiewicz M., Turkiewicz M., Bielecki S. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose // *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. – 2002. – Vol. 29. – P. 189–195.
7. Lee J., An H.E., Lee K.H., Kim S., Park C., Kim C.B., Yoo H.Y. Identification of *Gluconacetobacter xylinus* LYP25 and application to bacterial cellulose production in biomass hydrolysate with acetic acid // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2024. – Vol. 261. – P. 129597.
8. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // *Analytical Chemistry*. – 1959. – Vol. 31, No 3. – P. 426–428.
9. Zhou Z., Liu D., Zhao X. Conversion of lignocellulose to biofuels and chemicals via sugar platform: an updated review on chemistry and mechanisms of acid hydrolysis of lignocellulose // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2021. – Vol. 146. – P. 111169.
10. Ul-Islam M., Ullah M.W., Khan S., Park J.K. Production of bacterial cellulose from alternative cheap and waste resources: A step for cost reduction with positive environmental aspects // *Korean Journal of Chemical Engineering*. – 2020. – Vol. 37. – P. 925-937.
11. Гладышева Е.К., Будаева В.В., Скиба Е.А., Кашеева Е.И., Золотухин В.Н. Отбор травянистого целлюлозосодержащего сырья, пригодного для биотехнологической переработки // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. – 2023. – Т. 13, N 2. – С. 310-317.

ИДЕАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ ЕЕ ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ

П.А. Горбатова^{1,2}, Н.А. Шавыркина^{1,2}

¹Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), г. Бийск

²Бийский технологический институт (филиал) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», Бийск

Аннотация. Целью проведенного исследования являлось изучение химической функционализации бактериальной наноцеллюлозы с получением нитратов бактериальной наноцеллюлозы. Два образца бактериальной наноцеллюлозы БНЦ-1 и БНЦ-2 со степенью полимеризации 3950 и 5750 соответственно были получены с использованием в качестве продуцента симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 на синтетической глюкозной среде. Нитрование проводилось промышленной серно-азотной кислотной смесью с последующей стабилизацией синтезированных нитратов целлюлозы. Полученные нитраты бактериальной наноцеллюлозы НБНЦ-1 и НБНЦ-2 характеризовались массовой долей азота 10,84 и 11,56 %, вязкостью ацетонового раствора 255 и 744 мПа*с, растворимостью в спиртоэфирной смеси 16,5 и 62,2 %, соответственно. Установлена зависимость показателей нитратов бактериальной наноцеллюлозы от степени полимеризации целлюлозы: чем выше степень полимеризации бактериальной наноцеллюлозы, тем ниже массовая доля азота и выше вязкость полученных нитратов бактериальной наноцеллюлозы. В ИК-спектрах нитратов бактериальной наноцеллюлозы зарегистрированы основные функциональные группы, подтверждающие, что синтезированные продукты являются низкозамещенными азотнокислыми эфирами целлюлозы: 1637 и 1657 см⁻¹, 1274 и 1281 см⁻¹, 825 и 836 см⁻¹, 747 и 749 см⁻¹, 681 и 691 см⁻¹. Методом РЭМ установлено, что сетчатая структура бактериальной наноцеллюлозы сохраняется и в ее нитратах. Установлено, что синтезированные нитраты бактериальной наноцеллюлозы являются наноструктурированными и высоковязкими нитратами целлюлозы, что объясняется свойствами исходной бактериальной наноцеллюлозы и является отличительными свойствами от нитратов целлюлозы растительного происхождения.

Ключевые слова: бактериальная наноцеллюлоза, *Medusomyces gisevii*, нитрование, серно-азотная смесь, нитраты бактериальной наноцеллюлозы

Введение. Актуальность темы работы обусловлена возрастающим интересом к бактериальной наноцеллюлозе (БНЦ) в качестве прекурсора нитратов целлюлозы (НЦ) в связи с фундаментальным характером и высокой практической значимостью результатов исследований. БНЦ представляет собой нанополимер с уникальными физико-механическими свойствами, который имеет перспективы в производстве передовых функциональных материалов для различных применений [1]. БНЦ синтезируется несколькими штаммами бактерий и состоит из целлюлозной нановолоконной сети, которая определяет ряд свойств БНЦ отличных от целлюлозы растительного происхождения [2]. БНЦ характеризуется химической чистотой, высокой механической прочностью, высокой степенью полимеризации (от 1000 до 14000), эластичностью, высокопористостью, наноразмерной толщиной микрофибрилл, способностью к биологическому разложению и превосходной биосовместимостью [3]. БНЦ имеет широкий диапазон значений степени полимеризации, которые зависят от условий биосинтеза БНЦ, что позволяет, регулируя условия биосинтеза, получать БНЦ с заданной степенью полимеризации [4].

Нативная БНЦ обычно модифицируется для улучшения свойств и функциональности: одним из примеров химической функционализации БНЦ является ее нитрование. Нитрование БНЦ позволяет получить НЦ со свойствами отличными от НЦ растительного происхождения, благодаря уникальным свойствам БНЦ. Нитраты БНЦ (НБНЦ) могут применяться в качестве энергетического ингредиента [5, 6], основы для создания биосенсоров [7], пластификатора [8], нитроцеллюлозных мембран для вестерн-блоттинга, иммуноферментного анализа [9]. Проведенные в ряде стран исследования показали возможность использования БНЦ для синтеза НБНЦ с удовлетворительными функциональными свойствами [5-7, 10].

Целью данного исследования является анализ основных физико-химических показателей НБНЦ, полученных при нитровании исходной БНЦ, полученной с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 в качестве продуцента на глюкозной среде в оптимальных условиях, промышленной серно-азотной кислотной смесью.

Материалы и методы. Два образца БНЦ-1 и БНЦ-2 со степенью полимеризации 3950 и 5750 были получены с использованием в качестве продуцента симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 на синтетической глюкозной среде в оптимальных условиях [11]. Образцы БНЦ перед нитрованием были высушены лиофильным методом до влажности не более 5 % и измельчены до мелких хлопьев размером 1-3 мм. Оба образца не содержат лигнин, гемицеллюлозы и другие нецеллюлозные компоненты.

Образцы НБНЦ-1 и НБНЦ-2 были получены при нитровании БНЦ-1 и БНЦ-2 серно-азотной кислотной смесью с массовой долей (м.д.) воды 14 %, при температуре 25-30 °С в течение 40 мин при этом модуль нитрования составлял 1:160. Промытые до нейтральной реакции по лакмусовой пробе образцы НБНЦ стабилизировали в одинаковых условиях при непрерывном перемешивании [12]. Для последующего анализа НБНЦ-1 и НБНЦ-2 были высушены при температуре (100 ± 5) °С в течение 1 ч. Экспериментальные результаты получены в трех повторностях, статистически обработаны с применением стандартных методов с помощью программ Microsoft Office Excel 2019, Statistica 6.0 и MathCad 14.0 и являются достоверными.

М.д. азота, растворимость в спиртоэфирной смеси и вязкость ацетонового раствора НБНЦ определены в соответствии с принятыми методами [12-14].

Работа выполнена с использованием приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН, г. Бийск, Россия).

Обсуждение результатов. Обзор литературы по нитрованию БНЦ показал, что полная характеристика НЦ, синтезированных из БНЦ, отсутствует, а особенности нитрования БНЦ – в процессе дискуссии. Это вполне естественно, поскольку БНЦ с влажностью 98-99 % для нитрования необходимо предварительно высушить. Кроме того, функционализация БНЦ приемлема при стабильности ее производства в необходимых объемах [13].

Степень полимеризации целлюлозы указывает на количество идентичных основных звеньев в макромолекуле целлюлозы [15]. Вследствие различий в степенях полимеризации целлюлозы и условий нитрования содержание азота и распределение нитратных групп в макромолекулах НЦ, полученных в одинаковых условиях нитрования, различаются [16].

Согласно данным, представленным в таблице 1, синтезированные образцы НБНЦ-1 и НБНЦ-2, полученные в одинаковых условиях нитрования, характеризуются м.д. азота 11,56 и 10,84 %, вязкостью ацетонового раствора 255 и 744 мПа*с, растворимостью в спиртоэфирной смеси 16,5 и 62,0 %, соответственно. Кроме того, оба образца растворимы в ацетоне на 100 %.

Таблица 1

Основные физико-химические показатели НБНЦ

Наименование показателя	НБНЦ-1	НБНЦ-2
М.д. азота, %	11,56	10,84
Вязкость, мПа*с	255	744
Растворимость в спиртоэфирной смеси, %	16,5	62,2

Показатели НЦ зависят от многих факторов и, прежде всего, от состава нитрующей кислотной смеси и свойств целлюлозы. Исходя из результатов определения физико-химических

показателей НБНЦ-1 и НБНЦ-2, следует, что степень полимеризации исходной БНЦ влияет на м.д. азота и вязкость синтезированных НБНЦ, причем чем выше степень полимеризации, тем ниже м.д. азота и выше вязкость НБНЦ. Растворимость образцов НБНЦ-1 и НБНЦ-2 в спиртоэфирной смеси низкая из-за высокой вязкости образцов. Растворимость НЦ в спиртоэфирной смеси зависит от содержания азота, но эта зависимость имеет сложный характер. Изменение растворимости НБНЦ в спиртоэфирной смеси обусловлено тем, что при м.д. азота 10,60-11,50 % растворимость находится в области резких изменений [15].

Для НБНЦ-1 и НБНЦ-2 характерны высокие показатели вязкости, что объясняется высокой степенью полимеризации исходной БНЦ, следовательно, используя БНЦ в качестве источника целлюлозы можно синтезировать высоковязкие НЦ, которые могут быть востребованы в наукоемких областях. Поскольку БНЦ имеет широкий диапазон значений степени полимеризации, которая зависит от условий биосинтеза БНЦ [17], возможно получение НБНЦ с заданными свойствами, исходя из степени полимеризации исходной БНЦ.

Сравнение полученных результатов с НЦ из мискантуса [12, 14], полученных в аналогичных условиях (за исключением модуля нитрования) подтверждает отличие в высокой вязкости НБНЦ: вязкость НЦ из мискантуса 48, 99-129 мПа*с.

Согласно таблице 2, в ИК-спектрах синтезированных НБНЦ-1 и НБНЦ-2 зарегистрированы основные функциональные группы, свидетельствующие о получении низкозамещенных азотнокислых эфиров целлюлозы (1637 и 1657 см^{-1} , 1274 и 1281 см^{-1} , 825 и 836 см^{-1} , 747 и 749 см^{-1} , 681 и 691 см^{-1}). Идентичные функциональные группы наблюдаются в ИК-Фурье спектрах НЦ из других альтернативных источников сырья [5].

Таблица 2

Отнесение полос поглощения в ИК-спектрах НБНЦ

Отнесение к химическим группам	НБНЦ-1	НБНЦ-2
Валентные колебания $\nu(\text{OH})(\text{OH}\dots\text{OH})$	3531	3594
Валентные колебания $\nu(\text{CH}_2)$	2917	2919
Валентные колебания $\nu_a(\text{NO}_2)$	1657	1637
Деформационные колебания $\sigma(\text{COH})$	1455	1426
Деформационные колебания $\sigma(\text{CH})$	1377	1376
Симметричные валентности $\nu_s(\text{NO}_2)$	1281	1274
Валентные колебания $\nu(\text{C-O})$	1162	1160
Валентные колебания $\nu(\text{C-O})$	1071	1064
Деформационные колебания $\sigma(\text{CH})$	1004	1021
Валентное колебание $\nu(\text{NO}_2)$	836	825
Веерное колебание $\gamma_w(\text{NO}_2)$	749	747
Ножничное колебание $\delta(\text{NO}_2)$	691	681

На рис. 1 представлены результаты РЭМ для исходной БНЦ и НБНЦ, полученных при нитровании БНЦ с различной степенью полимеризации.

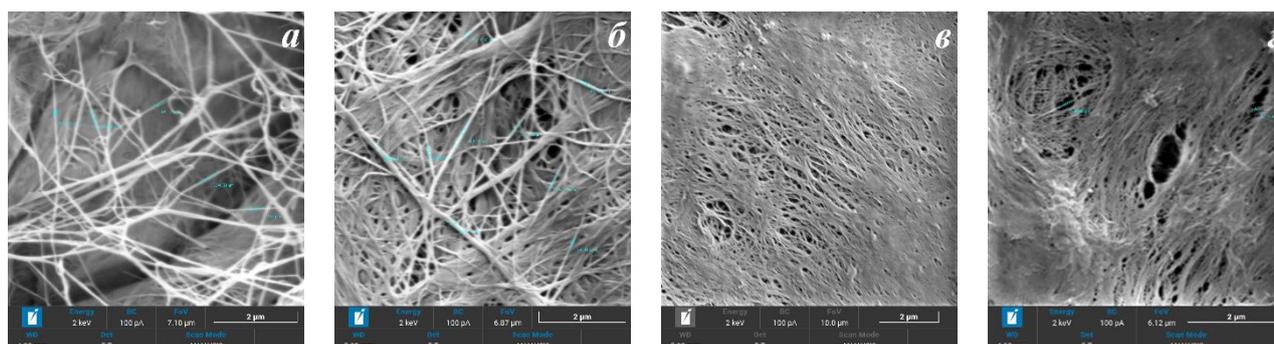


Рис. 1 – Микрофотографии РЭМ:
а) БНЦ-1; б) БНЦ-2; в) НБНЦ-1; г) НБНЦ-2

Согласно рис. 1, а-б, для БНЦ характерна сетчатая структура с большим количеством пор, образованная наноразмерными фибриллами, которые образуют сетчатую структуру с большим количеством пор. Структура НБНЦ (рис. 1, в-г) за счет увеличения объемов фибрилл под действием смеси азотной и серной кислот становится более плотной при этом наноразмерность фибрилл в поперечном сечении сохраняется. Таким образом, нитрование БНЦ позволяет получить наноструктурированные НЦ.

Выводы. В ходе проведенного исследования образцы НБНЦ-1 и НБНЦ-2 были получены нитрованием образцов БНЦ-1 и БНЦ-2 со степенью полимеризации 3950 и 5750 соответственно с использованием серно-азотной кислотной смеси. Исходная БНЦ-1 и БНЦ-2 была получена с использованием в качестве симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 на синтетической глюкозной среде в оптимальных условиях.

Определены основные физико-химические показатели образцов НБНЦ-1 и НБНЦ-2: м.д. азота 10,84 и 11,56 %, вязкость ацетонового раствора 255 и 744 мПа*с, растворимость в спиртоэфирной смеси 16,5 и 62,0 %, соответственно. Установлена зависимость показателей НБНЦ от степени полимеризации БНЦ: чем выше степень полимеризации исходной БНЦ, тем ниже м.д. азота и выше вязкость НБНЦ. Методом ИК-спектроскопии установлено соответствие НБНЦ по основным функциональным нитратным группам (1637 и 1657 см⁻¹, 1274 и 1281 см⁻¹, 825 и 836 см⁻¹, 747 и 749 см⁻¹, 681 и 691 см⁻¹) низкозамещенным азотнокислым эфирам целлюлозы. Методом РЭМ выявлено, что нитрование БНЦ позволяет получить наноструктурированные НЦ.

Результаты существенно отличаются от результатов, полученных при нитровании целлюлозы растительного происхождения. Сравнение полученных результатов с НЦ из мискантуса [12, 14], полученных в аналогичных условиях (за исключением модуля нитрования) подтверждает отличие в высокой вязкости НБНЦ: вязкость НЦ из мискантуса 48, 99-129 мПа*с.

Существенная разница между характеристиками НЦ на основе БНЦ и НЦ на основе растительной целлюлозы обусловлена уникальной трехмерной сетчатой структурой и высокой степенью полимеризации БНЦ. Таким образом, БНЦ позволяет получить наноструктурированные НЦ с высокой вязкостью, что объясняется свойствами исходной БНЦ.

Широкому внедрению БНЦ препятствует ее высокая себестоимость. Среди последних тенденций – концепция производства БНЦ с использованием растительного сырья для получения питательных сред. В качестве претендента для ферментативного гидролиза активно рассматривается мискантус [17,18].

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00107, <https://rscf.ru/project/22-13-00107/>.

Библиографический список

1. Горбатова П.А., Гисматулина Ю.А., Корчагина А.А. и др. Зависимость массовой доли азота в нитратах бактериальной наноцеллюлозы от содержания воды в нитрующей смеси. Южно-Сибирский научный вестник. 2023. № 5 (51). С. 75-81.
2. Stumpf T.R., Yang X., Zhang J., et al. In situ and ex situ modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering. Materials Science and Engineering: C. 2018. Vol. 82. P. 372-383.
3. Skiba E. A., Gladysheva E.K., Budaeva V.V., et al. Yield and quality of bacterial cellulose from agricultural waste. Cellulose. 2022. Vol. 29. № 3. P. 1543-1555.
4. Skiba E.A., Baibakova O.V., Gladysheva E.K., et al. Study of the influence of *Medusomyces gisevii* Sa-12 inoculum dosage on bacterial cellulose yield and degree of polymerization. Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. 2019. Vol. 9. № 3 (30). P. 420-429.
5. Jamal S.H., Roslan N.J., Shah N.A.A, et al. Conversion of bacterial cellulose to cellulose nitrate with high nitrogen content as propellant ingredient. Solid State Phenomena. 2021. Vol. 317. P. 305-311.
6. Roslan N.J., Jamal S.H., Ong K.K., et al. Preliminary study on the effect of sulphuric acid to nitric acid mixture composition, temperature and time on nitrocellulose synthesis based Nata de Coco. Solid State Phenomena. 2021. Vol. 317. P. 312-319.

7. Huang J. Zhao M., Hao Y., et al. Recent Advances in Functional Bacterial Cellulose for Wearable Physical Sensing Applications. *Advanced Materials Technologies*. 2021. Vol. 7. P. 1-14.
8. Wang Y., Jiang L., Dong J., et al. Three-dimensional network structure nitramine gun propellant with nitrated bacterial cellulose. *Journal of Materials Research and Technology*. 2020. Vol. 9. № 6. P. 15094-15101.
9. Chen J.L., Njoku D.I., Tang C., et al. Advances in Microfluidic Paper Based Analytical Devices (μ PADs): Design, Fabrication, and Applications. *Small Methods*. 2024. P. 2400155.
10. Горбатова П.А., Корчагина А.А., Гисматулина Ю.А. и др. Свойства нитратов целлюлозы, полученных нитрованием бактериальной целлюлозы с использованием смеси азотной и серной кислот. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2024. Т. 14. № 2. С. 236–244.
11. Shavyrkina N.A., Skiba E.A., Kazantseva A.E., et al. Static culture combined with aeration in biosynthesis of bacterial cellulose. *Polymers*. 2021. Vol. 13. № 23. P. 4241.
12. Корчагина А.А. Синтез нитратов целлюлозы из целлюлозы мискантуса гигантского сорта Камис, полученной в условиях опытно-промышленного производства. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2023. Т. 13. № 3 (46). С. 392-401.
13. Budaeva V.V., Gismatulina Y.A., Mironova G.F., et al. Bacterial nanocellulose nitrates. *Nanomaterials*. 2019. Vol. 9. № 12. P. 1694.
14. Корчагина А. А., Горбатова П. А., Будаева В. В., Золотухин В. Н. Нитрование целлюлозы с высокой степенью полимеризации из мискантуса сорта Сорановский. *Журн. Сиб. федер. ун-та. Химия*, 2024, 17(2). С. 268–278.
15. Liu J. Nitrate esters chemistry and technology. Singapore: Springer, 2019. 684 p.
16. Mattar H., Baz Z., Saleh A., et al. Nitrocellulose: Structure, synthesis, characterization, and applications. *Water Energy Food Environ*. 2020. Vol. 3. P. 1-15.
17. Skiba, E.A., Shavyrkina, N.A., Skiba, M.A, et al. Biosynthesis of Bacterial Nanocellulose from Low-Cost Cellulosic Feedstocks: Effect of Microbial Producer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24. № 18. P. 14401.
18. Kashcheyeva E.I., Korchagina A.A., Gismatulina Y.A., et al. Simultaneous Production of Cellulose Nitrates and Bacterial Cellulose from Lignocellulose of Energy Crop. *Polymers*. 2024. Vol. 16. P. 42.

УДК 577.114

ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ ИЗ ПРОДУКТА ЩЕЛОЧНОЙ ДЕЛИГНИФИКАЦИИ МИСКАНТУСА ГИГАНТСКОГО

А.А. Зенкова^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), г. Бийск, Россия.

²Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», (БТИ АлтГТУ), г. Бийск, Россия.

Бактериальная наноцеллюлоза является уникальным материалом, не имеющим аналогов, и имеет огромный спектр применения. В данной работе в качестве предварительной химической обработки была выбрана щелочная делигнификация 4 %-ным раствором гидроксида натрия, в результате был получен продукт щелочной делигнификации мискантуса. В результате данной обработки химический состав продукта щелочной делигнификации изменился по сравнению с нативным мискантусом следующим образом: снижение содержания лигнина в 2,3 раза и пентозанов в 9,0 раз, повышение содержания целлюлозы в 1,7 раз. В результате ферментативного гидролиза продукта щелочной делигнификации мискантуса конечная концентрация редуцирующих веществ достигла 12,0 г/л, из данного гидролизата была приготовлена питательная среда (путем введения фенольных веществ черного чая и пастеризации), затем был произведен биосинтез бактериальной наноцеллюлозы. В качестве продуцента использована симбиотическая культура *Medusomyces gisevii* Sa-12. В качестве контроля проводили биосинтез бактериальной наноцеллюлозы на полусинтетической глюкозной питательной среде в тех же условиях. Установлено, что на среде, полученной из мискантуса, численность уксуснокислых бактерий в 4,0 раза ниже, численность дрожжей в 2,5 раза ниже, выход бактериальной наноцеллюлозы в 3,8 раза ниже, степень полимеризации бактериальной наноцеллюлозы в 2,9 раз ниже, чем на полусинтетической питательной среде. Перечисленные показатели свидетельствуют о биологической недоброкачественности питательной среды, полученной из мискантуса, что обусловлено, в первую очередь, способом предварительной обработки (щелочной делигнификацией) и предположительно связано с наличием остаточных ионов натрия в питательной среде. Необходимо подчеркнуть, что по результатам растровой электронной микроскопии обнаружено, что толщина микрофибрилл бактериальной наноцеллюлозы, полученной на среде из мискантуса, в 1,5 раз ниже, чем в контроле.

Ключевые слова: мискантус гигантский, щелочная делигнификация, ферментативный гидролиз, биосинтез, бактериальная наноцеллюлоза.

Введение

Бактериальная наноцеллюлоза известна как биоцеллюлоза, или наноцеллюлоза, чаще всего для её производства используют уксуснокислые бактерии они являются облигатными аэробами, не патогенны, грамотрицательны и кислотоустойчивы [8]. Бактерии синтезируют целлюлозу из низкомолекулярных соединений (сахаров или других углеводов) и выделяют ее в водную среду в виде нанофибрилл. Бактериальная наноцеллюлоза представляет собой линейную цепь гликозидных колец, связанных между собой 1–4-гликозидной связью. Степень полимеризации бактериальной наноцеллюлозы по разным данным колеблется в широких пределах и составляет от 1000 до 10000 в зависимости от того, в каком режиме (статическом или динамическом) образцы были получены.

Процесс сборки бактериальной наноцеллюлозы происходит следующим образом: полимерные молекулы, синтезированные внутри бактериальной клетки, проходят через ее поры и формируют уже вне клетки протофибриллы диаметром 2-4 нм, процесс сборки регулируется

размерами и формой пор. Протофибриллы затем группируются в микрофибриллы в виде лент, имеющих толщину и ширину 2-6 и 70-140 нм [3].

Себестоимость производства бактериальной наноцеллюлозы очень высока. Данную проблему сможет решить переход с использования дорогостоящей глюкозы в качестве основы питательной среды на альтернативные среды, например, на ферментативные гидролизаты дешевой растительной целлюлозы. Бактериальная наноцеллюлоза, полученная на ферментативных гидролизатах, может применяться исключительно в технических целях: для производства биосенсоров [4]. Поскольку продуценты бактериальной наноцеллюлозы очень чувствительны к составу питательных сред, важно получить из целлюлозосодержащего сырья биологически доброкачественную питательную среду. Поэтому питательную среду целесообразно получать методом ферментативного гидролиза, осуществляемым в мягких условиях. Известно, что напрямую нативное целлюлозосодержащее сырьё не ферментируется, поэтому оно должно быть предварительно обработано физическими, химическими, биологическими методами или их комбинацией.

Химическая предварительная обработка позволяет увеличить массовую долю (м.д.) целлюлозы, что приводит к повышению общей эффективности биоконверсии для получения редуцирующих веществ, а также удаляет часть кислотонерастворимого лигнина и пентозанов. Для недревесного целлюлозосодержащего сырья классическим методом предварительной химической обработки является щелочная делигнификация. В данной работе в качестве недревесного целлюлозосодержащего сырья был выбран мискантус гигантский, который представляет собой многолетнюю корневищную траву с высоким потенциалом урожайности и низкими потребностями в питательных веществах. Благодаря высокому содержанию углеводов переработка мискантуса биотехнологическим путем является перспективным направлением [7, 9].

Целью исследования является выявление особенностей процесса биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы на питательной среде, полученной на основе ферментативного гидролизата продукта щелочной делигнификации мискантуса гигантского. В качестве контроля использована полусинтетическая глюкозная питательная среда.

Оборудование и материалы

В качестве сырья использовали мискантус гигантский сорт КАМИС, предоставленный ООО «Мастер Брэнд», г. Москва, Россия. Мискантус был предварительно обработан на опытном производстве в стандартной емкости объемом 250 л 4 %-ным раствором гидроксида натрия при температуре 90-96 °С и атмосферном давлении в течение 6 ч. Полученный продукт щелочной делигнификации отжимали на вакуум-фильтре и промывали водой до нейтральной реакции. Химический состав нативного мискантуса исследовали согласно [5], а продукта щелочной делигнификации – в соответствии с [1].

Ферментативный гидролиз нативного мискантуса и его продукта щелочной делигнификации проводили по методике [6] в течение 72 ч при постоянном перемешивании, используя следующие ферментативные препараты «Целлолюкс-А» (грибного происхождения, ООО ПО «Сиббиофарм», Россия) и «Ультрафло-Коре» (продуцент *Trichoderma reesei*, «Novozymes A/S», Дания). Биосинтез бактериальной наноцеллюлозы проводили на полусинтетической глюкозной питательной среде (контроль) и питательной среде на основе ферментативного гидролизата продукта щелочной делигнификации мискантуса с использованием симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12. Для получения питательной среды ферментативный гидролизат нагревали до температуры 100 °С, затем вносили черный чай в количестве 10 г/л, выдерживали 15-20 мин и охлаждали до температуры культивирования 27 °С. Инокулят вносили в количестве 10 об. % от объема питательной среды, культивирование производили в течение 10 суток. Методика биосинтеза многократно апробирована в условиях лаборатории и опытного производства [10, 11].

Полученные образцы бактериальной наноцеллюлозы сначала промывали до жемчужно-белого цвета, после чего высушили в лиофильной сушилке «HR7000-М» (Harvest Right, LLC, США) до постоянной массы и рассчитывали выход. Определена степень полимеризации [2], по результатам растровой электронной микроскопии рассчитана толщина нанофибрилл.

Обсуждение результатов

Химический состав нативного мискантуса гигантского и его продукта щелочной делигнификации приведен в табл. 1.

Таблица 1

Химический состав мискантуса гигантского и продукта щелочной делигнификации мискантуса гигантского

Сырьё	Массовая доля, %				
	целлюлозы по Кюршнеру	пентозанов	кислотонерастворимого лигнина	золы	ЖВФ
Мискантус	50,16	21,16	19,46	1,63	0,48
ПЩД мискантуса	84,65	2,32	8,22	3,95	0,28

Примечание: ПЩД – продукт щелочной делигнификации, ЖВФ – жировосковая фракция

Данные таблицы позволяют сделать вывод, что содержание лигнина и пентозанов после щелочной делигнификации снизились в 2,3 раза и 9,0 раз, соответственно, содержание целлюлозы, в свою очередь, увеличилось в 1,7 раз. Повышение массовой доли золы и низкая степень делигнификации могут свидетельствовать о «переваре» в условиях опытного производства.

Результаты ферментативного гидролиза нативного мискантуса и его продукта щелочной делигнификации показали преимущество последнего субстрата. Реакционная способность нативного мискантуса к ферментативному гидролизу оказалась крайне нерезультативной, так как конечная концентрация редуцирующих веществ составила всего 0,6 г/л. Концентрация редуцирующих веществ в гидролизате продукта щелочной делигнификации составила 12,0 г/л. Из полученных данных можно сделать вывод, что щелочная делигнификация мискантуса является очень эффективной, так как повышает конечную концентрацию редуцирующих веществ в 20 раз.

Растровая электронная микроскопия нативного мискантуса, его продукта щелочной делигнификации до и после ферментативного гидролиза представлены на рис. 1.

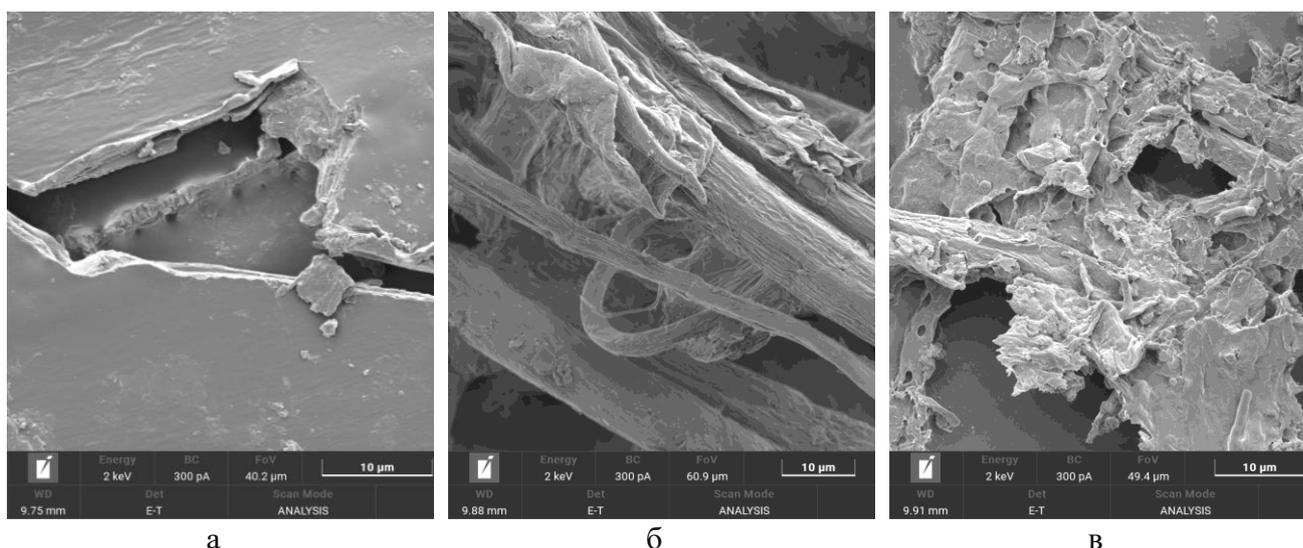


Рисунок 1 – РЭМ мискантуса гигантского сорта КАМИС

- а) нативный мискантус; б) продукт щелочной делигнификации мискантуса; в) продукт щелочной делигнификации мискантуса после ферментативного гидролиза

Представленные данные позволяют утверждать, что в процессе щелочной делигнификации разрушается природная матрица сырья (нарушается сплошность поверхности частицы, рис. 1а), освобождаются волокна в продукте щелочной делигнификации (рис. 1б), после

ферментативного гидролиза волокон в продукте щелочной делигнификации стало намного меньше (рис. 1в).

В результате биосинтеза получены образцы бактериальной наноцеллюлозы на питательной среде из ферментативного гидролизата продукта щелочной делигнификации мискантуса (начальная концентрация редуцирующих веществ 12,0 г/л) и на полусинтетической глюкозной питательной среде (начальная концентрация редуцирующих веществ 20,0 г/л). На начальном этапе в инокуляте количество дрожжей – $1,1 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, уксуснокислых бактерий – $1,2 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, активная кислотность – 3,0 ед. рН.

Микробиологические исследования биосинтеза позволили обнаружить следующие различия. Начальная кислотность питательной среды из ферментативного гидролизата составила 4,9 ед. рН так как в качестве основы для ферментативного гидролизата использовали ацетатный буферный раствор в отличии от контроля, в котором начальная кислотность составила 7,0 ед. рН. После 10 суток биосинтеза содержание дрожжей увеличилось до $10 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, содержание уксуснокислых бактерий возросло до $4,5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, что подтверждает симбиоз микроорганизмов в данном эксперименте. В процессе кислотность среды составила 7,5 ед. рН, а концентрация редуцирующих веществ снизилась от 12,0 до 0,9 г/л. Выход бактериальной наноцеллюлозы составил 3,1 %, степень полимеризации целлюлозы – 1020, причем толщина микрофибрилл на уровне 40 нм. Сравнение полученных данных с контролем показывает, что экспериментальная питательная среда значительно уступает контрольному опыту: микробиологические показатели значительно лучше (содержание дрожжей $25 \cdot 10^6$ КОЕ/мл и уксуснокислых бактерий $18 \cdot 10^6$ КОЕ/мл), выход бактериальной наноцеллюлозы выше в 3,8 раза и составил 11,8 %, степень полимеризации выше в 3 раза (3000). Но следует подчеркнуть, что толщина микрофибрилл в 1,5 раза больше (60 нм).

Снижение выхода бактериальной наноцеллюлозы по сравнению с контролем может быть связано с наличием в питательной среде ионов натрия. Известно, что продукты щелочной делигнификации очень трудно отмыть от остаточных ионов натрия, а ионы натрия могут быть ингибиторами процессов микробиологического синтеза.

Заключение

Щелочная делигнификация мискантуса в условиях опытно-промышленного производства обеспечила повышение содержания целлюлозы в 1,7 раз, снижение пентозанов в 9,0 раз, лигнина в 2,3 раза по сравнению с нативным сырьём. Продукт щелочной делигнификации мискантуса является более перспективным субстратом, поскольку наблюдается повышение конечной концентрации редуцирующих веществ с 0,6 г/л до 12 г/л, то есть реакционная способность к ферментативному гидролизу увеличилась в 20 раз, что свидетельствует об эффективности щелочной делигнификации мискантуса.

При биосинтезе на среде, полученной из мискантуса, через 10 суток численность уксуснокислых бактерий в 4 раза ниже, численность дрожжей в 2,5 раз ниже, выход бактериальной наноцеллюлозы в 3,8 раз ниже, степень полимеризации бактериальной наноцеллюлозы в 2,9 раз ниже, толщина микрофибрилл бактериальной наноцеллюлозы в 1,5 раз ниже, чем на полусинтетической питательной среде. Перечисленные показатели свидетельствует о биологической недоброкачественности питательной среды, полученной из мискантуса, что обусловлено, в первую очередь, способом предварительной обработки (щелочной делигнификацией) и, предположительно, связано с наличием остаточных ионов натрия в питательной среде.

Благодарности. Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00107, <https://rscf.ru/project/22-13-00107/> при использовании оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск).

Библиографический список

1. Гладышева Е.К. и др. Отбор травянистого целлюлозосодержащего сырья, пригодного для биотехнологической переработки // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология, 2023. Т. 13. №. 2 (45). С. 310-317. DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-2-310-317>.

2. Зенкова А.А. Зависимость степени полимеризации бактериальной наноцеллюлозы, полученной из мискантуса гигантского сорта КАМИС, от вида химической предварительной обработки // *Химия и технология растительных веществ*, 2024. С. 78.
3. Скворцова З.Н. и др. Физико-химическая механика бактериальной целлюлозы // *Коллоидный журнал*, 2019. Т. 81. №. 4. С. 441-452.
4. Akki A. J. et al. Microbial biotechnology alchemy: Transforming bacterial cellulose into sensing disease. A review // *Sensors International*, 2024. 100277 p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2023.100277>.
5. Gismatulina Y.A., Budaeva V.V., Kortusov A.N., Kashcheyeva E.I., Gladysheva E.K., Mironova G.F., et al. Evaluation of chemical composition of *Miscanthus × giganteus* raised in different climate regions in Russia. *Plants*, 2022. Vol. 11. № 20. 2791 p. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11202791>.
6. Kashcheyeva E.I., Gismatulina Yu.A., Mironova G.F., Gladysheva E.K., Budaeva V.V., Skiba E.A., Zolotuhin V.N., Shavyrkina N.A., Kortusov A.N. Korchagina A.A. Properties and hydrolysis behavior of celluloses of different origin // *Polymers*, 2022. Vol. 14. P. 3899. DOI: **Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки..**
7. Mironova G.F., Budaeva V.V., Skiba E.A., Gismatulina Y.A., Kashcheyeva E.I., Sakovich G.V. Recent Advances in *Miscanthus* Macromolecule Conversion: A Brief Overview // *International Journal of Molecular Sciences*, 2023. Vol. 24, №. 16. 13001 p. DOI: [10.3390/ijms241613001](https://doi.org/10.3390/ijms241613001).
8. Quijano L. et al. Bacterial Cellulose Cookbook: A Systematic Review on Sustainable and Cost-Effective Substrates // *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2024.05.003>.
9. Shavyrkina N.A., Budaeva V.V., Skiba E.A., Gismatulina Y.A., Sakovich G.V. Review of Current Prospects for Using *Miscanthus*-Based Polymers // *Polymers*. 2023. Vol. 15. №. 14. 3097 p. <https://doi.org/10.3390/polym15143097>
10. Skiba E.A., Shavyrkina N.A., Skiba M.A., Mironova G.F., Budaeva V.V. Biosynthesis of Bacterial Nanocellulose from Low-Cost Cellulosic Feedstocks: Effect of Microbial Producer. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023. Vol. 24. № 18. 14401 p. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms241814401>.
11. Shavyrkina N. A. et al. Scale-up of biosynthesis process of bacterial nanocellulose // *Polymers*, 2021. Vol. 13. № 12. 1920 p. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym13121920>.

УДК 66.092-977-922

СОВМЕСТНЫЙ ПИРОЛИЗ РАСТИТЕЛЬНОЙ БИОМАССЫ И ПЛАСТИКОВЫХ ОТХОДОВ

С.И. Исламова, М.В. Слобожанинова, Ю.В. Караева

Институт энергетики и перспективных технологий ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

В работе представлены результаты совместного пиролиза биомассы амаранта и отходов полиэтилена низкой плотности в соотношении 1:1 при температуре 550°C. Изучены характеристики пиролиза с помощью термогравиметрического анализа и ИК-Фурье-спектроскопии. Приведен материальный баланс пиролиза.

Ключевые слова: биомасса, полиэтилен низкой плотности, совместный пиролиз, ТГА.

CO-PYROLYSIS OF PLANT BIOMASS AND PLASTIC WASTE

S.I. Islamova, M.V. Slobozhaninova, Yu.V. Karaeva

*Institute of Power Engineering and Advanced Technologies FRC Kazan Scientific Center of RAS,
Kazan, Russia*

The paper presents the results of co-pyrolysis of amaranth biomass and low-density polyethylene waste in the ratio of 1:1 at 550°C. The characteristics of pyrolysis were studied by thermogravimetric analysis and FTIR spectroscopy. The material balance of pyrolysis is given.

Keywords: biomass, low-density polyethylene, co-pyrolysis, TGA.

Введение

Россия занимает третье место в мире по объему не утилизируемого пластика. По прогнозам к концу 2024 года 3,2 миллиона тонн пластиковых отходов не будут переработаны и даже не попадут на полигоны твердых бытовых отходов [1]. Большинство пластиковых материалов, используемых в пищевой или упаковочной промышленности, не поддается биологическому разложению, и имеет ограниченный уровень вторичной переработки [2]. Одним из эффективных решений проблемы утилизации пластиковых отходов является их смешивание с биомассой в процессах термохимической конверсии. Пиролиз имеет ряд преимуществ относительно других методов, так как является «гибкой» технологией, благодаря удобному управлению параметрами процесса для оптимизации выхода продукта. При нагревании в отсутствие кислорода длинноцепочечные полимерные молекулы термически разлагаются на более мелкие и менее сложные молекулы [3].

Растительная биомасса – это экологически чистый и возобновляемый углеродсодержащий источник энергии. Наиболее распространенной и недорогой является лигноцеллюлозная биомасса, которая в основном состоит из гемицеллюлозы, целлюлозы и лигнина. Лигноцеллюлозные источники биомассы бедны водородом, соотношение Н/С в них обычно колеблется от 0 до 0,3, поэтому при их пиролизе выход нефтехимических продуктов относительно низок. Полимерные отходы в основном состоят из полиолефинов с более высоким отношением Н/С, чем у источников биомассы [4]. Смешивание полимеров с биомассой создает больше свободных радикалов и может подавлять образование длинноцепочечных углеводородных соединений. Этот синергетический эффект между олефинами, полученными из пластика, и фрагментами, полученными из лигнина, целлюлозы и гемицеллюлозы, может привести к значительному улучшению свойств пиролизной жидкости [5].

Основная часть

Объекты исследования

В качестве образца растительной биомассы была выбрана надземная часть (листья, соцветия и стебли) сорного растения амаранта красного (*Amaranthus cruentus* L.) (АМ). Это

быстрорастущее растение способно произрастать в любой климатической зоне и достигать 1,5-3 м в высоту, что позволяет получать огромные ресурсы лигноцеллюлозной биомассы при незначительном расходе воды и удобрений [6]. Растения выращивали в полевых условиях. Биомассу амаранта высушивали, измельчали и просеивали для получения массы с размером частиц менее 1 мм (рис. 1(а)). Образцы белого полиэтилена низкой плотности (ПЭНП) измельчали до получения фракции 5×5 мм (рис. 1(б)).

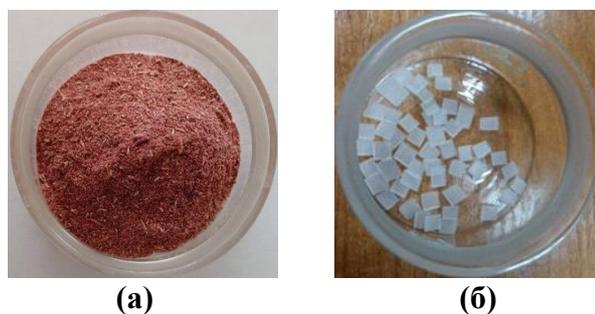


Рис. 1. Фотографии сухой биомассы АМ(а) и ПЭНП (б)

Измельченную биомассу АМ и ПЭНП смешивали в массовом соотношении 1:1, после чего смесь подвергали термическому анализу и пиролизу в лабораторной установке.

Методика проведения эксперимента

Перед экспериментами по пиролизу проведен синхронный термический анализ в сочетании с ИК-Фурье-спектроскопией смеси амаранта и ПЭНП для оценки ее термической стабильности и определения температуры, при которой материалы начинают разлагаться. Тепловое поведение смеси изучали с помощью термогравиметрического анализатора STA449-F3 (“NETZSCH”, Германия) и ИК-Фурье-спектрометра Tensor 27 (“Bruker Corp.”, США). Около 10 мг смеси загружали в тигель ТГА и нагревали от комнатной температуры до 1000 °С со скоростью нагрева 5 °С/мин при расходе аргона 50 мл/мин. Термогравиметрические (ТГ) и дифференциальные термогравиметрические (ДТГ) данные были получены из процентной потери веса образца и процентной потери веса в единицу времени соответственно.

Эксперимент по пиролизу проводился в лабораторной установке, включающей трубчатый реактор, при температуре 550°С и скорости нагрева 5°С/мин. В результате экспериментов получены три продукта: пиролизный газ, пиролизная жидкость и твердый углеродистый остаток. После завершения процесса пиролиза составлен материальный баланс.

Результаты и обсуждение

Термический анализ

ТГ- и ДТГ-кривые смеси представлены на рис. 2 (а). Поведение термического разложения смесей во время пиролиза зависит от поведения отдельного компонента, входящего в состав смеси. Процесс термического разложения смеси амаранта и ПЭНП можно разделить на три стадии. На первой стадии (ниже 190 °С) наблюдалась постепенная потеря веса из-за испарения влаги в ячейках и внешней влаги, ограниченной поверхностным натяжением. Компонент влаги вносился в смесь за счет содержания биомассы [7].

На второй стадии, соответствующей основному процессу разложения, происходила быстрая потеря массы в интервале температур 190-550 °С в результате удаления летучих веществ из гемицеллюлозы, целлюлозы и лигнина. Гемицеллюлоза является аморфным низкомолекулярным материалом, поэтому ее фракция может разлагаться при более низких температурах примерно 170 и 360 °С. Из-за стабильной и кристаллической структуры целлюлозы требуется более высокий температурный диапазон (от 315 до 400 °С). Лигнин имеет сложную структуру с разветвлением, что способствует широкому температурному диапазону от 250 до 550 °С разложения [8]. На ДТГ-кривой наблюдался температурный пик, характеризующий максимальную скорость разложения смеси (464,2 °С). Данная стадия включала в себя комбинацию разложения двух материалов, содержащихся в каждой смеси, что вызвало, так называемый, синергетический эффект разложения. Установлено, что по сравнению с биомассой,

пластмассы, в основном, разлагаются в одну стадию при повышенной температуре в течение очень короткого периода времени. Это обусловлено их однородной структурой [9]. На ДСК-кривой заметны эндотермические пики при температуре от 305,5 °С, которые обусловлены разрывом связей с образованием летучих веществ из компонента биомассы. Эндотермические пики 431,2 и 465,1 °С предположительно связаны с энергией, необходимой для расщепления углеродных цепей с образованием свободных радикалов во время разложения компонента ПЭНП [10].

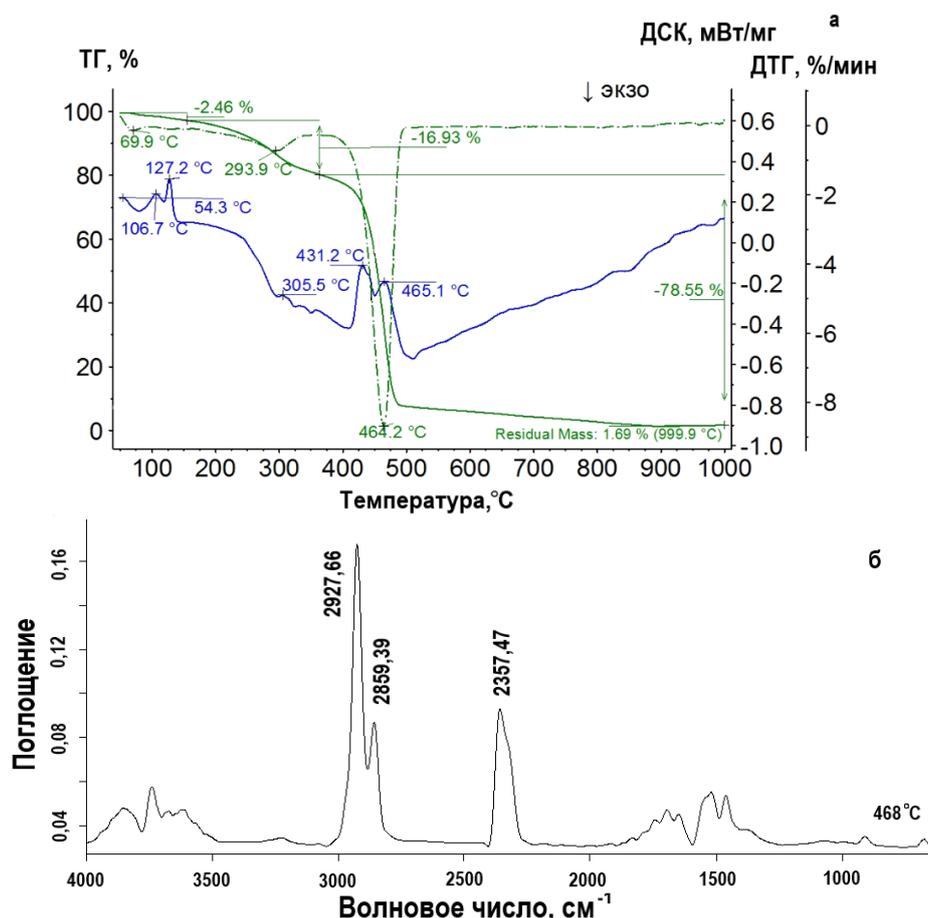


Рис. 2. ТГ, ДТГ и ДСК-кривые пиролиза смеси АМ и ПЭНП (а); ИК-Фурье спектр (б)

На третьей стадии карбонизации (выше 550 °С) остаток разлагался очень медленно и образовывалось остаточное углеродистое твердое вещество [11]. Выше данной температуры присутствие терморазлагаемого материала в исследуемой смеси было пренебрежимо мало.

ИК-Фурье-спектроскопический анализ

На рис. 2 (б) представлена кривая Грам-Шмидта, отражающая интегральную интенсивность максимумов поглощения выделяемых газообразных веществ при скорости нагрева 5 °С/мин, что позволило выявить области наибольшего газовыделения. Небольшие колебания спектров в диапазоне волновых чисел 3500-4000 см⁻¹ и 1250-2000 см⁻¹ указывают на выделения водяного пара, полученного в результате разложения кислородсодержащих групп. Профиль выделения CO₂ имел один явный пик (468 °С) в диапазоне волновых чисел 2240-2400 см⁻¹. Согласно [12], основным вкладом в количество CO₂ при низких температурах считается процесс пиролиза гемицеллюлозы. Значительный пик спектра при температуре 468 °С в пределах 2750-3100 см⁻¹ указывает на наличие метила и метилена (С-Н), т.е. образуется большое количество алифатических углеводов [13].

Продукты, полученные в экспериментах по совместному пиролизу

В результате совместного пиролиза АМ и ПЭНП получены три продукта: газ, пиролизная жидкость и твердый остаток (рис. 3). Выход пиролизной жидкости составил 59%, твердого остатка – 16,5%, газа – 24,5%. Массовая доля жидкого продукта наибольшая среди продуктов

пиролиза, что связано с разнообразным химическим составом биомассы АМ, которая содержит большое количество веществ фенольной природы, органические кислоты, аминокислоты, пектиновые вещества, дубильные вещества и др. [14]. Кроме того, более высокому выходу пиролизной жидкости может способствовать значительное содержание гемицеллюлозы, а также температура пиролиза 450-550 °С [15]. Жидкий продукт пиролиза смеси АМ и ПЭНП состоял из двух органических фракций, имеющих воскообразную структуру, и одной водной фракции.



Рис. 3. Фотографии продуктов пиролиза: твердый остаток (а); пиролизная жидкость (б)

Как показывают исследования, пиролизная жидкость, получаемая из чистого ПЭНП, по содержанию аналогична дизельному топливу, вязкая по структуре и имеет низкую теплотворную способность (~30 МДж/кг) [16]. В свою очередь, состав жидкого продукта пиролиза АМ богат кислородсодержащими соединениями, алифатическими углеводородами и фенольными соединениями, что делает возможным использование его как в качестве топлива, так и в качестве источника ценных химических веществ [6].

Выводы

Исследован совместный пиролиз смеси биомассы АМ и отходов ПЭНП в соотношении 1:1. Термическое разложение смеси характеризуется тремя основными стадиями: испарение влаги, удаление летучих веществ и карбонизация. ИК-Фурье-спектры показали наличие углекислого газа и алифатических углеводородов в выделяемом газе. Определено процентное содержание продуктов пиролиза: газ (24,5 %), пиролизная жидкость (59 %) и твердый углеродистый остаток (16,5 %). Для оценки возможности использования продуктов совместного пиролиза АМ и ПЭНП в качестве топлива или источника ценных химических веществ планируется проведение дополнительных исследований.

Библиографический список

1. <https://ecosphere.press>
2. Elsheikh A.H., Panchal H., Shanmugan S., Muthuramalingam T., El-Kassas A.M., Ramesh B. Recent progresses in wood-plastic composites: pre-processing treatments, manufacturing techniques, recyclability and eco-friendly assessment. *Clean Eng Technol*, 2022, №8, P. 100450.
3. Sharuddin S.D.A., Abnisa F., Daud W.M.A.W., Aroua M.K. A review on pyrolysis of plastic wastes. *Energy Convers. Manag.* 2016. №115, P. 308-326.
4. Chattopadhyay J., Pathak T., Srivastava R., Singh A. Catalytic co-pyrolysis of paper biomass and plastic mixtures (HDPE (high density polyethylene), PP (polypropylene) and PET (polyethylene terephthalate)) and product analysis. *Energy*, 2016, №103, P. 513-521.
5. Dong R., Tang Z., Song H., Chen Y., Wang X., Yang H., Chen H. Co-pyrolysis of vineyards biomass waste and plastic waste: Thermal behavior, pyrolytic characteristic, kinetics, and thermodynamics analysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2024, №179, P. 106506.
6. Karaeva J., Timofeeva S., Gilfanov M., Slobozhaninova M., Sidorkina O., Luchkina E., Panchenko V., Bolshev V. Exploring the Prospective of Weed *Amaranthus retroflexus* for Biofuel Production through Pyrolysis. *Agriculture*, 2023, №13, P. 687.

7. Cepeliogullar O., Putun A.E. Thermal and kinetic behaviors of biomass and plastic wastes in co-pyrolysis. *Energy Conversion and Management*, 2013. №75, P. 263-270.
8. Valadão L.S., Duarte C.S., Santos D.G., Filho P.J.S. Conversion of peach endocarp and polyethylene residue by the co-pyrolysis process. *Environmental Science and Pollution Research*, 2022, №29, P. 10702-10716.
9. Kaushik V.S., Dhanalakshmi C.S., Madhu P., Tamilselvam P. Co-pyrolysis of neem wood bark and low-density polyethylene: influence of plastic on pyrolysis product distribution and bio-oil characterization. *Environmental Science and Pollution Research*, 2022, №29, P. 88213-88223.
10. Gunasee S.D., Danon B., Görgens J.F., Mohee R. Co-pyrolysis of LDPE and cellulose: Synergies during devolatilization and condensation. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2017, №126, P. 307-314.
11. Han B., Chen Y., Wu Y., Hua D., Chen Z., Feng W., Yang M., Xie Q. Co-pyrolysis behaviors and kinetics of plastics–biomass blends through thermogravimetric analysis. *J Therm Anal Calorim*, 2014, №115, P. 227-235.
12. Yang H., Yan R., Chen H., Lee D.H., Zheng C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, 2007, №86, P. 1781-1788.
13. Yang J., Chen H., Zhao W., Zhou J. TG-FTIR-MS study of pyrolysis products evolving from peat. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 2016. №117. P. 296-309.
14. Soshnikova O.V., Yatsuk V.Y. The investigations of the chemical composition of *Amaranthus retroflexus* L. *Russ. Med. Biol. Her.* 2010, №18, P. 135-141.
15. Bai X., Wang G., Zhu Z., Cai C., Wang Z., Wang D. Investigation of improving the yields and qualities of pyrolysis products with combination rod-milled and torrefaction pretreatment. *Renew. Energy*, 2020, №151, P. 446-453.
16. Chaudhary A., Lakhani J., Dalsaniya P., Chaudhary P., Trada A., Shah N.K., Upadhyay D.S. Slow pyrolysis of low-density Poly-Ethylene (LDPE): A batch experiment and thermodynamic analysis. *Energy*, 2023, № 263, P. 125810.

УДК 631.147

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ КЛАСТЕР. ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ И РАЗВИТИЯ.**И. И. Истомин***Руководитель проекта «Переработка биологических отходов личинками мух с получением кормового белка и биоудобрения» в компании «Новые Биотехнологии», г. Липецк, Россия.*

Целью статьи является описание биотехнологического кластера, в рамках которого реализуются технологии переработки биологических отходов, которые смогут позволить максимально и массово извлекать компоненты сырья с высокой биогенной и кормовой доступностью, превращая их в экологически безопасные и полезные для здоровья продукты.

Ключевые слова. Переработка отходов, биокорм, биоудобрение, стартовый корм, выращивание форели, выращивание зелени.

Альфред Маршалл в своей книге "Принципы экономики", опубликованной в 1890 году, впервые охарактеризовал кластеры как "концентрацию специализированных отраслей промышленности в определенных населенных пунктах" [1]. В нашем понимании, кластер - это ряд взаимосвязанных предприятий, которые активно взаимодействуют друг с другом. Кластер рассматривается нами как самостоятельная единица, где «на входе» - биологические отходы, а «на выходе» - востребованные на рынке продукты: рыба ценных пород, зелень, биокорм, удобрения (рис. 1).



Рисунок 1. Биотехнологический кластер (схема).

Синергетический эффект кластера осуществляется за счет:

- физически близкого расположения подразделений («глаза в глаза»)
- все предприятия кластера имеют общую инфраструктуру, складское и транспортное хозяйство, управление, обслуживание и бухгалтерию, снижающие удельные накладные затраты на каждый продукт
- продукт одного предприятия является сырьём для другого

- основным входящим сырьём для работы кластера являются растительные и животные отходы с/х предприятий, пищевые отходы и продукты с истекающим сроком годности
- длинная цепочка добавленной стоимости максимизирует экономический эффект
- переток знаний и умений между технологиями
- общая идея, миссия, культура
- поддержка со стороны государства.

Как известно, в дикой природе не существует проблем, связанных с утилизацией и переработкой отходов биологического происхождения. Миллионы лет существования всех форм жизни на планете выработали оптимальные механизмы уничтожения ненужной или мертвой органики. В экосистемах эта органика включается в круговорот веществ в природе.

В биотехнологическом кластере используется природоподобная технология переработки биологических отходов личинками мух. Данная технология основана на способности личинок мух рода *Lucilia* и *Hermetia Illucens* перерабатывать мясные и растительные органические отходы, возвращая в цепочку питания сельскохозяйственных животных, птиц и рыб необходимый кормовой белок [2, 5]. Побочными продуктами переработки отходов являются биологический субстрат, являющийся ценным аминокислотным удобрением и энтомологический жир. Благодаря наличию хитина, лауриновой кислоты и многих других биологически активных веществ, высушенные личинки имеют ярковыраженную противовирусную и антибактериальную активность [3, 7]. А личинки мух рода *Lucilia* издревле с успехом используются для лечения труднозаживающих ран [4].

Включение кормового белка из личинок мух в состав стартового и производственного корма для ценных пород рыб (лососевые) наделяют его функцией лечебно-профилактического корма, существенно снижая заболеваемость и смертность на различных этапах выращивания [6]. Произведенный корм используется для выращивания форели на рыбной ферме, также входящей в состав биотехнологического кластера. На рыбной ферме используется технология выращивания в установках замкнутого цикла (УЗВ).

Преимущества УЗВ:

- значительная экономия воды по сравнению с прудовым разведением
- стабильный температурный режим, обеспечивающий постоянный рост рыбы (отсутствие сезонности)
- автоматизация выращивания (минимум персонала)
- контролируемая чистая среда – исключение попадания пестицидов, химикатов, тяжёлых металлов
- исключение инфекционных заболеваний и паразитов рыбы
- быстрый рост рыбы

Кроме форели возможно выращивание рыб других видов и ракообразных.

По достижении товарного веса рыбы, она отправляется на переработку: потрошение, соление, копчение, порционная переработка, упаковка в вакуум и т.п., далее – на прилавок магазина. Образующиеся при этом рыбные отходы возвращаются в цех сбора, сортировки и переработки отходов.

Вода из бассейнов для выращивания рыбы используется в качестве питательного раствора для тепличного хозяйства с технологией гидропоники для круглогодичного выращивания зелени и овощей (лук, петрушка, укроп, салат, микрозелень и т.п.), которые также отправляются на прилавок магазина.

Наличие в составе биотехнологического кластера научно-исследовательского центра позволяет не только совершенствовать и разрабатывать новые технологии кормопроизводства и растениеводства, но и тут же включать новые разработки в производственный процесс.

Таким образом, создание биотехнологического кластера, как самостоятельной производственной единицы с единым центром управления, позволяет одновременно решить несколько серьёзных проблем:

- утилизация биологических отходов, возвращая их в цепочку питания

- дефицит производства стартовых и продукционных кормов для ценных пород рыб
- отсутствие на прилавке рыбы ценных пород в достаточном количестве по доступной цене
- нехватка в магазинах свежей зелени (салаты, брокколини, базилик и т.п.).

Реализация проекта биотехнологического кластера открывает широкие перспективы развития:

1. увеличение мощностей кластера за счёт создания новых рыбных ферм и теплиц, расширение номенклатуры выращиваемой рыбы и зелени
2. выращивание и реализация мальков рыбы
3. создание отдельных крупных предприятий по переработке растительных и животноводческих отходов, с выпуском биокормов и кормовых добавок для рыб и птиц
4. защита и патентование результатов НИР и НИОКР по новым, ещё более эффективным технологиям производства кормов и их использования в разведении рыбы
5. продажа прав использования разработанных технологий (роялти), франшиз на создание аналогичных предприятий
6. масштабирование полученного опыта по всей стране
7. выращивание и реализация лечебных стерильных личинок для использования в медицине (удаление некрозов, дезинфекция, заживление язв и хронических ран без применения антибиотиков).

Библиографический список

1. Белусси, Ф.; Калдари, К. (2008-10-17). "[У истоков промышленного района: Альфред Маршалл и Кембриджская школа](#)". *Кембриджский экономический журнал*. **33** (2): 335-355
2. Способ переработки биологических отходов на территории агропромышленного объекта. Патент RU2759789C1. Истомин И.И. (подача 30.09.2020, публикация 17.11.2021) Доступно по ссылке в интернете: <https://patenton.ru/patent/RU2759789C1>
3. Питательные свойства личинок *Hermetia Illucens* L. — Нового кормового продукта для молодняка свиней. / Р.В. Некрасов и др./ *Сельскохозяйственная Биология*, 2019, том 54, № 2, с. 316-325. Доступно по ссылке в интернете: <https://www.agrobiology.ru/articles/2-2019nekrasov-rus.pdf>
4. Рональд А. Шерман. Терапия личинками возвращает нас в будущее ухода за ранами: Новая и улучшенная терапия личинками для 21 века. *Научно-технический журнал J Diabetes*. 2009 1 марта; 3 (2):336-442009. Доступно в интернете по ссылке: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20144365/>
5. Способ переработки биологических отходов с получением белкового корма и биоудобрения. Патент RU2644343C2. Истомин И.И. (подача 03.08.2016, публикация 08.02.2018. Доступно в интернете по ссылке: https://yandex.ru/patents/doc/RU2644343C2_20180208
6. Антимикробная активность личинок *Lucilia Caesar* в отношении бактерий, патогенных для человека и птицы. / Теймуразов М.Г. и др./ *Журнал «Ветеринария»*, № 2, 2018. Доступно в интернете по ссылке: <https://eposlink.com/ru/catalog/library/elibrary/book/veterinariya-1970/publication/127626/>

УДК 662.767.2

ОЦЕНКА ВЫХОДА БИОГАЗА ПРИ АНАЭРОБНОЙ КОНВЕРСИИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Ю.В. Караева, Е.Е. Олейникова, М.В. Слобожанинова

Институт энергетики и перспективных технологий ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

В работе изучено влияние добавки амаранта красного и биоугля из лузги подсолнечника на выход биогаза при анаэробной ферментации коровьего навоза. Произведено кинетическое описание процесса с помощью модифицированной модели Гомпертца. Предложены варианты реализации рассматриваемого метода сбраживания коровьего навоза с амарантом и биоуглем на примере поселка городского типа Актюбинский (Республика Татарстан).

Ключевые слова: биогаз, анаэробная ферментация, коровий навоз, растительное сырье, модифицированная модель Гомпертца

Введение

Глобальное потепление, вызванное усиленным парниковым эффектом, стало основной движущей силой катастрофических событий, происходящих на нашей планете: наводнения, засуха, лесные пожары, таяние ледников. Две основные причины сильного загрязнения окружающей среды парниковыми газами – сжигание ископаемого топлива и образование большого количества отходов различного происхождения (сельскохозяйственные, промышленные, пищевые, твердые бытовые отходы).

Численность населения ежегодно растет, появляется все больше энергоемких отраслей промышленности, а вместе с этим увеличивается потребление ископаемого топлива и количество отходов [4]. Полностью отказаться от данного топлива и предотвратить образование отходов невозможно, поскольку данные процессы прямо или косвенно связаны с удовлетворением потребностей человечества в разных сферах, поэтому важным моментом в улучшении экологической ситуации является полная или частичная замена традиционного топлива возобновляемыми источниками энергии и тепла, а также организация надлежащего способа управления отходами, не способствующего выбросам парниковых газов.

Технология анаэробной ферментации является перспективным решением данных проблем. Биогаз, получаемый в результате данного процесса, представляет собой альтернативное газообразное биотопливо, основными составными компонентами которого являются метан (40 – 75 %) и углекислый газ (15 – 60 %). Благодаря большому содержанию метана биогаз можно использовать для получения тепла, энергии и транспортного топлива. Сырой биогаз при стандартной температуре и давлении, содержащий 60% CH_4 , обладает теплотворной способностью, равной 21,5 МДж/м³, при тех же условиях у чистого CH_4 теплотворная способность составляет 35,8 МДж/м³ [1, 5].

Получение биогаза из отходов органического происхождения и дальнейшее его использование для получения тепла и энергии, поможет значительно сократить выбросы парниковых газов и предотвратить полное истощение ископаемых видов топлива. Несмотря на многолетние исследования в этой области, промышленное производство биогаза все еще ограничено, это связано в первую очередь с низкой производительностью, вызванной трудностью в разложении органического сырья [2]. В связи с этим актуальным направлением является разработка методов, позволяющих повысить степень разложения органических отходов и производительность процесса ферментации.

Цель данной работы заключалась в исследовании возможности повышения выхода биогаза при анаэробной ферментации коровьего навоза путем добавления растительного сырья (амаранта красного) и адсорбирующей добавки (биоугля из лузги подсолнечника).

Основная часть

Объекты исследования

Для проведения исследования в качестве основного перерабатываемого субстрата был выбран коровий навоз, содержащий 19,06 % сухого вещества и 8,72 % зольности. В качестве растительного сырья был выбран амарант красный, поскольку он обладает высокой скоростью фотосинтеза, хорошей адаптацией к любым условиям выращивания, а также является отличным активатором метаногенеза. Амарант, используемый в исследовании, содержал 92,50 % сухого вещества и 13,29 % зольности. В качестве адсорбирующей добавки был выбран биоуголь из лозги подсолнечника, полученный методом медленного пиролиза (температура 550°C). Содержание сухого вещества в биоугле составило 94,80 %, зольности - 10,07 %.

Методика проведения эксперимента

Эксперимент проводился на лабораторной биогазовой установке периодического действия, работающей в мезофильном температурном режиме (37°C). В состав установки входили 12 метантенков общим объемом 0,4 л, помещенные в водяную баню для обогрева перерабатываемой смеси, и 12 газгольдеров. Измерение объема образующегося биогаза производилось ежедневно с помощью волюмометрического метода на протяжении 41 дня.

В ходе эксперимента проводилось четыре параллельных опыта в трех повторах для каждого. Опыт №1 – контрольный опыт, где проводилось монображивание коровьего навоза (80 г навоза и 250 г воды). В опыте №2 изучалось влияние добавки биоугля из лозги подсолнечника на анаэробную переработку коровьего навоза (80 г навоза, 0,1 г биоугля и 250 г воды), в опыте №3 – влияние амаранта (64 г навоза, 4 г амаранта и 250 г воды), в опыте №4 – совместное влияние амаранта и биоугля (64 г навоза, 4 г амаранта, 0,1 г биоугля и 250 г воды).

Результаты и обсуждение

Кинетика получения биогаза

Для оценки динамики образования биогаза по полученным результатам эксперимента было произведено кинетическое описание процесса с помощью модифицированной модели Гомпертца (1):

$$F(t) = P \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_{\max} \cdot e}{P} \cdot (\lambda - t) + 1 \right] \right\}, \quad (1)$$

где $F(t)$ - суммарный выход биогаза в момент времени t , мл/г органического сухого вещества (оСВ); P – потенциальный выхода биогаза мл/г оСВ; R_{\max} – максимальная скорость производства биогаза мл/г оСВ·сут; λ – период лаг-фазы, сут; e - математическая константа.

Кинетические параметры P , R_{\max} и λ , представленные в таблице 1, были определены с помощью компьютерной программы, разработанной в Казанском научном центре РАН (сертификат № 2018662045).

Таблица 1

Кинетические параметры модифицированной модели Гомпертца

Опыт	P , мл/г оСВ	R_{\max} , мл/г оСВ·сут	λ , сут	Ср. кв. погрешность, %	R_2	R_2 по Пирсону
№1	166,990	9,225	10	8	0,9999	0,9802
№2	173,911	9,689	10	6	1,00	0,9896
№3	197,596	13,050	11	6	1,00	0,9978
№4	247,886	15,230	8	6	1,00	0,9912

Для всех опытов коэффициент детерминации (R_2) стремится к единице, а R_2 по Пирсону больше 0,9, следовательно, прогнозируемые значения хорошо согласуются с экспериментальными данными. Также средняя квадратическая погрешность во всех опытах меньше 10 %. Таким образом, модифицированное уравнение Гомпертца подходит для описания кинетики выхода биогаза в данном исследовании, а рассчитанные значения кинетических параметров можно считать достоверными.

Наименьший потенциальный выход биогаза характерен для опыта №1 (контроль). При добавлении биоугля к коровьему навозу выход биогаза увеличивается на 4,14 % (опыт №2), при

добавлении амаранта - на 18,33 % (опыт №3), при совместном добавлении угля и амаранта – на 48,44 % (опыт №4).

Все исследуемые варианты добавки способствуют повышению скорости выхода биогаза. Максимальная скорость газообразования при добавлении биоугля увеличивается незначительно по сравнению с контролем (на 5,03 %), тогда как добавка амаранта вызывает повышение скорости на 41,46 %. Наибольшее увеличение скорости газообразования (на 65,09 %) наблюдалось в опыте № 4. Продолжительность лаг-фазы при добавке биоугля не изменяется, а при добавке амаранта увеличивается на 1 день, однако совместное добавление амаранта и биоугля способствует интенсификации процесса и вызывает сокращение данного параметра на 2 дня по сравнению с контролем.

Таким образом, согласно кинетическому описанию эксперимента наибольшего выхода биогаза при анаэробной ферментации коровьего навоза можно добиться путем одновременного добавления фитомассы амаранта и биоугля из лузги подсолнечника.

Возможности реализации предлагаемого проекта

Рассмотрим реализацию данного подхода на примере поселка городского типа Актюбинский (Республика Татарстан). В настоящее время там работает биогазовая установка «Актюба», производящая газ для получения электричества (рис. 1).



Рис. 1. Фотография биогазовой установки [6]

На мегаферме находятся около 10 000 коров, поэтому ежедневно образуется около 500 т навоза. Для получения биогаза используется 3 метантенка. Генерируемая мощность составляет 1 МВт, при этом планируется увеличение этого показателя. Рассмотрим 2 варианта переработки отходов.

1 вариант. Для достижения уровня генерации в 1,5 МВт необходимо ежедневно перерабатывать: 400 т коровьего навоза, 25 т амаранта, 0,63 т биоугля. Следует отметить, что при этом конструкция биогазовой установки остается неизменной. Имеющаяся в поселении пиролизная установка позволит получать биоуголь непрерывно в течение всего года (без расходов на транспортировку и хранение). Для выращивания амаранта потребуется задействовать всего лишь 10 % от имеющихся площадей земель сельскохозяйственного назначения, а именно, 45,6 га. Наиболее урожайные сорта позволяют получить до 50 ц/га семян. Соответственно, это 228 т в год сырья, которое может использоваться для производства муки или масла. Например, выход цельномолотой амарантовой муки может составлять 92 %, а отрубей – 8 % [3]. Использование амаранта обладает хорошей перспективой, так как мука из его семян является безглютеновым продуктом. Площади посевов под культуру в РФ в настоящее время составляют около 10 тыс. га. Если считать цену муки равной 269 руб., а отрубей 576 руб., то доход от их реализации может составить 66,9 млн. руб. в год.

2 вариант. При ежедневной переработке смеси из 500 т коровьего навоза, 31,25 т амаранта и 0,78 т биоугля мощность генерации достигнет 1,9 МВт. Конструкция биогазовой установки

также остается неизменной. Для выращивания амаранта потребуется 57 га земель сельскохозяйственного назначения. Соответственно, урожайные сорта позволят получить до 50 ц/га семян, а это 285 тонн. Доход от реализации амарантовой муки и отрубей может составить 83,7 млн. руб. в год.

Выводы

Проведенное исследование показало, что интенсифицировать процесс анаэробной переработки коровьего навоза и увеличить выход биогаза на 48,44 % можно путем добавления такого растительного сырья, как амарант, и адсорбирующей добавки – биоугля из лузги подсолнечника. Данный метод сбраживания возможно реализовать двумя способами на одной из ферм Республики Татарстан, в результате чего повысится годовой доход от производства.

Библиографический список

1. Chozhavendhan S., Karthigadevi G. et al. Current and prognostic overview on the strategic exploitation of anaerobic digestion and digestate: A review. *Environmental Research*. 2023. Vol. 216. P. 452 – 468.
2. Jameel M. K., Mustafa M. A. et al. Biogas: Production, properties, applications, economic and challenges: A review. *Results in Chemistry*. 2024. Vol. 7. P. 215 – 245.
3. Kandrokov R., Bekshokov K., Bekshokova P. Продукты переработки зерна амаранта как источники растительного белка, крахмала, жира и антиоксиданта. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*. 2024. Том 16. №2. С. 403 – 430.
4. Kundu R., Kunnoth B. et al. Biochar symbiosis in anaerobic digestion to enhance biogas production: A comprehensive review. *Journal of Environmental Management*. 2023. Vol. 344. P. 135 – 152.
5. Wang Q., Xia C. et al. Biogas generation from biomass as a cleaner alternative towards a circular bioeconomy: Artificial intelligence, challenges, and future insights. *Fuel*. 2023. Vol. 333. P. 264 – 271.
6. Биогазовая станция «Актюба». URL: <https://transut.ru/projects/aktyuba> (дата обращения: 10.07.2024).

УДК 676.157

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВТОРИЧНЫХ ВОЛОКОН ЛУБЯНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭКОЛОГИЧНОЙ БУМАЖНОЙ УПАКОВКИ

А.А. Карелина, Ю.Д. Алашкевич, В.А. Кожухов, К.А. Хохлов

*Сибирский государственный университет науки и технологий им. М.Ф. Решетнева,
Красноярск, Россия*

Растущая сфера применения лубяных культур неизбежно влечет за собой и увеличение числа отходов. В связи с этой тенденцией становится актуальным вопрос их переработки. Одной из сфер применения может стать целлюлозно-бумажная промышленность. Для реализации потенциала недревесного сырья целесообразно применять размол массы высокой концентрации.

Ключевые слова: размол, ножевая гарнитура, волокнистая масса высокой концентрации, недревесное сырье, техническая конопля, лен, целлюлозно-бумажное производство, сельскохозяйственные отходы.

Начиная с 2010 года, в России наблюдается повышение интереса к возделыванию и переработке лубяных культур, расширяются сферы применения волокна, семян, костры. Согласно анализу данных об объемах заготовки льна и конопли наибольший прирост посевных площадей за период 2010-2022 наблюдался у технической конопли, почти в 16 раз. Это связано со снятием запрета на её выращивание. По состоянию на 2022 год лен возделывается в 57 субъектах РФ, а конопля в 31 субъекте. Это обуславливает большое количество отходов, которые необходимо эффективно перерабатывать [1, 4].

Лубяные волокна (техническая конопля и лен) обладают такими особенностями как высокое содержание целлюлозы и большая исходная прочность. Поэтому их целесообразно применять в качестве альтернативного источника сырья в ЦБП (табл. 1) [2, 8, 9].

Таблица 1

Характеристика лубяных волокон

Вид сырья	Содержание целлюлозы, %	Урожайность, т/га	Прочность на разрыв, МПа
Техническая конопля	60-77	12	814
Лен	75-82	2-2,5	745

Вместе с тем недревесные волокна обладают рядом других преимуществ, среди которых: короткий вегетационный период и как следствие ежегодная возобновляемость, высокие годовые урожаи, более низкое содержание лигнина по сравнению с древесиной, более легкая отбелка [6, 10].

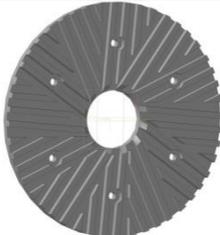
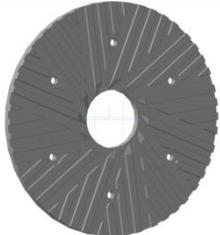
Размол является одной из важнейших операций в производстве бумаги и картона. Он представляет собой процесс механической переработки растительных волокон в водной среде и осуществляется с помощью механического и гидродинамического воздействия. Назначением размола является придание волокнистому материалу определенных размеров волокнам с целью обеспечения требуемой структуры бумаги и придание определенной степени гидратации, от которой зависит сила сцепления волокон между собой [8]. Поэтому очень важно постоянно внедрять новые технологии и совершенствовать этот процесс. Одним из путей совершенствования является применение размола массы высокой концентрации. Плюсами такой обработки является: более низкое энергопотребление в сравнении с размолом массы низкой концентрации, незначительное укорочение волокон, рост удельной поверхности волокон, увеличение внутреннего фибриллирования, повышение показателей прочности [7]. Принимая во внимание то, что волокнистый полуфабрикат из лубяных культур является длиноволокнистым, необходимо интенсифицировать процесс размола посредством внедрения новых конструкций

размалывающего оборудования. В связи с этим коллективом кафедры МАПТ СибГУ им. М.Ф. Решетнева была разработана ножевая дисковая гарнитура с окружной формой ножей, предназначенная специально для обработки длиноволокнистого полуфабриката высокой концентрации [5].

Использование гарнитуры с окружной формой ножей позволяет улучшить качество волокнистой массы из недревесного сырья путем преимущественного фибриллирования волокон, а не их укорочения. Это осуществимо благодаря развитию больших касательных усилий на кромках окружных ножей, чем на кромках прямых ножей традиционных гарнитур. Кроме того, особенностью размола массы высокой концентрации считается и то, что в зоне размола образуется волокнистая прослойка значительной толщины, которая также способствует внешнему фибриллированию волокон за счет многократного их скручивания и истирания. В табл. 2 приведены сравнительные значения показателя разрывной длины бумажных отливок, изготовленных из технической конопли.

Таблица 2

Сравнение значений показателя разрывной длины в зависимости от использования различных конструкций гарнитур

Физико-механический показатель	Гарнитура с окружной формой ножей	Традиционная гарнитура 20°	Традиционная гарнитура 35°
			
Разрывная длина, м	3136	2417	2993

Такой физико-механический показатель как разрывная длина выбран основным для определения качества бумажных отливок согласно ГОСТ 8273-75. Этот стандарт устанавливает значение разрывной длины равное 2200 м марок Д (из небеленой целлюлозы, полуцеллюлозы и древесной массы) и Е (из макулатуры, небеленой целлюлозы и волокнистых отходов целлюлозно-бумажного производства) при производстве оберточной бумаги. Количественные значения, полученные при испытании бумажных отливок, изготовленных после размола с использованием различных конструкций гарнитур, наглядно доказывают преимущество обработки волокнистой массы окружной гарнитурой [3].

Применение гарнитуры авторского исполнения при обработке льняного полуфабриката также позволяет достичь удовлетворительного качества бумажных отливок (таблица 3).

Таблица 3

Сравнение значений показателя разрывной длины в зависимости от использования различных видов лубяных волокон

Показатель	Разрывная длина, м	ГОСТ 8273-75
Вид сырья		
Техническая конопля	3136	2200 (для марок Д, Е)
Лен	2433	

В показателях прочности бумажных отливок из технической конопли и льна наблюдается некоторая разница, что связано с разницей в исходной прочности лубяных волокон. Принято считать, что волокна конопли прочнее льняных, хотя и имеют схожую химическую и морфологическую структуру [11].

Необходимо отметить тот факт, что волокнистая масса из лубяных волокон подвергалась размолу без предварительной химической обработки. Высокая исходная прочность волокна и значительное содержание целлюлозы позволяет достичь конкурентно-способных показателей бумажной продукции в условиях отсутствия химической обработки, сохранив при этом экологическую составляющую процесса переработки сельскохозяйственных отходов.

Отходы лубяных культур, которые в настоящее время практически не перерабатываются, имеют большой потенциал. Их природные характеристики, такие как высокая прочность и большое содержание целлюлозы, дают возможность использовать их в качестве альтернативного источника сырья для ЦБП. Для того чтобы сохранить превосходное качество материала, необходимо вести разработку нового размалывающего оборудования и искать пути совершенствования процесса размолы. Именно к решению этих вопросов относится исследование размолы массы высокой концентрации из недревесного сырья в производстве бумажной продукции.

Библиографический список

1. Басова, Н. В. Анализ производства лубяных культур в России за период импортозамещения / Н. В. Басова, Э. В. Новиков // Технические культуры. Научный сельскохозяйственный журнал. – 2023. – Т. 3, № 2(8). – С. 54-63. – DOI 10.54016/SVITOK.2023.67.29.007. – EDN TZKPVN.
2. Богданова О.Ф., Березовский Ю.В. Современные технологии переработки составляющих льна для производства продукции различного назначения // Материалы и технологии. 2018. No2(2). С. 9–13. DOI: 10.24411/2617-149X-2018-12001.
3. ГОСТ 8273-75. Бумага оберточная. Технические условия : межгосударственный стандарт : дата введения 01.01.76. – Изд. официальное. – Москва : ИПК Издательство стандартов , 1975 – 8 с.
4. Новиков, Э. В. Лубяные культуры в России и за рубежом: состояние, проблемы и перспективы их переработки / Э. В. Новиков, Н. В. Басова, А. В. Безбабченко // Технические культуры. Научный сельскохозяйственный журнал. – 2021. – № 1(1). – С. 30-40. – DOI 10.54016/SVITOK.2021.1.1.005. – EDN XYEJW.
5. Патент № 2798559 С1 Российская Федерация, МПК D21D 1/30. Размалывающая гарнитура : № 2022135058 : заявл. 29.12.2022 : опубл. 23.06.2023 / Ю. Д. Алашкевич, В. И. Ковалев, В. А. Кожухов, А. А. Карелина ; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика М.Ф. Решетнёва". – EDN YZPXCZ.
6. Сусоева И.В., Вахнина Т.Н., Свиридов А.В. Химический состав и способ утилизации отходов производства хлопковых и льняных волокон // Химия растительного сырья. 2017. No3. С. 211–220. DOI:10.14258/jcprm.2017031492.
7. Ушаков А.В. Размол волокнистых полуфабрикатов высокой концентрации в целлюлозно-бумажном производстве: дис. ... канд. тех. наук: 05.21.03. – СибГУ им. М.Ф. Решетнева, Красноярск, 2022 – 173 с.
8. Фляте Д.М. Технология бумаги. Учебник для вузов. – М.: Лесн. пром-ть, 1988 – 440 с.
9. Petroudy S.R. Physical and mechanical properties of natural fibers // Advanced High Strength Natural Fibre Compo-sites in Construction. 2017. Pp. 59–83. DOI: 10.1016/B978-0-08-100411-1.00003-0.
10. Sadrmanesh V., Chen Y. Bast fibres: structure, processing, properties, and applications // International Materials Re-views. 2018. Vol. 64. Pp. 381–406. DOI: 10.1080/09506608.2018.1501171.
11. Wiener, J., Kovačič, V., & Dejlová, P. (2003). DIFFERENCES BETWEEN FLAX AND HEMP. *AUTEX Research Journal*, 3, 58 - 63.

УДК 606+630.86

БИОКОНВЕРСИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ СУБСТРАТОВ ГРИБОМ *HERICIUM ERINACEUS*

П. В. Князева, М. А. Смирнов, О. О. Мамаева, Е. В. Исаева, В. С. Федоров
Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика
М. Ф. Решетнева,

Российская Федерация, 660037, г. Красноярск, просп. им. газ. «Красноярский рабочий», 31

Представлены материалы по биоконверсии субстратов на основе одубины хвойных пород грибом *Hericium erinaceus*. Был определён химический состав субстратов до и после биоконверсии.

Ключевые слова: *Hericium erinaceus*, биоконверсия, растительные субстраты, твёрдофазное культивирование, химический состав, одубина лиственницы, одубина сосны.

BIOCONVERSION OF PLANT SUBSTRATES BY THE FUNGUS *HERICIUM ERINACEUS*

P. V. Knyazeva, M. A. Smirnov, O. O. Mamaeva, E. V. Isaeva, V. S. Fedorov
Reshetnev Siberian State University of Science and Technology 31, Krasnoyarsky Rabochy Av.,
Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation

Materials on the bioconversion of substrates based on coniferous wood by the fungus *Hericium erinaceus* are presented. The chemical composition of the substrates before and after bioconversion was determined.

Key words: *Hericium erinaceus*, bioconversion, plant substrates, solid-phase cultivation, chemical composition, larch tan waste, pine tan waste.

Активно развивающаяся лесоперерабатывающая промышленность Красноярского края требует инновационного подхода к использованию растительного сырья.

Общий запас древесины Красноярского края составляет 168,1 млн га. Запасы промышленной древесины составляют 14,4 млрд. м³ (29 % от общероссийского) [1]. Главными лесобразующими породами в Красноярском крае являются ценные хвойные породы, в частности сосна и лиственница.

Общая масса древесины, которая используется в дальнейшем, составляет 75 % от общего объема ее заготовки, на долю коры приходится до 15 % [1].

Кора хвойных пород содержит большое количество экстрактивных веществ (от 14 до 30 %) [2, 3]. Тем самым является источником многих ценных веществ, из которых получают биологически активные, дубильные, красящие и прочие продукты. В качестве экстрагента для извлечения дубящих веществ наиболее перспективно применение щелочных реагентов, в частности моноэтаноламин, который позволяет извлечь из коры до 58 % экстрактивных веществ и флавоноидов [4, 5].

Одубина (твёрдый послеэкстракционный остаток коры) может быть дешевым субстратом для выращивания грибов, так как обладает низким содержанием дубильных веществ, которые могут препятствовать росту растений, микроорганизмов, имеет высокую пористость и сорбционную способность [6, 7]. Также одубина, полученная экстракцией коры 5 %-м раствором моноэтаноламина, обогащена азотом, что может благоприятно повлиять на рост грибов [8].

В настоящее время актуальным способом утилизации растительных отходов является биоконверсия. Перспективным биодеструктором может выступать базидиальный ксилотрофный гриб ежевик гребенчатый (*Hericium erinaceus*), который относится к съедобным и лекарственным грибам. Данный гриб широко применяется в народной медицине стран Дальнего

Востока [9, 10]. У *Hericium erinaceus* обнаружены метаболиты, способные стимулировать образование факторов роста нервов, оказывать цитотоксический эффект на опухолевые клетки, проявлять иммуномодулирующие свойства [11]. Данный гриб вызывает белую гниль древесины, т. е. способен утилизировать лигнин [9, 10]. В связи с этим гриб *Hericium erinaceus* может быть использован в биотехнологии в качестве биодеструктора растительных отходов с последующим получением биологически активных веществ.

Целью работы было изучение химического состава продуктов, полученных в процессе биоконверсии одубины хвойных пород грибом *Hericium erinaceus*.

Объектом исследования являлся гриб *Hericium erinaceus*, который был изолирован в чистую культуру из коммерческого плодового тела, хранится в музейной коллекции культур кафедры химической технологии древесины и биотехнологии Сибирского государственного университета науки и технологий имени академика М. Ф. Решетнева, г. Красноярск.

Одубину получали в результате выделения из коры экстрактивных веществ 5 %-м раствором моноэтаноламина [4].

В качестве субстратов использовали:

- одубину сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) (размер фракций менее 1 мм) – субстрат 1;
- 2. - одубину лиственницы сибирской (*Larix sibirica*) (размер фракций менее 1 мм) – субстрат 2.

Для осуществления процесса биоконверсии растительные субстраты увлажняли водопроводной водой до 70 %, помещали в чашки Петри и стерилизовали 30 мин под давлением $1,01 \cdot 10^5$ Па несколько раз в автоклаве ВК-75. Засев гриба осуществляли блоками диаметром 10 мм, которые были вырезаны микробиологическим пробойником из зоны роста семисуточной культуры *Hericium erinaceus*. Культивирование гриба *Hericium erinaceus* проводили при 25 °С до полного обрастания субстрата.

Химический состав субстратов до и после биоконверсии исследован по методикам, принятым в химии растительного сырья [12, 13]. В образцах определяли влажность методом высушивания, минеральные вещества – сжиганием навески растительного материала с последующим прокаливанием золы в муфельной печи. Экстрактивные вещества выделяли с помощью исчерпывающей экстракции сначала этиловым спиртом, затем водой. Определение легкогидролизуемых полисахаридов проводили путём гидролиза сырья 2 %-й соляной кислотой в течение 3 ч при кипячении, трудногидролизуемых полисахаридов – обработкой остатка 80 %-й серной кислотой при комнатной температуре в течение 2 ч и последующем кипячении в течение 3 ч. Количество моносахаридов определяли эбулиостатическим методом. Лигниновые вещества оценивали по остатку после гидролиза полисахаридов. Убыль массы субстрата после биоконверсии определяли весовым методом по отношению к исходному субстрату до биодеструкции.

В процессе культивирования *Hericium erinaceus* оценивали диаметр, плотность колонии и высоту мицелия [14]. Продолжительность культивирования составила 12 сут.

Установлено, что ростовой коэффициент при культивировании гриба *Hericium erinaceus* на одубине сосны (субстрат 1) составил $60,3 \pm 6,0$, на одубине лиственницы (субстрат 2) – $80,6 \pm 5,7$. Таким образом, можно сделать вывод, что *Hericium erinaceus* относится к колониям базидиальных грибов, растущих со средней скоростью (т. к. ростовой коэффициент находится в диапазоне от 50 до 100) [14]. Следует отметить, что средняя радиальная скорость роста на субстрате 1 составляет $(3,2 \pm 0,3)$ мм/сут; на субстрате 2 – $(3,4 \pm 0,2)$ мм/сут.

Компонентный состав субстратов до и после культивирования представлен в таблице 1.

Для сравнения химического состава биодеструктированного субстрата с исходным производили пересчет полученных данных с учетом коэффициента убыли массы в процессе культивирования гриба *Hericium erinaceus*.

Установлено, что при твердофазной ферментации одубины коры лиственницы и сосны дереворазрушающая активность гриба примерно одинакова. Убыль массы на 12-е сутки после культивирования на одубине сосны обыкновенной составила $(2,28 \pm 0,21)$ %, на одубине лиственницы сибирской – $(2,45 \pm 1,12)$ %.

Таблица 1

Компонентный состав субстратов до и после культивирования *Hericium erinaceus*

Компонент	Содержание, % от абсолютно сухого сырья			
	субстрат 1		субстрат 2	
	исходный	после биоконверсии	исходный [15]	после биоконверсии
Минеральные вещества	1,29 ± 0,07	$\frac{2,48 \pm 0,04}{2,43 \pm 0,04}$	4,02 ± 0,14	$\frac{3,68 \pm 0,43}{3,57 \pm 0,42}$
Вещества, экстрагируемые горячей водой	2,52 ± 0,13	$\frac{5,61 \pm 0,66}{5,5 \pm 0,65}$	4,54 ± 0,27	$\frac{2,76 \pm 0,36}{2,68 \pm 0,35}$
Вещества, экстрагируемые этиловым спиртом	6,35 ± 0,32	$\frac{6,84 \pm 0,81}{6,7 \pm 0,79}$	4,65 ± 0,16	$\frac{6,14 \pm 0,66}{5,96 \pm 0,64}$
Легкогидролизуемые полисахариды	18,10 ± 0,15	$\frac{9,20 \pm 0,46}{9,02 \pm 0,45}$	12,85 ± 0,38	$\frac{7,65 \pm 0,38}{7,42 \pm 0,37}$
Трудногидролизуемые полисахариды	38,99 ± 0,67	$\frac{32,86 \pm 1,64}{32,20 \pm 1,61}$	25,61 ± 0,87	$\frac{27,26 \pm 1,36}{26,44 \pm 1,32}$
Лигниновые вещества	31,98 ± 0,36	$\frac{29,8 \pm 1,49}{29,20 \pm 1,46}$	34,47 ± 0,08	$\frac{37,8 \pm 1,89}{36,67 \pm 1,83}$

Примечание. В числителе данные без учета убыли массы, в знаменателе указаны данные с учетом убыли массы.

Изучение химического состава субстратов до культивирования показало, что в субстрате 1 доля веществ лигноуглеводного комплекса составляет 89 %, в субстрате 2 – 73 %. Содержание полисахаридов в одубине сосны в 1,5 раза выше, чем в одубине лиственницы. На долю экстрактивных веществ приходится до 9 %, причем в одубине лиственницы доля водорастворимых веществ примерно в 2 раза выше. Исходя из полученных результатов можно сделать вывод, что такие субстраты имеют благоприятный химический состав для переработки их с помощью гриба-биодеструктора *Hericium erinaceus*.

Результаты исследования химического состава субстратов после биоконверсии грибом *Hericium erinaceus* показывают изменения в содержании всех компонентов. На одубине коры сосны (субстрат 1) за счет наличия ферментов целлюлотитического комплекса гриб эффективно разрушал полисахаридный комплекс. Общее количество полисахаридов уменьшилось на 28 % по сравнению с исходным субстратом. В процессе культивирования содержание целлюлозы снизилось на 19,5 %, а гемицеллюлоз на 50 %. Биоконверсия субстрата сопровождалась увеличением в 2,2 раза количества водорастворимых веществ, что может быть связано с разрушением легкодоступных полисахаридов до моно- и олигосахаридов, которые переходят в группу веществ, экстрагируемых водой [16]. На субстрате 1 отмечена также лигнолитическая активность ежевика гребенчатого, поскольку в процессе биодеструкции субстрата содержание лигнина снизилось на 9 %.

На одубине лиственницы (субстрат 2) ежевик развивался в основном за счет утилизации легкогидролизуемых полисахаридов, к числу которых относятся гемицеллюлозы, пектиновые вещества и другие углеводы [17], а также водозэкстрактивных веществ. Установлено, что в процессе культивирования содержание водорастворимых компонентов снизилось на 41 %. В процессе биодеструкции сумма полисахаридов уменьшилась на 12 % в большей степени за счет ферментолита легкогидролизуемых полисахаридов. Степень их конверсии составила 42 % по отношению к исходным субстрату. На одубине лиственницы лигнолитической активности гриб не проявлял, что привело к незначительному увеличению лигниновых веществ.

Таким образом, проведенное исследование показало, что в процессе биоконверсии субстратов на основе твердого остатка коры после выделения экстрактивных веществ 5 %-м раствором моноэтаноламина гриб *Hericium erinaceus* утилизирует в основном полисахариды (субстрат 2 – 12 % и субстрат 1 – 28 %).

Хотелось бы отметить, что на характер и степень деструкции влияет породный состав, так на одубине лиственницы происходит наиболее полная утилизация экстрактивных веществ (до 6 %, за счет водоэкстрактивной части), а на одубине сосны – лигноулеводного комплекса (до 21 %, за счет легкогидролизуемых полисахаридов). В связи с этим данные растительные отходы могут быть использованы для биоконверсии грибом *Hericium erinaceus* с последующим получением биологически активных веществ.

Библиографический список

1. Морозов В.И., Петрушева Н.А. Использование потенциальных ресурсов древесной зелени хвойных пород лесов Красноярского края // Тенденции развития науки и образования. 2019. Вып. 50(2). С. 38–41.
2. Фёдоров В.С., Рязанова Т.В., Ерёмченко О.Н. Переработка коры хвойных с получением дубильных экстрактов // Кожа и мех в XXI веке: технология, качество, экология, образование: материалы XVII Междунар.науч.-практ. конф. (11-13 декабря 2021, Улан-Удэ) / Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления. Улан-Удэ, 2022. С. 27-34.
3. Fedorov V.S., Ryazanova T.V. Bark of Siberian Conifers: Composition, Use, and Processing to Extract Tannin. Forests, 2021. 12. С. 1043. <https://doi.org/10.3390/f12081043>.
4. Ябров В.И., Рязанова Т.В. Экстракция коры лиственницы моноэтаноламином // Молодые ученые в решении актуальных проблем науки: сб. статей Всерос. науч.-практ. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых (19 мая 2017, г. Красноярск) / Сиб. гос. ун-т науки и техн. им. академ. М. Ф. Решетнева. Красноярск, 2017. С. 207-209.
5. Пермьякова Г.В., Лоскутов С.Р., Семенович А.В. Экстракция коры хвойных водой с добавлением моноэтаноламина. Химия растительного сырья, 2008. № 1. С. 37-40.
6. Яковлева О. Е. Биодеструкция одубины хвойных пород грибами классов базидиомицетов и аскомицетов // Молодые ученые в решении актуальных проблем науки: сб. статей Всерос. науч.-практ. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых (19-20 мая 2016, г. Красноярск) / Сиб. гос. ун-т науки и техн. им. академ. М. Ф. Решетнева. Красноярск, 2016. С. 40-41.
7. Махова Е.Г., Рязанова Т.В., Чупрова Н.А. Биодеструкция лиственничной одубины грибами *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma koningi* // Химия растительного сырья. 2001. №4. С. 69-72.
8. Федоров В. С., Рязанова Т.В., Мамаева О. О. и др. Влияние предварительной обработки на компонентный состав коры хвойных пород // Актуальные вопросы химической технологии и защиты окружающей среды : сб. материалов IX Всерос. конф., посвященной 55-летию Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова (01-02 декабря 2022, г. Чебоксары) Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова. Чебоксары, 2022. С. 34-35.
9. Широких А.А., Злобина Ю.А., Широких И.Г. Биодegradация растительных отходов и получение плодовых тел при культивировании ежевика гребенчатого (*Hericium erinaceus*) // Теоретическая и прикладная экология. 2018. Т. №3. С. 86-92.
10. Гольшкин А. В., Альмяшева Н. Р., Краснопольская Л. М. Компонентный состав базидиом ежевика гребенчатого и их антиоксидантные свойства в зависимости от предобработки опилок сосны и бука // Лесоведение. 2021. Т. № 2. С. 7-11.
11. Автономова А.В., Баканов А.В., Шуктуева М.И. и др. Погруженное культивирование и химический состав мицелия *Hericium Erinaceus*// Антибиотики и химиотерапия. 2012. Т. № 57. С. 187-194.
12. Рязанова Т.В., Чупрова Н.А., Исаева Е.В. Химия древесины. Часть 1. Строение и свойства древесины. Экстрактивные вещества: учебное пособие. СибГТУ. Красноярск, 2011. 160 с
13. Рязанова, Т.В. Чупрова Н.А., Исаева Е.В. Химия древесины. Часть 2. Основные компоненты древесины: учебное пособие для студентов вузов. СибГТУ. Красноярск, 2011. 229 с.
14. Литовка, Ю. А., Громовых Т. И. Биоконверсия растительного сырья: лабораторный практикум / Красноярск: СибГТУ, 2005. 100 с.
15. Федоров В. С., Рязанова Т. В., Мамаева О. О. и др. Комплексная переработка коры лиственницы сибирской с использованием моноэтаноламина. Сообщение 1. Получение и использование дубильного экстракта // Хвойные бореальной зоны. 2024. Т. XLII, № 2. С. 80–87.
16. Лунева Т.А., Ким Н. Ю., Рязанова Т.В. и др. Влияние грибов рода *Trichoderma* на углеводный комплекс коры лиственницы сибирской // Известие высших учебных заведений. Серия Химия и Химическая технология. 2006. № 49. С. 88–90.
17. Исаева Е.В., Еременко О.Н., Почекутов И. С. Химия растительного сырья: учеб. пособие. – Красноярск : СибГУ им. М.Ф. Решетнева., 2018. – 90 с.

УДК 581.6

ОЦЕНКА ПОВЕРХНОСТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ САПОНИНСОДЕРЖАЩИХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ

И. А. Коновалова, Е. С. Запольских

Вятский государственный университет, г. Киров, Россия

В настоящее время актуальной задачей при разработке натуральных косметических составов является поиск природных поверхностно-активных веществ. Особый интерес среди них представляют растительные сапонины, способные образовывать мицеллы в водных растворах, проявляя очищающие и эмульгирующие свойства. Сапонинсодержащие экстракты получены из листьев *Agave americana* L., *Hedera helix* L. и *Yucca gloriosa* L., корневища *Ruscus aculeatus* L. и семян *Aesculus hippocastanum* L. С применением современных, в том числе зарубежных, методов и технологий выявлена химическая природа сапонинов в растительных экстрактах, вычислены пенное число и индекс пенообразования экстрактов, а также их поверхностное натяжение. В качестве контрольного образца применяли мыльный раствор нейтрального брускового мыла. В экстрактах *A. americana*, *Y. gloriosa* и *R. aculeatus* обнаружены стероидные гликозиды, в *H. helix* и *A. hippocastanum* – тритерпеновые. Большинство растительных экстрактов и мыльный раствор имеют среднее пенное число, экстракт листьев *A. americana* – низкое. Наиболее высокие значения индекса пенообразования отмечены у 0,1 %-го водного экстракта листьев *H. helix* (1428) и у 0,2 %-го экстракта семян *A. hippocastanum* (1250). Значения поверхностного натяжения этих экстрактов составили 61,0 мНм⁻¹ (экстракт семян *A. hippocastanum*) и 49,4 мНм⁻¹ (экстракт листьев *H. helix*), мыльного раствора – 34,2 мНм⁻¹. Среди исследуемых сапонинсодержащих экстрактов, экстракт листьев *H. helix* отличается наиболее высокой пенообразующей активностью и способен снизить поверхностное натяжение раствора до 49,4 мНм⁻¹. Данный экстракт рекомендуем для разработки эмульсионных косметических продуктов.

Ключевые слова: растительные экстракты, тритерпеновые и стероидные сапонины, пенное число, индекс пенообразования, поверхностное натяжение.

EVALUATION OF SURFACE ACTIVITY OF SOME SAPONIN-CONTAINING PLANT EXTRACTS

I. A. Konovalova, E. S. Zapolskikh

Vyatka State University, Kirov, Russia

At present, an urgent task in the development of natural cosmetic compositions is the search for natural surfactants. Of particular interest among them are plant saponins capable of forming micelles in aqueous solutions, showing cleansing and emulsifying properties. Saponin-containing extracts were obtained from the leaves of *Agave americana* L., *Hedera helix* L. and *Yucca gloriosa* L., rhizome of *Ruscus aculeatus* L. and seeds of *Aesculus hippocastanum* L. Using modern, including foreign, methods and technologies, the chemical nature of saponins in plant extracts was revealed, the foam number and foam index of extracts, as well as their surface tension were calculated. A soap solution of neutral bar soap served as a control sample. Steroidal glycosides were found in the extracts of *A. americana*, *Y. gloriosa* and *R. aculeatus*, while triterpene glycosides were found in *H. helix* and *A. hippocastanum*. Most of the plant extracts and soap solution have medium foaming index, *A. americana* leaf extract - low. The highest values of foaming index were observed for 0,1 % aqueous extract of *H. helix* leaves (1428) and 0,2 % extract of *A. hippocastanum* seeds (1250). The surface tension values of these extracts were 61,0 мНм⁻¹ (*A. hippocastanum* seed extract) and 49,4 мНм⁻¹ (*H. helix* leaf extract), while those of the soap solution were 34,2 мНм⁻¹. Among the studied plant extracts, *H. helix* leaf extract is characterized by the highest foaming activity and is able to reduce the surface tension of the solution up to 49,4 мНм⁻¹. This extract is recommended for the development of emulsion cosmetic products.

Keywords: plant extracts, triterpene and steroidal saponins, foam number, foam index, surface tension.

Одним из перспективных направлений при разработке натуральных косметических средств является поиск природных источников поверхностно-активных соединений. Особый интерес среди них представляют сапонины – природные гликозиды, широко распространенные среди вторичных метаболитов растений. Строение молекул сапонинов, состоящих из неполярных агликонов, соединенных одной или несколькими моносахаридными группами, определяет их пенообразующие и эмульгирующие свойства [5]. Эти особенности позволяют рассматривать сапонины как потенциальные компоненты рецептур косметических продуктов. Цель настоящего исследования – оценить пенообразующую способность и поверхностное натяжение ряда растительных экстрактов, содержащих сапонины.

Материалом для исследования служили отдельные виды растений, культивируемые в оранжерее (*Agave americana* L., *Hedera helix* L., *Yucca gloriosa* L., *Ruscus aculeatus* L.) и открытом грунте (*Aesculus hippocastanum* L.) ботанического сада ВятГУ. Для получения экстрактов использовали свежее растительное сырье: листья (*A. americana*, *H. helix* и *Y. gloriosa*), части корневища (*R. aculeatus*) и семена (*A. hippocastanum*). Наличие сапонинов в сырье устанавливали методами фармакогностического анализа с помощью качественных реакций. Для этого готовили водные и водно-спиртовые растительные экстракты, проводили пробу на пенообразование, реакцию с ацетатом свинца, пробу Лафона, реакцию с концентрированной серной кислотой, реакцию Сальковского. Химическую природу сапонинов устанавливали с помощью реакции Фонтан-Кендала. По традиционной методике [1] определяли пенное число – наименьшую концентрацию сапонинов, вызывающую образование стойкой пены в течение 1 мин.

Согласно технологии, описанной бразильскими учеными [4], у исследуемых растительных экстрактов вычисляли индекс пенообразования (FI) – показатель без какой-либо единицы измерения, представляющий максимальное разведение, при котором данная масса растения способна образовывать 1-сантиметровый столб пены при определенных условиях. Для этого готовили водные экстракты разной концентрации: к навеске растительного сырья от 0,2 до 2 г (с интервалом 0,2 г) прибавляли по 200 мл воды. Полученные образцы кипятили в течение 5 мин. После охлаждения экстракт каждой концентрации фильтровали, распределяли по пробиркам от 1 мл до 9 мл и доводили конечный объем до 10 мл дистиллированной водой. В последнюю пробирку отмеряли 10 мл неразбавленного экстракта. Измеряли pH каждого раствора и, при необходимости, корректировали до 7,0 карбонатом кальция. Каждую пробирку встряхивали в течение 15 секунд, затем через 15 мин измеряли высоту стойкого столба пены (в см) в каждой пробирке. В качестве стандартного образца из нейтрального брускового мыла готовили мыльные растворы этих же концентраций. Индекс пенообразования (FI) рассчитывали по формуле (1):

$$FI = \frac{10}{[(M \cdot Ddv)/200]}, \quad (1)$$

где M (г) – масса растительного сырья, Ddv (мл) – объем разведенного экстракта, используемый в каждой пробирке, 10 и 200 – общий объем в пробирке и объем, используемый для приготовления экстракта соответственно. С помощью метода взвешивания капель определяли статическое поверхностное натяжение (γ) растительных экстрактов. Из бюретки мы набирали по 20 капель (1 мл) каждого разведенного экстракта в трех экземплярах и измеряли среднее значение массы и объема капли. Поверхностное натяжение рассчитывали по закону Тейта [3] (2):

$$\gamma = \frac{(m \cdot g)}{[2 \cdot \pi \cdot r \cdot \Psi(r/V^{1/3})]}, \quad (2)$$

где γ – поверхностное натяжение (mNm^{-1}), m – средняя масса каждой капли (г), g – ускорение силы тяжести (980 см с^{-2}), r – радиус кончика бюретки (0,175 см), $\Psi(r/V^{1/3})$ – поправочный коэффициент.

С целью получения фактического значения поверхностного натяжения вводили поправочный коэффициент к оставшейся доле жидкости на кончике бюретки, вычисляемый по формуле (3):

$$\Psi \cdot (r/V^{1/3}) = 1.000 - 0.9121 \cdot (r/V^{1/3}) - 2.109 \cdot (r/V^{1/3})^2 + 13.38 \cdot (r/V^{1/3})^3 - 27.29 \cdot (r/V^{1/3})^4 + 27.53 \cdot (r/V^{1/3})^5 - 13.58 \cdot (r/V^{1/3})^6 + 2.593 \cdot (r/V^{1/3})^7, \quad (3)$$

где V – средний объем каждой капли (см^3).

Полученные данные сравнивали с контрольным образцом – мыльным раствором нейтрального брусочного мыла той же концентрации, что и растительные экстракты.

В результате проведенных исследований определена химическая природа сапонинов в растительном сырье: в листьях *A. americana*, *Y. gloriosa* и корневище *R. aculeatus* обнаружены стероидные гликозиды, в листьях *H. helix* и семенах *A. hippocastanum* – тритерпеновые. Исследуемые водные извлечения имеют среднее пенное число (у экстракта корневища *R. aculeatus* и мыльного раствора – 4000, у экстрактов листьев *H. helix* и семян *A. hippocastanum* – 5000, у экстракта листьев *Y. gloriosa* – 2000), кроме экстракта листьев *A. americana*, рассчитанное пенное число (1000) которого считается низким.

Индекс пенообразования вычислен у исследуемых растительных экстрактов и мыльного раствора, выступающего в качестве стандартного образца (табл.). Среди исследуемых растительных экстрактов наименьший индекс пенообразования (FI = 125) отмечен у корневища *R. aculeatus* в концентрации экстракта 0,8 % без разведения. Максимальная высота столба пены, который образовался при встряхивании этого экстракта, составила 1,3 см при концентрации раствора 1 %. Водный экстракт листьев *A. americana* также имеет невысокий относительно других экстрактов индекс пенообразования (FI = 200) в концентрации экстракта 0,5 % без разведения. Максимальная высота столба пены экстракта листьев *A. americana* составила 2,6 см при концентрации раствора 1 %, что в два раза больше, чем у водного экстракта корневища *R. aculeatus*. В 0,2 %-ной концентрации водных экстрактов листьев *Y. gloriosa* и семян *A. hippocastanum* отмечен индекс пенообразования, который составил 833 и 1250 соответственно (табл. 1). Несмотря на то, что навеска сырья в обоих случаях составила 0,4 г, разведение в пробирках исследуемых экстрактах различалось. Так, для образования 1-сантиметрового столба пены необходимо было разбавить 4 мл 2-го % водного экстракта *A. hippocastanum* до 10 мл дистиллированной водой, в то время как водного экстракта листьев *Y. gloriosa* – 6 мл. Максимальная высота столба пены, который образовался при встряхивании водного экстракта листьев *Y. gloriosa*, составила 2,0 см при концентрации раствора 1 %. У водного экстракта семян *A. hippocastanum* этот показатель составил 2,4 см.

Таблица 1.

Индекс пенообразования (FI) водных растительных экстрактов

Параметры	Экстракт листьев <i>Agave americana</i>	Экстракт листьев <i>Yucca gloriosa</i>	Экстракт корневища <i>Ruscus aculeatus</i>	Экстракт листьев <i>Hedera helix</i>	Экстракт семян <i>Aesculus hippocastanum</i>
Концентрация экстракта, %	0,5	0,2	0,8	0,1	0,2
FI	200	833	125	1428	1250

Среди исследуемых растительных экстрактов наибольший индекс пенообразования отмечен у 0,1 %-го водного экстракта листьев *H. helix*, который составил 1428. При этом потребовалось развести 7 мл 0,1 %-го водного экстракта листьев *H. helix* до 10 мл дистиллированной водой. Навеска сырья в данном случае составила 0,2 г. Максимальная высота столба водного экстракта листьев *H. helix* при этом составила 2,6 см в концентрации 1 %.

Мыльный раствор, как контрольный образец, даже при концентрации 0,1 % образовывал столб пены высотой 3,2 см, что превышало значения исследуемых растительных экстрактов. Максимальная высота столба пены (13,6 см) отмечена у 2 %-го мыльного раствора. Таким образом, у водных экстрактов листьев *H. helix* и семян *A. hippocastanum* высота столба пены в 1 см была отмечена при меньших концентрациях растворов относительно других растительных экстрактов. Полученные результаты и поведение растительных экстрактов на границе фаз, вероятно, связаны со структурой агликона и сахарных цепей [4]. Известно, что тритерпеноидные сапонины, обнаруженные в экстрактах *H. helix* и *A. hippocastanum*, связаны с более высокими вязкоупругими межфазными слоями, и это приводит к высокой пенообразующей способности и стабильности пены по сравнению со стероидными сапонидами [2].

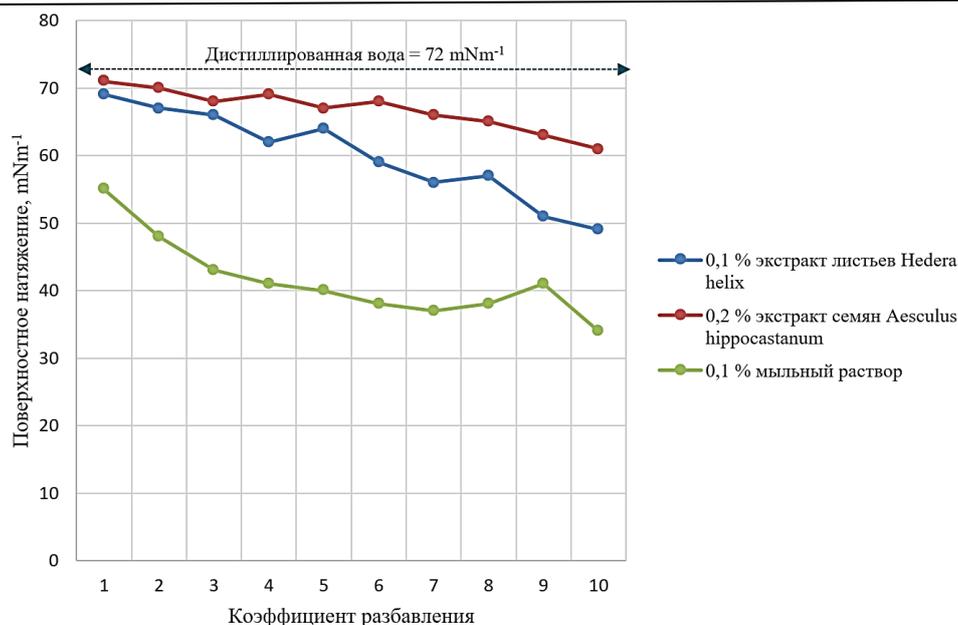


Рис. 1. Кривые регрессии поверхностного натяжения (mNm⁻¹) экстрактов листьев *H. helix* и семян *A. hippocastanum*, и нейтрального брускового мыла

На основе полученных данных поверхностное натяжение (γ) вычисляли только для водных экстрактов листьев *H. helix* и семян *A. hippocastanum*, а также нейтрального брускового мыла. Известно, что вещество с высокой поверхностной активностью способно снизить поверхностное натяжение воды с 72 до 35 mNm⁻¹ [4]. Результаты анализа данных показали, что 0,1 %-ный растительный экстракт листьев *H. helix* способен снизить поверхностное натяжение раствора до 49,4 mNm⁻¹, в отличие от 0,2 %-ного экстракта семян *A. hippocastanum*, поверхностная активность которого без разбавления раствора составила 61,0 mNm⁻¹ (рис. 1). Значение поверхностного натяжения мыльного раствора при этом составило 34,2 mNm⁻¹. Таким образом, среди исследуемых сапонинсодержащих растительных экстрактов, экстракт листьев *H. helix* обладает высокой пенообразующей активностью и способен снизить поверхностное натяжение раствора до 49,4 mNm⁻¹. Предполагаем, что данный экстракт имеет высокий потенциал в разработке эмульсионных косметических продуктов.

Благодарности. Исследование выполнено в рамках проекта «Трансформация образовательного курса «Технологии переработки растительного сырья» программы магистратуры 06.04.01 Биология. Разработка фитокосметических средств», реализуемого победителем грантового конкурса для преподавателей 2023/2024 Стипендиальной программы Владимира Потанина.

Библиографический список

1. Коренская И. М., Ивановская Н. П. и др. Фитохимический анализ и стандартизация лекарственного растительного сырья: учебно-методическое пособие. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2017. 78 с.
2. Böttcher S., Drusch S. Saponins – self-assembly and behavior at aqueous interfaces // Adv. Colloid Interf. Sci. 2017. Vol. 243. P. 105–113.
3. Lee B.-B., Ravindra P., Chan E.-S. A critical review: surface and interfacial tension measurement by the drop weight method // Chem. Eng. Commun. 2008. Vol. 195. P. 889–924.
4. Müller L. E., Schiedeck G. Physical properties of botanical surfactants // Science of the Total Environment. 2018. V. 610–611. P. 1133–1137.
5. Piyasena K. G. N. P., Qader M. M. Saponins // Chemistry of natural products. Phytochemistry and Pharmacognosy of Medicinal Plants / Edited by Mayuri Napagoda and Lalith Jayasinghe. Berlin, Boston, 2022. P. 115–136.

УДК 674.815

КОНСТРУКЦИОННО-ОТДЕЛОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОТХОДОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

В.В. Коньшин¹, А.Н. Афаньков¹, Е.Н. Гущина¹, И.А. Серских¹, М.В. Ефанов²

¹Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, Барнаул, Россия

²ООО «МИП «Югра-Биотехнологии»» Ханты-Мансийск, Россия

В статье рассмотрена возможность изготовления конструкционно-отделочных материалов на основе экструдированных отходов растительного происхождения. Приведены результаты исследования зависимости свойств конструкционно-отделочных материалов из отходов сельского хозяйства от концентрации раствора NaOH, используемого для обработки связующего. Показано, что в качестве связующего целесообразно использовать лузгу подсолнечника и солому пшеницы. На основании проведенных исследований установлено, что получаемые изделия по прочностным и гидрофобным характеристикам могут быть использованы в качестве конструкционных материалов в сухих внутренних помещениях.

Ключевые слова: конструкционно-отделочные материалы, экструзионная технология, водопоглощение, предел прочности, отходы растительного происхождения.

В последние десятилетия достаточное широкое распространение в строительной промышленности, мебельном производстве получили такие плитные материалы, как ДСП, ДВП, OSB, MDF. Все эти листовые материалы являются композиционными и для их производства используются схожие технологии. В качестве наполнителей используются различные материалы растительного происхождения (стружка, щепа, опилки, древесные волокна и т.д.). Связующим при производстве плитных материалов является, как правило, синтетические клеи и смолы типа фенол-формальдегидных или мочевино-формальдегидных смол [1]. Ввиду опасности компонентов синтетических смол для здоровья (формальдегид, фенол и их производные), применение данных материалов определенного класса эмиссии имеет ограниченный спектр. Наряду с этим использование для производства плитных материалов цельной древесины (пусть и не качественной) наносит определённый экологический ущерб лесному хозяйству страны.

Решением данной проблемы является разработка безотходной ресурсосберегающей технологии производства конструкционных материалов на основе отходов растительного происхождения без использования синтетических связующих. Замена синтетических смол возможна при использовании экструзионной технологии обработки растительного сырья. При экструдировании растительный комплекс претерпевает ряд физико-химических превращений и преобразований, в результате которых образовавшаяся биомасса способна сама себя склеивать и образовывать достаточно прочные композиции.

В качестве отходов могут быть использованы не только продукты деревообработки (щепа, опилки, сучья, стружка и т.д.), но и побочные продукты сельского хозяйства (солома злаковых, лузга овса, подсолнечника, гречихи и т.д.). Отходы растительного происхождения относятся к 5 классу опасности, не представляют вреда для здоровья человека или окружающей среды и могут быть при правильном подходе переработаны вторично. По разным источникам, общее количество отходов растительного происхождения (включая отходы лесо- и деревообработки и растениеводства) достигает в России порядка 930 млн. т. Из них на долю растениеводства приходится порядка 210-230 млн. т. В растениеводческих отраслях агропромышленного комплекса ежегодно образуется 150 тыс. т соломы; 3 тыс. т лузги риса, проса, гречихи, подсолнечника; 1 тыс. т стержней початков кукурузы; 100 тыс. т костры льна; 750 тыс. т семян рапса и других масличных культур; 350 тыс. т отходов сорго (сок, стебельная масса) [2].

Использование отходов растениеводства в производстве строительных материалов получило название «экотехнология». Одним из вариантов экотехнологичного производства является изготовление строительных блоков из соломы пшеницы, ржи, льна, сена, камыша. С

другой стороны, отходы сельского хозяйства могут быть использованы для производства конструкционно-отделочных материалов.

В качестве связующего использовались опилки сосны и берёзы, а также отходы сельского хозяйства – солома пшеницы, лузга гречихи и подсолнечника. Предварительно растительное сырьё обрабатывали раствором NaOH концентрацией 5-20 %. Замачивание проводили в течение 24 часов. Обработка щелочью способствует не только активации основных компонентов растительного сырья, но и облегчает движение растительной массы внутри экструдера. В дальнейшем полученная масса прогонялась через одношнековый экструдер ES-110. Продолжительность обработки – 30-90 сек., температура рабочей зоны экструдера 140-160 °С.

Полученную после обработки массу высушивали, изготовление плитных материалов осуществляли методом горячего прессования: температура пресс-формы: 140-150 °С, продолжительность прессования – 1 мин/мм плиты. Для полученных плитных материалов (размером 150×50×5 мм) по стандартным методикам определяли предел прочности при статистическом изгибе, а также водопоглощение и разбухание по толщине в течение 24 часов [3,4]. В табл. 1 приведены результаты испытаний плитных материалов, полученных экструзионным способом без добавки щелочи.

Таблица 1

Физико-механические характеристики плитных композиционных материалов из отходов растительного происхождения

Материал плиты	Плотность, кг/м ³	Максимум напряжения при изгибе (МПа)	Водопоглощение, %	Разбухание, %
сосна	830 ± 40	38±2	74 ± 1	14,6 ± 0,8
берёза	1000 ± 50	26±1	181 ± 4	40,8 ± 0,9
солома	800 ± 40	31±2	75 ± 2	10,6 ± 0,5
лузга гречихи	750± 50	22±2	не выдержал испытаний	
лузга подсолнечника	780± 50	27±3	30±3	15,1± 0,5

Экспериментальные данные позволяют сделать вывод о том, что полученные плитные материалы можно классифицировать как плиты высокой плотности, которые по прочностным характеристикам (22-38 МПа) сопоставимы с традиционными плитными материалами, для которых предел прочности составляет 14-47 МПа. Низкие гидрофобные характеристики (вдопоглощение 74-181 %, набухание 10,6-40,8 %) позволяют отнести получаемые плитные материалы к материалам, эксплуатация которых возможна, в помещениях с сухими условиями. Повышенное водопоглощение и разбухание могут быть обусловлены не только особенностями морфологической структуры используемого материала, но также и частично незавершенностью процессов деструкции основных компонентов растительного комплекса.

Экспериментальные данные по получению конструкционных материалов из отходов сельского хозяйства в присутствии NaOH представлены в табл. 2.

Результаты испытаний свидетельствуют о том, что замачивание связующего раствором NaOH с последующей экструзионной обработкой позволяет несколько повысить прочность изготавливаемых плитных материалов. Во всех опытах с увеличением концентрации щелочи предел прочности возрастает. Следует отметить, что плитные материалы, изготовленные с использованием в качестве связующего лузги гречихи, не обладают удовлетворительными гидрофобными свойствами: при выдерживании в течение 24 часов они или рассыпались, или имели неудовлетворительные гидрофобные свойства.

Таблица 2

Характеристики конструкционно-отделочных материалов в зависимости от концентрации NaOH

Связующее	Концентрация раствора NaOH, %	Предел прочности, МПа	Водопоглощение, %
Лузга гречихи	5	22±2	не выдержал испытаний
	10	24±2	не выдержал испытаний
	15	25±2	60±5
	20	25±2	62±5
Лузга подсолнечника	5	28±4	30±3
	10	30±3	25±2
	15	31±3	24±2
	20	32±3	24±2
Солома пшеницы	5	32±3	30±2
	10	35±3	24±2
	15	36±3	20±2
	20	36±3	20±2

Наиболее удовлетворительные результаты показали материалы, в которых в качестве связующего использованы лузга подсолнечника и солома пшеницы. Имея неплохую прочность (до 36 МПа), данные изделия характеризуются удовлетворительными гидрофобными свойствами (водопоглощение варьируется в пределах 20-30 %). Вероятно, в данном случае с увеличением концентрации NaOH интенсифицируются процессы гидролитической деструкции легкогидролизуемых полисахаридов растительного комплекса. Образовавшиеся в результате гидролитической деструкции углеводов продукты связующего при горячем прессовании активно вступают в реакции поликонденсации с лигнином, повышая гидрофобные и прочностные характеристики получаемых материалов.

Таким образом, полученные значения прочностных характеристик данных плитных материалов позволяют сделать вывод о возможности их использования в качестве конструкционно-отделочных материалов, для внутренней отделки помещений.

Библиографический список

1. Васильев В.В. Актуальные технологические проблемы производства синтетических смол и древесных плит // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. 2020. Вып. 230. С. 173–186.
2. Кожевников Ю.А. Разработка и исследование установки приготовления композитного котельного биотоплива из отходов сельского хозяйства/ Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук. Москва// 2014. – с. 183.
3. ГОСТ 10635-88. Плиты древесностружечные. Методы определения предела прочности и модуля упругости при изгибе. – Москва: Изд-во стандартов, 1988. – с. 6.
4. ГОСТ 10634-88. Плиты древесно-стружечные. Методы определения физических свойств Москва: Издательство стандартов, 1988. - с. 7.

УДК 677.014.82

ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ИЗ ВОЗОБНОВЛЯЕМОГО И ПРОМЫШЛЕННОГО СЫРЬЯ

Н.Е. Котельникова

Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

В данной статье подводится итог планомерной работы, проводимой в Институте высокомолекулярных соединений РАН (ИВС РАН), по исследованию гидрогелей, выделенных из целлюлозосодержащего сырья растительного и промышленного происхождения с помощью каскадного синтеза. Обсуждаются методы получения гидрогелей и их физико-химические и механические свойства. Проведено сравнение свойств гидрогелей, выделенных из растительного сырья и бумажных отходов, и оценены перспективы их использования

Ключевые слова: гидрогели; целлюлоза; каскадный синтез; физико-химические и механические свойства

CELLULOSE-BASED HYDROGELS FROM RENEWABLE AND INDUSTRIAL RAW MATERIALS

N.E. Kotelnikova

Institute of Macromolecular Compounds, RAS, St. Petersburg, Russia

This article summarises the systematic work carried out at the Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences (IMC RAS) to study hydrogels isolated from cellulose-containing raw materials of plant and industrial origin by means of cascade synthesis. The methods of obtaining hydrogels and their physicochemical and mechanical properties were discussed. The properties of hydrogels isolated from plant raw materials and paper wastes were compared and the prospects of their use were evaluated

Keywords: hydrogels; cellulose; cascade synthesis; physicochemical and mechanical properties

Биомедицинское направление применения целлюлозных материалов, обладающих перспективными функциональными свойствами, к числу которых относятся гидрогели на основе целлюлозы и ее производных, активно развивается. Регенерированные в виде гидрогелей образцы на основе целлюлозы, как правило, биodeградируемы, нетоксичны, биологически совместимы с организмом человека. Они могут быть использованы в медицине и фармакологии, в том числе, для получения новых фармацевтических препаратов с таргетной доставкой в организм человека. Области применения гидрогелей не ограничиваются медициной и фармацевтикой, они применимы также при защите окружающей среды и в качестве эффективных компонентов гибридных композиционных материалов. Наиболее прогрессивные области применения представлены на рис. 1 [1].

Гидрогели на основе целлюлозы получают путем физического сшивания молекул природной целлюлозы или путем химического/физического сшивания производных целлюлозы в одной или нескольких технологических операциях [2]. Они являются трехмерными (3D структура) материалами, обладающими способностью к супернабуханию и имеют высокую механическую и пространственную стабильность в набухом состоянии [2], которая поддерживается образовавшейся системой физических (физическое гелирование) или химических (химическое гелирование) сшивков.

В Институте высокомолекулярных соединений РАН (ИВС РАН, Санкт-Петербург, Россия) проведены детальные исследования, отраженные в многочисленных публикациях, прямого растворения целлюлозных образцов в растворяющих системах и формирования гидрогелей при регенерации из растворов с помощью методов drop-let, осаждения, кастинга и других [3, 4].

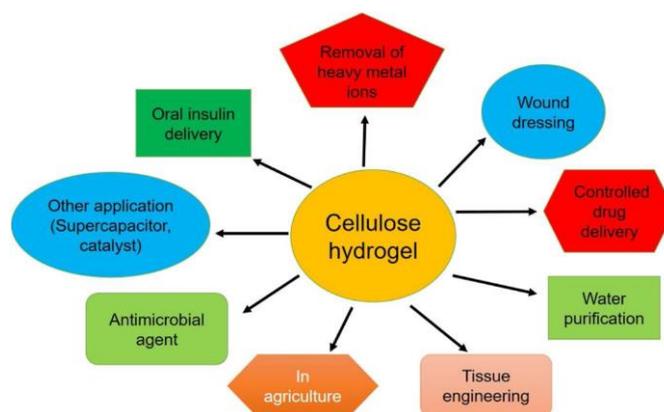


Рис. 1. Основные области применения гидрогелей целлюлозы [1]

В качестве источников для получения гидрогелей используют, в основном, возобновляемые лигноцеллюлозные материалы растительного происхождения. В ИВС РАН мы впервые использовали в качестве исходных материалов отходы бумажного производства в виде макулатуры бумаги и картона. Цель данной работы – провести сравнение физико-химических свойств гидрогелей, полученных из растительного сырья и бумажных отходов.

Экспериментальная часть

Получение гидрогелей

Получение гидрогелей целлюлозы имеет особенности по сравнению с получением гидрогелей других полимеров, поскольку природная целлюлоза имеет низкую растворимость в большинстве растворителей ввиду стабильной системы водородных связей между гидроксильными группами в целлюлозных цепях и сил Ван-дер-Ваальса. Поэтому большинство гидрогелей целлюлозы были получены при использовании производных целлюлозы после их сшивания различными кросс-агентами. В наших исследованиях использованы немодифицированные целлюлозные образцы из целлюлозосодержащего растительного сырья, что позволило существенно сократить экономическую составляющую (затраты на энергию и реагенты) получения гидрогелей. Альтернативные источники, такие как отходы бумагоделательного производства, которые также являются целлюлозосодержащим сырьем, в последние годы находят применение для получения порошковых целлюлоз, например, наночистот, нанокристаллической и микрокристаллической целлюлоз [5]. В ИВС РАН впервые использовали эти отходы для получения гидрогелей целлюлозы, что также является экономически выгодным, поскольку способствует решению проблем утилизации бумажных отходов и важным с точки зрения охраны окружающей среды.

Нами впервые была разработана методология *каскадного синтеза* гидрогелей на основе одного исходного продукта, который последовательно используется в нескольких циклах [6]. Приготовление гелей представляет собой многостадийный циклический процесс, при этом, ввиду различия свойств порошковых целлюлоз, из которых синтезированы гидрогели, каждая стадия требует соответствующей методики. В нашем случае *каскадный синтез* состоит из 3 основных циклов: «растворение – регенерация - самоорганизация».

Растворение порошковых целлюлоз (ПЦ) в растворяющей системе ДМАА/LiCl

В качестве исходных продуктов применяли порошковые растительные целлюлозы (ПЦ) природного происхождения. В качестве прекурсоров ПЦ использовали отходы коротковолокнистого льна, сульфитную листовенную лигноцеллюлозу, сульфатную хвойную лигноцеллюлозу. В большинстве случаев для растворения целлюлозосодержащих образцов необходима предварительная обработка, которую проводили в несколько этапов. ПЦ были получены в лабораторном масштабе путем гидролиза образцов лигноцеллюлоз в растворе HNO_3 (концентрация 10,0 масс. %). Подробный метод синтеза гидрогелей с использованием ПЦ описан в работе [3]. В качестве образцов макулатуры применяли образцы бытового использования из газетной бумаги и картона с черно-белой и цветной печатью. В качестве растворяющей системы использовали раствор ДМАА/LiCl, концентрация LiCl в котором составляла 9,0 масс.% [3].

Исследование физико-химических свойств гидрогелей описано в работе [3]. Деформационно-прочностные характеристики (модуль упругости) образцов гидрогелей определяли по методу, описанному в публикации [7], в режимах однократного и циклического сжатия на установке для механических испытаний UTS 10.

Результаты и обсуждение

Растворимость порошковых образцов и макулатуры и каскадный поэтапный синтез гидрогелей

Исследуемые образцы существенно различаются по растворимости в системе ДМАА/LiCl. Оптимальная растворимость и средневязкостная степень полимеризации ($СП_v$) образцов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Параметры растворимости порошковых целлюлоз и средневязкостная степень полимеризации ПЦ и регенерированных (РПЦ) образцов

Образцы ПЦ, полученные из	Оптимальная предельная концентрация в растворе*, масс. %	Оптимальная растворимость, масс. %	** $СП_v$ ПЦ/РПЦ
отходов коротковолокнистого льна	1.2	99.5	270/120
целлюлозы лиственных пород древесины	3.0	99.8	240/130
целлюлозы хвойных пород древесины	3.0	100	220/110
макулатуры бумаги	0.3	42.0	260/105
макулатуры картона	0.6	55.5	320/120

*предельная концентрация, при которой сохраняется возможность переработки раствора; ** $СП_v$ определена по вязкости растворов в кадоксене

Образцы ПЦ, выделенные из растительного сырья, имеют максимальную растворимость в растворяющей системе, однако оптимальная предельная концентрация этих образцов различна и отличается в 3 раза (Табл. 1). Образцы бумажной макулатуры имеют наиболее низкие значения растворимости (40.0 и 55.5 масс. %) и предельной концентрации - 0.3 и 0.6% масс.% для МГ и МК соответственно. Оптимальная растворимость образцов является определяющим фактором на последующих этапах при образовании гидрогелей. Учитывая различную растворимость исследуемых образцов и возможность использования части из них при ограниченных концентрациях, следовало ожидать, что физико-химические свойства гидрогелей, полученных из них, будут существенно различаться.

Регенерация гидрогелей из растворов в ДМАА/LiCl, самоорганизация гидрогелей и их выделение

После растворения ПЦ в системе ДМАА/LiCl и образования растворов следовали последовательные стадии *регенерации* из растворов, который проходил без применения осадителей в воздушной атмосфере при температуре окружающей среды:

- выдерживание растворов;
- медленная агрегация;
- спонтанное гелирование и формование гелей;
- удаление растворителя путем промывки дистиллированной водой и получение гидрогелей;
- хранение гидрогелей под слоем воды или сушка.

Представленный процесс формирования гидрогелей имеет сходство с кристаллизацией из растворов, т.е. процессом выделения твёрдого вещества из раствора. Однако, как известно, кристаллизация происходит из насыщенных растворов при понижении температуры растворов.

Особенностью процесса образования гидрогелей целлюлозы является отсутствие какого-либо внешнего воздействия, т.е. без изменения температуры и давления, без кросс-агентов или катализаторов. Основным отличием является формирование гидрогелей из растворов с низкой концентрацией целлюлозы в них.

Обращает на себя внимание значительное уменьшение СП_v регенерированных образцов по сравнению с порошковыми целлюлозами, из которых они получены (Табл. 1). Результаты показывают, что растворение ПЦ и регенерация происходят при значительной деструкции целлюлозных цепей, что приводит к большей адсорбционной способности регенерированных образцов.

Физико-химические и механические свойства гидрогелей

В Таблице 2 приведены основные физико-химические свойства гидрогелей (равновесное содержание воды в гидрогелях (РСВ), пористость (P_t) и удельная поверхность (УП)) и модуль упругости.

Таблица 2

Физико-химические и механические свойства гидрогелей

Гидрогели из растворов ПЦ или макулатуры	РСВ, масс. %	P _t , %	УП*, м ² /г	Модуль упругости, МПа
отходов льна	2500	98.9	41.0	2.8
лиственной целлюлозы	2800	97.4	45.5	2.1
хвойной целлюлозы	2000	86.8	38.2	-
отходов бумаги	1395	96.4	27.4	1.1
отходов картона	1510	94.7	26.8	1.6
*определена по величине адсорбции красителя метиленового голубого				

Высокие значения РСВ имеют гидрогели, выделенные из исследованных растительных ПЦ. Наибольшее содержание воды получено в гидрогелях из лиственной ПЦ (2800 масс.%). Существенно ниже значения РСВ гидрогелей, выделенных из образцов макулатуры. Величины удельной поверхности гидрогелей растительных ПЦ составляют 38,2–45,5 м²/г, в то время как для гидрогелей, выделенных из макулатуры, эти величины не превышают 27.4 м²/г.

В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что ГГ всех исследованных образцов являются супернабухшими системами. Величины РСВ во много раз превышают аналогичные значения исходных ПЦ и макулатуры, а также образцов целлюлозы, регенерированных из растворов и описанных ранее.

Механические свойства гидрогелей характеризовали модулем упругости, который определяли в эксперименте на продольное сжатие. Величины модуля упругости для гидрогелей из отходов льна и лиственной целлюлозы составляли 2.8 и 2.1 Мпа соответственно (Табл. 2). Существенно ниже величины модуля упругости гидрогелей, полученных из отходов бумаги и картона, что объясняется присутствием в них некоторого количества примесей, не удаленных при получении гидрогелей. Гидрогели являются достаточно эластичными. Так, сжатие на 80 % не привело к разрушению образцов гидрогелей или к появлению в них визуально регистрируемых дефектов.

Сравнение физико-химических и механических свойств образцов гидрогелей, синтезированных на базе растительных целлюлоз и отходов бумажного производства, показало, что гидрогели из бумажных отходов уступают по указанным показателям гидрогелям растительных целлюлоз. Тем не менее, свойства гидрогелей из отходов бумажного производства также являются удовлетворительными, и гидрогели могут в перспективе быть использованы в

направлениях, не требующих тщательной очистки, например, для фильтрации сточных вод или адсорбции красителей.

Благодарность. Автор благодарит А.Л. Буянова и И.В. Гофмана (ИВС РАН) за исследование деформационно-прочностных свойств гидрогелей.

Библиографический список

1. Kundu, R., Mahada, P., Chhirang, B., Das, B. Cellulose hydrogels: Green and sustainable soft biomaterials // *Current Res. Green Sustainable Chem.* 2022. Vol. 5, 100252. Pp. 1–10. DOI: 10.1016/j.crgsc.2021.100252
2. Cao, X., Li F., Zheng, T. Li, G., *et al.* Cellulose-based functional hydrogels derived from bamboo for product design. *Mini Review // Front. Plant Sci., Sec. Tech. Adv. Plant Sci.* 2022. Vol. 13. P. 1–12. DOI: 10.3389/fpls.2022.958066
3. Мартакова, Ю.В. Гидрогели из растворов растительных целлюлоз в ДМАА/LiCl, физико-химические свойства и композиты с наночастицами серебра // *Дисс. уч. степ. канд. хим. наук.* 2018. ИВС РАН. Санкт-Петербург. С.
4. Kotelnikova, N., Vykhovtsova, Yu., Mokeev, V., *et al.*, Solubility of lignocellulose in N,N-dimethylacetamide/lithium chloride. WAXS, ¹³C CP/MAS NMR, FTIR and SEM studies of samples regenerated from the solutions // *Cellulose Chem. Technol.* 2014. Vol. 48. № 7–8. Pp. 643–651. [http://www.cellulosechemtechnol.ro/pdf/CCT7-8\(2014\)/p.643-651](http://www.cellulosechemtechnol.ro/pdf/CCT7-8(2014)/p.643-651)
5. Wan Hazman, D, Zaiton, A.M., Mohd Nazlan, M.M., *et al.* The reuse of wastepaper for the extraction of cellulose nanocrystals // *Carbohydrate Polym.* 2015. Vol. 118. Pp. 165–169. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.10.072
6. Youla, D.A. New Theory of Cascade Synthesis // *IRE Transactions on Circuit Theory.* 1961. Vol. 8. Iss. 3. Pp. 244–260. DOI: 10.1109/TCT.1961.1086791.
7. Буянов, А.Л., Гофман, И.В., Хрипунов А.К., и т.д. Высокопрочные биосовместимые гидрогели на основе полиакриламида и целлюлозы: синтез, механические свойства и перспективы применения в качестве искусственных заменителей хрящевых тканей // *Высокомолекулярные соединения. Серия А.* 2013. Т. 55. № 5, С. 512–522. <https://doi.org/10.7868/S0507547513050036>

УДК 677.014.82

ARE THE PAPER WASTE DEBRIS VERY HARMFUL TO HUMANITY? A SHORT REVIEW

N.E. Kotelnikova

Institute of Macromolecular Compounds, RAS, St. Petersburg, Russia_

The review considers the issues related to the environmental problem of paper production, its consumption and paper wastes generated. The main risks of paper production, immoderate consumption of paper materials, formation of paper waste and its recycling are highlighted. The necessity of responsible and sparing attitude to the environment when using paper waste is emphasised.

Keywords: paper production, paper wastes, recycling, environmental risks, responsibility

ЯВЛЯЕТСЯ ЛИ ПАНДЕМИЯ ОТХОДОВ БОЛЬШОЙ УГРОЗОЙ ДЛЯ ЧЕЛОВЕЧЕСТВА? КРАТКИЙ ОБЗОР

Н.Е. Котельникова

Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

В обзоре рассмотрены вопросы, связанные с экологической проблемой получения бумаги, ее потребления и образующихся отходов бумажной макулатуры. Отмечены основные риски производства бумаги, неумеренного потребления материалов из бумаги, образования бумажных отходов и их переработки. Подчеркнута необходимость ответственного и щадящего отношения к окружающей среде при использовании бумажных отходов.

Ключевые слова: производство бумаги, бумажные отходы, переработка, экологические риски, ответственность

Waste is one of the most pressing problems of mankind. In this brief overview, we will only cover one type of waste - paper waste, as an example. However, everything that will be presented can be fully applied to numerous other biological and industrial wastes as well. In today's electronic age, people are starting to consider going paperless. But there's still a long way to go before we lose our dependence on this very important human product. While the paper has many benefits - renewable resources, biodegradability and versatility - it also has its drawbacks [1].

Where the paper products come from ? What are paper and paper materials? [2]

Paper comes from forests and is made from cellulose – forests being the main source of cellulose fibre (or woodpulp). From 2001 to 2019, a total of 386 million hectares of forest were lost globally (in all forest types combined). This loss represents an almost 10 % decrease in tree cover since 2000. From our newspapers to our paper wrappings, paper is still everywhere and most of them are ending up in our landfills creating a staggering amount of paper waste. There was a time when paper was a rare and precious commodity. Now it fills our planet. It was initially invented as a tool for communication, but today, paper is used more for packaging. From 2010 to 2060, the global consumption of pulp, paper and paperboards is expected to double. The same will be the amount of paper waste. An increased paper production will also add further to the pressure on the world's forests that are already in a critical state - and constantly getting worse. Besides woodpulp, paper can be made from other materials such as cotton, flax, esparto, straw, hemp, manilla and jute. This was simply and expressively articulated in the paper. Paper is an aqueous deposit of any vegetable fibre in sheet form [3].

A paper-based products typically contain 90–99 % cellulose fibres, which are the most essential component impacting end-use qualities and the principal structural element. The majority of paper grades are made up of both organic and inorganic materials. The organic fraction, which consists of cellulose, hemicellulose, lignin, and/or different lignin compounds (Na-lignite, for example), can range

from 70 to 100 % sometimes including filling and loading materials. The inorganic fraction of the paper, which consists primarily of filling and loading materials such as calcium carbonate, clay, titanium oxide, and so on, may range from 0 to 30%. [4].

What is paper waste? [5]

Paper waste is any form of paper that's no longer usable and needs disposing. It's essentially the kind of material we'd class as 'scrap paper'. For example it could be old newspaper, bills, or letters. It needs to be free from contaminants to be recyclable. For businesses, printing errors, junk mail, and packaging are some of the main paper waste types. Used cardboard also refers to waste paper. According to the Confederation of European Paper Industries (CEPI) definition reads, "Paper is usually called board when it is heavier than 220 g/m²". What paper and paperboard have in common is that they both consist primarily of cellulose fibres. But there are really points that set them apart from each other [6].

The macrodistinctions between the different types of paper waste?

Some specific features distinguish paperboard compared to paper:

- Paperboard can be made in a single ply or, more commonly, in multiple plies (multi-ply).
- Paperboard contains a higher proportion of long fibres than paper.
- Paperboard does not usually contain fillers.

Thus, paperboard is a heavier paper product with a multi-ply structure. [6]

Impact of paper production and waste paper on the environment

Everything takes energy to produce. To produce paper takes twice the energy used to produce a plastic bag. Paper manufacturing used up to 40% of all global wood. The process of manufacturing paper releases nitrogen dioxide, sulfur dioxide, and carbon dioxide into the air, contributing to pollution such as acid rain and greenhouse gases [7]. Deforestation is the primary effect of our mindless use of paper. Conservation groups have made an admirable headway in protecting ecologically rich forests and limiting commercial access. This is great progress for mankind! Just imagine how long a tree will grow to its full size... We are only just realizing the wasted use of our trees - trees that give off oxygen and protect the planet from further Global Warming. Another problem arises from everyone's much-needed paper consumption.

Environmental impact of toilet waste paper

Producing 42 million tons of toilet paper requires:

- 712 million trees
- 1,165 millions tons of water
- 78 million tons of oil

There are three different types of paper waste one can recycle [7]:

- *Mill broke* – any paper scrap or trimmings produced when manufacturing paper. It's generally recycled internally by the paper mills.
- *Pre-consumer waste* – paper sent away from the paper mill but discarded before a consumer uses it.
- *Post-consumer waste* – paper material received and used by a consumer and then discarded, such as newspapers, packaging, and printing paper.

What is the danger of waste paper? [8]

The life cycle of paper is damaging to the environment from the beginning to end. It starts off with a tree being cut down and ends its life by being burned – emitting carbon dioxide in the atmosphere. Paper production uses up lots of water. For instance, an A4 paper requires 10 liters of water per sheet.

As already mentioned, paper is obtained from the wood pulp. If we keep on cutting trees for a long period they will eventually vanish and finally, we have lots of environmental threats due to loss in balance in the ecosystem. The manufacturing process of paper can lead to deforestation, water pollution, and chemical use, as well as generate large amounts of waste. Hence, we should not waste paper.

Paper pollution is another effect of paper waste and it's a serious problem. It is estimated that by 2020, paper mills will be producing 500,000,000 tons of paper and paperboard each year! We obviously need this product and a reduction of use is not in the horizon. Pulp and paper is the 3rd largest industrial polluter of air, water and soil. Chlorine-based bleaches are used during production which results in toxic materials being released into our water, air and soil. When paper rots, it emits methane gas which is 25 times more toxic than CO₂. Pulp and paper mills contribute to air, water and land pollution and

discarded paper and paperboard make up roughly 26% of solid municipal waste in landfill sites. Pulp and paper generate the third largest amount of industrial air, water, and land emissions in all over the world. From the above, it follows that the most important challenges for humanity to preserve our environment and to reduce paper consumption and paper waste as well.

One example for comparison. *Is paper waste worse than plastic? Does paper pollute more than plastic?* [9]. Plastic bags generate 39% less greenhouse gas emissions than uncomposted paper bags and 68% less greenhouse gas emissions than composted paper bags. Plastic bags consume less than 6% of the water needed to make paper bags. [10]. This brief overview shows that the ever-increasing production of paper is having an extremely negative impact on the environment, and its continued unrestrained use is becoming another pandemic and a global problem for all mankind.

How can one help to reduce paper pollution and waste?

There are several ways to minimise the environmental impact of paper waste. The most important one is *recycling*. Recycling is the total system by which recovered materials are collected, separated, processed, and reused or returned to use in the form of a marketable product [5].

What is the chemical composition of paper waste?

In order to recycle any material, one need to know its composition. Paper is created mainly from organic compounds such as oxygen, carbon, hydrogen. This organic portion consisting of cellulose, hemi-cellulose, lignin and/or various compound of lignin (Na-lignate etc.) may be 70 to 100%. Paper has non-organic compounds also for improving the properties. Inorganic portion consisting of mainly filling and loading material such as caolin ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), calcium carbonate (CaCO_3), clay ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$), titanium oxide (TiO_2) etc. may be 0 - 30% of paper. Information on the composition of waste paper is very diverse and often contradictory. Here are the data of the most reliable source. Waste paper is consisting of 37-62% cellulose, 3-20 % of hemicellulose, and 2-34% of lignin [11].

Recycled paper: Paper that is produced entirely from recovered paper.

How is paper recycled and what is it used for? [12]

The first steps of recycling are collection of paper from different sources, sorting and removing of contaminants. After transporting to a paper mill where recycling process really begins, the paper is mixed with water and other ingredients in a pulper, then heating the mixture churned the paper and breaks down. From this re-pulping, the slurry of cellulose fibers is screened for further cleaning and deinking. The next steps are refining and bleaching. The first one is realised by beating to make the recycled fibers swell following to the second step bleaching with hydrogen peroxide, chlorine dioxide, or oxygen to make it whiter and brighter. The papermaking is made by mixing the pulp with water and chemicals and this watery pulp comes the papermaking mashine and then is sprayed to wire screen where water is gained from the pulp. The obtained recycled fibers bond together to form a watery sheet. The remaining waste is removed on the press roller by squeezing. As it dries, it is formed into rolls of paper — *newly recycled paper - which is returned to use in the form of a marketable product.*

Recycled paper become a valuable secondary raw materials. It is used to make new products such as paper bags, toilet paper and all different kinds of boxes.

How many times can paper be recycled?

Waste paper made up of long fibers, so every time paper is recycled, those fibers will be shortened, making it harder to be recycled the next time. The average number of times your printer paper can be recycled is about five to seven times.

What is the main disadvantage to recycling paper?

Recycling can also have negative environmental impacts. For example, the process of recycling paper requires the use of chemicals and large amounts of water and energy. Similarly, recycling plastic can release harmful pollutants into the air and water [13]. Thus, to the question posed in the title of this short review "Are the paper waste debris very harmful to humanity?", the answer is as follows: YES, dangerous. And the problem *How can one help to reduce paper pollution and waste?* has the following answers:

- less consumption,
- less waste,
- more recycling

- and reus.

Let us note that only with high personal responsibility of people can we achieve this and not drown in the debris of waste.

References

1. Paper waste Facts. Available from: <https://www.theworldcounts.com/stories/paper-waste-facts>
2. The history of paper. Advancing a Sustainable Future. American Forest ? Paper Association. <https://www.afandpa.org/>.
3. Available from: <https://paper.org.uk/CPI/CPI/Content/Schools/Kid-zone/What-is-paper.aspx>.
4. Available from: <https://unacademy.com/content/nda/study-material/chemistry/composition-of-paper/>
5. Paper waste recycling. Business waste.co.uk. Available from: <https://www.businesswaste.co.uk/your-waste/paper-recycling/>.
6. Differences paper and paperboard. Reference Manual The Confederation of European Paper Industries (CEPI).| IGGESUND PAPERBOARD. A9REAC6.tmp Available from: <https://www.iggesund.com/insights/paperboard-know-how/about-paperboard/differences-between-paper-and-paperboard/>.
7. Paper Recycling Facts, Figures and Information Sources". *Small Business*. Retrieved 28 August 2018.
8. Environmental impact of paper. The World Counts – Impact through Awareness. Available from: <https://www.theworldcounts.com/stories/environmental-impact-of-paper-production>
9. Sustainable Shopping—Which Bag Is Best? Available from: www.nationalgeographic.org.
10. Environmental impact of plastic vs. paper. Available from: <https://perfectpackaging.org/>. 19.12.2019.
11. de Oliveira, D.M., Campos de Bomfim, A.Sh., Coelho de Carvalho Benini, K.C., *et al.* Waste paper as a valuable resource: An overview of recent trends in the polymeric composites field. *Polymers* 2023, 15, 426. <https://doi.org/10.3390/polym15020426>.
12. The paper recycling process. <https://www.recyclenow.com/how-to-recycle/paper-recycling>
13. The advantages and disadvantages of recycling waste. Available from: <https://www.recyclezone.org.uk/the-advantages-and-disadvantages-of-recycling-waste/>. 12 Jul 2023.

УДК 661.728.892:581.142

РОСТОРЕГУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА КАРБОКСИМЕТИЛИРОВАННОЙ НЕПИЩЕВОЙ БИОМАССЫ ШИШЕК СОСНЫ СИБИРСКОЙ

Е.Ю. Кушнир¹, Е.А. Семина¹, Н.Г. Базарнова¹, Д.В. Лисих²

¹*Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия*

²*ООО «Бурэкс», с. Лесное, Бийский р-н, Алтайский край, Россия*

Исследованы росторегулирующие свойства карбоксиметилированной непищевой биомассы шишек сосны сибирской в отношении прорастания семян огурца сорта Кустовой. Выявлена сложная зависимость росторегулирующих свойств карбоксиметилированной биомассы шишек от ее расхода в процессе прорастания семян. Максимальная всхожесть семян огурца отмечена при использовании растворов с содержанием продукта карбоксиметилирования 0,1–0,2 г/дм³. Наиболее интенсивный рост корня в длину наблюдался при обработке семян растворами с концентрацией карбоксиметилированной биомассы 0,025–0,05 г/дм³.

Ключевые слова: сосна сибирская, непищевая биомасса шишек, карбоксиметилирование, росторегулирующие свойства, семена огурцов.

GROWTH-REGULATING PROPERTIES OF CARBOXYMETHYLATE NON-FOOD BIOMASS FROM SIBERIAN PINE CONES

E. Yu. Kushnir¹, E. A. Semina¹, N. G. Bazarnova¹, D. V. Lisikh²

¹*Altai State University, Barnaul, Russia*

²*LLC Bureks, Lesnoe Village, Biysky district, Altai Krai, Russia*

The growth-regulating properties of carboxymethylated non-food biomass from Siberian pine cones in relation to the cucumber seeds germination of the Kustovoy variety were studied. A complex dependence of the growth-regulating properties of carboxymethylated cone biomass on its consumption during seed germination was revealed. The maximum germination of cucumber seeds was noted when using solutions containing 0.1–0.2 g/dm³ of the carboxymethylation product. The most intensive growth of roots in length was observed when seeds were treated using solutions with a carboxymethylated biomass concentration of 0.025–0.05 g/dm³.

Keywords: Siberian pine, non-food biomass of cones, carboxymethylation, growth-regulating properties, cucumber seeds.

Карбоксиметилированная растительная биомасса может применяться в качестве безопасного и эффективного стимулятора роста растений [1]. Продукты карбоксиметилирования растительного сырья ускоряют корнеобразование, рост побегов и корней в длину при прорастании семян [2], микрклональном размножении растений [3] и укоренении черенков [4]. Применение стимуляторов роста на основе продуктов карбоксиметилирования способствует лучшему развитию вегетативной и генеративной частей сельскохозяйственных растений, увеличению их урожайности [1, 5]. Ростостимулирующая активность продуктов карбоксиметилирования и оптимальные условия их внесения зависят от вида исходного растительного сырья, его состава и строения [2]. В связи с этим теоретически и практически значимым направлением исследований в области разработки и применения стимуляторов роста растений является поиск новых видов растительного сырья для получения продуктов карбоксиметилирования и изучения их росторегулирующих свойств.

Цель работы – исследование росторегулирующих свойств карбоксиметилированных отходов обрушения шишки сосны сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour).

Сосна сибирская относится к числу основных лесообразующих пород России. Шишки

сосны сибирской являются одним из самых высоко востребованных пищевых лесных ресурсов и ежегодно заготавливаются в крупных масштабах [6]. При извлечении семян сосны сибирской («кедрового ореха») образуются большие количества отходов обрушения шишки, переработка которых проводится достаточно редко [7]. Непищевая биомасса шишек сосны сибирской имеет высокое содержание лигниновых веществ и полисахаридов [8] и может использоваться как сырье для химической переработки, в частности методами карбоксиметилирования с получением стимуляторов роста растений.

В качестве исходного сырья в работе использовали фракцию измельченных воздушно-сухих отходов обрушения шишки сосны сибирской с размерами частиц не более 0,67 мм и влажностью 6,5 % (кольматант «ФВ-ТУНГА 50», ТУ 20.59.59-001-83929816-2019, ООО «Бурэкс»). Непищевая биомасса шишек сосны сибирской содержала 53,2 % лигнина (по Комарову) и 21,9 % целлюлозы (по Кюршнеру) в пересчете на абсолютно сухое сырье.

Непищевую биомассу шишек сосны сибирской карбоксиметилировали суспензионным методом [9]. В колбу вносили воздушно-сухое растительное сырье, предварительно растертый гидроксид натрия и пропанол-2. Содержимое колбы перемешивали и нагревали на водяной бане. Затем в колбу вносили растертый монохлорацетат натрия, реакционную смесь перемешивали и нагревали на водяной бане. По окончании обработки полученный продукт отделяли на воронке Бюхнера, промывали 95 %-ным этанолом, подкисленным 90 %-ной уксусной кислотой, затем 95 %-ным этанолом и высушивали на воздухе.

Исследуемый продукт карбоксиметилирования непищевой биомассы шишек сосны сибирской характеризовался содержанием карбоксиметильных групп 38,6 % (определено методом кондуктометрического титрования [9]) и растворимостью в воде 84,1 %.

Росторегулирующие свойства карбоксиметилированной непищевой биомассы шишек сосны сибирской оценивали в отношении прорастания семян огурца сорта Кустовой. Предварительно семена огурца проверяли на полновесность погружением в 3 %-ный раствор хлорида натрия. Отобранные полновесные семена дезинфицировали 0,01 %-ным раствором перманганата калия, промывали дистиллированной водой и помещали по 5 штук в чашки Петри между двумя дисками фильтровальной бумаги. Каждую группу семян смачивали 10 см³ водного раствора продукта карбоксиметилирования заданной концентрации и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 суток. Ежедневно все чашки Петри открывали на 5 мин. При необходимости их содержимое увлажняли небольшим количеством дистиллированной воды. Определяли всхожесть семян огурца на 5-е сутки (рис. 1) и среднюю длину главного корня на 5-е и 10-е сутки инкубирования (рис. 2). Полученные результаты сравнивали с контрольной группой семян, обрабатываемых только дистиллированной водой (концентрация раствора продукта карбоксиметилирования 0 г/дм³ на рис. 1 и 2).

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о сложном характере зависимости росторегулирующих свойств карбоксиметилированной непищевой биомассы шишек сосны сибирской от ее расхода в процессе прорастания семян. Внесение водных растворов карбоксиметилированной биомассы с концентрацией 0,025–0,4 г/дм³ повышает всхожесть семян огурца сорта Кустовой на 5-е сутки инкубирования в 2–2,5 раза по сравнению с контролем. Причем максимальная всхожесть семян наблюдается при содержании продукта карбоксиметилирования в растворе в пределах 0,1–0,2 г/дм³. Дальнейшее увеличение расхода карбоксиметилированной биомассы свыше 0,2 г/дм³ приводит к уменьшению всхожести семян огурца. Внесение водных растворов карбоксиметилированной биомассы во всем изученном диапазоне концентраций способствует более интенсивному росту главного корня в длину в течение первых 5-ти суток инкубирования семян. Однако при расходе продукта карбоксиметилирования выше 0,1 г/дм³ рост главного корня в длину в течение последующих 5-ти суток инкубирования существенно замедляется по сравнению с контрольной группой семян огурца. Наиболее интенсивное формирование корневой системы проростков огурца в течение всего срока инкубирования имеет место при внесении растворов с концентрацией карбоксиметилированной биомассы в пределах 0,025–0,05 г/дм³.

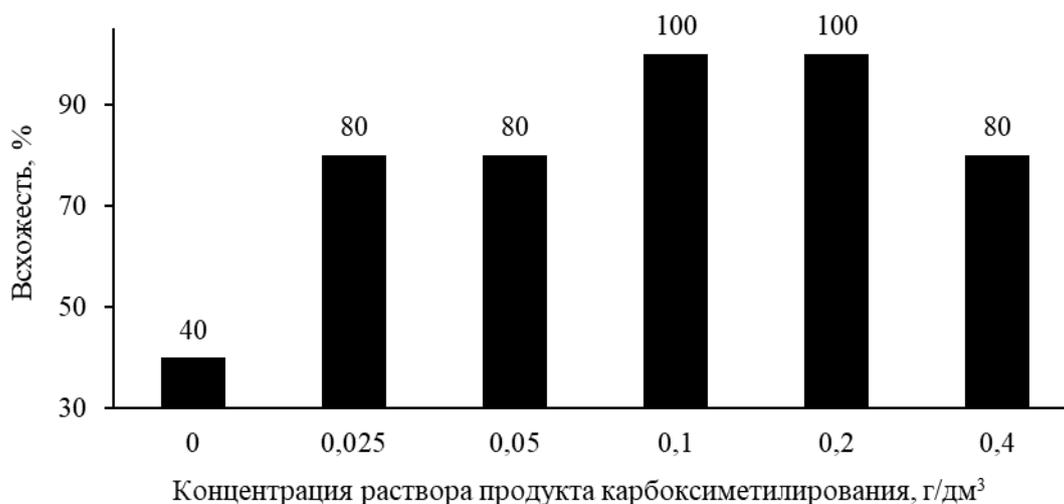


Рис. 1. Всхожесть семян огурца сорта Кустовой на 5-е сутки инкубирования

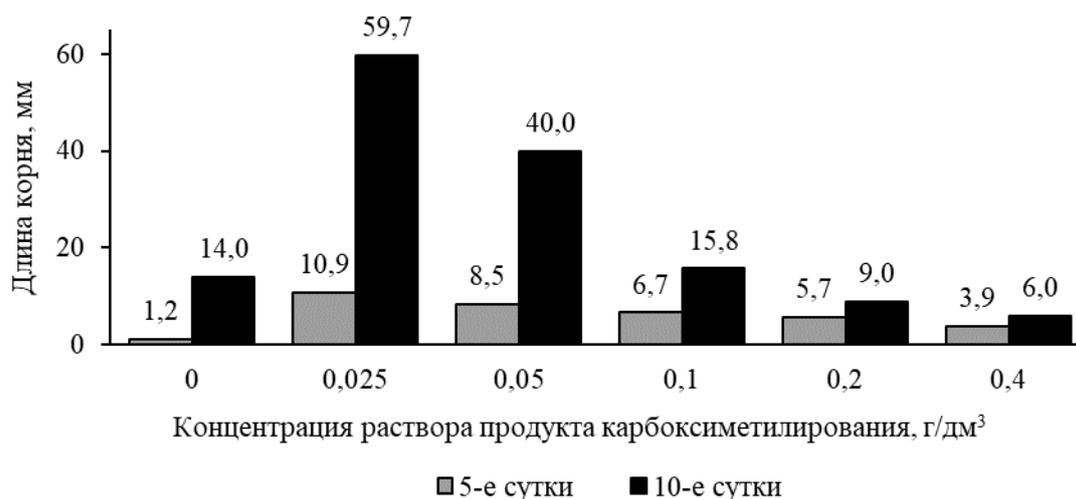


Рис. 2. Средняя длина главного корня проростков огурца сорта Кустовой на 5-е и 10-е сутки инкубирования

По-видимому, сложная зависимость росторегулирующих свойств карбоксиметилированной непищевой биомассы шишек сосны сибирской от ее расхода свидетельствует о различном влиянии продуктов химических превращений растительных веществ на физиологические процессы в прорастающем семени. Следует полагать, что вклад влияния каждого компонента карбоксиметилированной биомассы находится в прямой корреляции с его концентрацией и физиологической активностью. При расходе карбоксиметилированной биомассы в пределах 0,025–0,05 г/дм³ результат ее влияния определяется физиологической активностью компонентов, ускоряющих процессы прорастания семени и роста корня в длину. Увеличение расхода карбоксиметилированной биомассы выше 0,05 г/дм³ приводит к возрастанию вклада влияния компонентов, замедляющих прорастание семян и рост корней в длину. Вероятно, к числу таких компонентов в составе карбоксиметилированной биомассы относятся продукты химических превращений лигнина и лигноподобных соединений, имеющие ауксиноподобное строение. Это предположение согласуется с последними литературными данными о биологической роли ауксина в растениях [10, 11].

Таким образом, благодаря сложному химическому составу продукты карбоксиметилирования непищевой биомассы шишек сосны сибирской могут применяться в качестве регуляторов роста, оказывающих (в зависимости от расхода) стимулирующее или

ингибирующее влияние на физиологические процессы в онтогенезе растительных организмов.

Благодарности. Исследование проведено в рамках финансируемой научно-исследовательской работы «Анализ, модифицирование карбоксиметилированием и изучение ростостимулирующей активности образцов кедровой шишки» (хоздоговор АлтГУ № 163/2023)

Библиографический список

1. Калюта Е.В., Мальцев М.И., Маркин В.И., Катраков И.Б., Базарнова Н.Г. Применение инновационных препаратов Эко-Стим в качестве регуляторов роста сельскохозяйственных культур // Химия растительного сырья. 2016. № 2. С. 145–152.
2. Калюта Е.В., Мальцев М.И., Маркин В.И., Катраков И.Б., Базарнова Н.Г. Исследование влияния карбоксиметилированного растительного сырья на активность прорастания яровой мягкой пшеницы // Химия растительного сырья. 2013. № 3. С. 249–253.
3. Базарнова Н.Г., Тихомирова Л.И., Фролова Н.С., Павлушин А.Е., Курчанова Е.А. Влияние стимулятора роста растительного происхождения на морфогенез *Iris sibirica* L., *Hedysarum teinum* Krasnob. и *Syringa vulgaris* L. в культуре *in vitro* // Химия растительного сырья. 2013. № 3. С. 243–248.
4. Пугач Е.Д., Пугач Д.А., Пугач В.А. Оценка некоторых продуктов карбоксиметилирования растительного сырья в качестве стимуляторов роста облепихи // Global Science and Innovations 3: материалы Международной научной конференции (Лейпциг, 18 марта 2018 г.). Астана: ИП «Евразийский центр инновационного развития DARA», 2018. С. 111–113.
5. Калюта Е.В., Мальцев М.И., Маркин В.И., Машкина Е.И. Влияние препаратов, полученных из карбоксиметилированного растительного сырья на ростовые процессы, урожайность и биохимические показатели зерна пшеницы // Химия растительного сырья. 2021. № 2. С. 361–368.
6. Хамитов Р.С., Баранова С.А. Индивидуальная изменчивость урожайности семян сосны кедровой сибирской в условиях интродукции // Хвойные бореальной зоны. 2019. Т. 37. № 6. С. 443–447.
7. Криворотова А.И., Эскин В.Д. Исследование способов и режимов переработки шишки сосны сибирской при изготовлении декоративного композиционного материала // Хвойные бореальной зоны. 2022. Т. 40. № 5. С. 430–438.
8. Иванов В.А., Лис Е.В., Фибих Е.В., Шимова Ю.С. Исследование химического состава шишек и семян хвойных пород Сибири // Хвойные бореальной зоны. 2023. Т. 41. № 1. С. 95–100.
9. Базарнова Н.Г. Химия древесины и ее основных компонентов. Барнаул: АлтГУ, 2002. 50 с.
10. Matilla A.J. Auxin: hormonal signal required for seed development and dormancy // Plants. 2020. Vol. 9. No. 6. Article 705.
11. Edelmann H.G. Plant root development: is the classical theory for auxin-regulated root growth false? // Protoplasma. 2022. Vol. 259. Pp. 823–832.

УДК 543.42: 547:58.04

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ БИОДЕГРАДАЦИИ СМЕШАННОГО ОПАДА В ЗОНЕ ЕСТЕСТВЕННОГО УВЛАЖНЕНИЯ НА РЕЗУЛЬТАТЫ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ

П.И. Ленивцев, А.И. Смирнова, А.Б. Дягилева

*Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна,
ул. Ивана Черных, д. 4, Санкт-Петербург, Россия, 198095*

Разложение листовых пластинок опада в широколиственных лесах происходит как в результате химических процессов, участвующих в деструкции, так и благодаря работе грибов, бактерий, а также беспозвоночных фито- и детритофагов. На первых этапах активной деструктуризации листового опада и других крупных растительных частей участвуют микробы и беспозвоночные-измельчители. Затем бактерии и грибы колонизируют лист, смягчая его. При этом листовая опад различных пород древесины может сильно различаться по химическому составу, что требует контрольных мероприятий при оценке его качественных характеристик как потенциального вторично сырья. Некоторые виды подстилки богаты питательными веществами или углеродом, которые можно легко утилизировать (лабильный углерод), тогда как другие бедны питательными веществами или содержат высокие концентрации органических соединений, таких как лигнин, которые устойчивы к разложению (стойкий углерод). Исследования листьев осины, подверженных биодegradации в условиях естественной ферментации в зоне устойчивого увлажнения на территории Северо-Западного региона методом ИК спектроскопии показали, что для большинства образцов содержание СН (алканов) групп увеличивается у ферментированных образцов по сравнению с неферментированными, а содержание –ОН и С=С групп имеет тенденцию в процессе ферментирования к уменьшению, изменения количества карбонильных групп существенно не происходит.

Ключевые слова: листовая опад, ИК - спектроскопия, биодegradация, алканы, вторичное сырье.

EVALUATION OF THE EFFECT OF BIODEGRADATION OF MIXED LITTER IN THE NATURAL HUMIDIFICATION ZONE ON THE RESULTS OF IR SPECTROSCOPY

P.I. Lenivtsev, A.I. Smirnova, A.B. Diagileva

St. Petersburg University of Industrial Technology and Design Higher School of Technology and Energy, 198095 St. Petersburg, Ivan Chernykh str., 4

The decomposition of leaf blades in deciduous forests occurs both as a result of chemical processes involved in destruction, and due to the work of fungi, bacteria, as well as invertebrate phyto- and detritophages. Microbes and invertebrate shredders are involved in the first stages of active destructurization of leaf litter and other large plant parts. Then bacteria and fungi colonize the leaf, softening it. At the same time, leaf litter of various types of wood can vary greatly in chemical composition, which requires control measures when evaluating its qualitative characteristics as a potential secondary raw material. Some types of litter are rich in nutrients or carbon that can be easily disposed of (labile carbon), while others are poor in nutrients or contain high concentrations of organic compounds such as lignin that are resistant to decomposition (persistent carbon). Studies of aspen leaves exposed to biodegradation in conditions natural fermentation in the zone of stable humidification in the Northwestern region by IR spectroscopy showed that for most samples the content of CH (alkane) groups increases in fermented samples compared with unfermented ones, and the content of -OH and C=C groups tend to decrease during fermentation, changes in the number of carbonyl groups do not occur significantly.

Keywords: leaf litter, IR spectroscopy, biodegradation, alkanes, secondary raw materials.

Загрязнение окружающей среды и переработка органических отходов — серьезные проблемы современности. Одним из путей их решения является биodeградация — наиболее естественный и экологически безопасный способ уничтожения и обеззараживания отходов цивилизации. Биodeградация (биологический распад, биоразложение) — разрушение сложных веществ, материалов, продуктов в результате деятельности живых организмов; чаще всего при упоминании биodeградации подразумевается действие микроорганизмов, грибов, водорослей. Поэтому исследование поведения листового опада под воздействием естественных процессов является актуальным для понимания и создания условий управления эти процессом.

Слово «деградация» в дословном переводе с латыни означает «упрощение». Соответственно, слово «биodeградация» подразумевает упрощение структуры вещества под влиянием биохимических реакций на более низкий уровень самоорганизации органической массы листа. У специалистов, работающих в этой области, термин «биodeградация» интуитивно ассоциируется именно с упрощением структуры. Это соответствует действительности, если речь идёт о веществах сложного строения, таких как полимеры. Если же биodeградации подвергается вещество простейшей структуры в таком случае чаще всего, наоборот, происходит усложнение строения [6].

Разложение листовых пластинок [9] (широколиственный опад) происходит как в результате химических процессов, участвующих в разложении (выщелачивание), так и благодаря работе грибов, бактерий, а также беспозвоночных фито- и детритофагов. На самых первых этапах в активной деструктуризации листового опада и других крупных растительных частей участвуют микробы и беспозвоночные-измельчители. Затем бактерии и грибы колонизируют лист, смягчая его, поскольку мицелий гриба, внедряясь, «разрыхляет» листовую пластину. Комбинированное действие бактерий, грибов, животных и химических процессов ускоряет процессы растительного разложения, измельченное вещество в виде крупнодисперсного органического вещества (КОВ) и мелкодисперсного (МОВ) поступает в толщу потока как новое по форме органическое вещество.

Мертвые листья (опад) [3] обеспечивают энергию и субстрат для большого количества организмов в пресноводных экосистемах. При этом листовая опад сильно различается по химическому составу. Некоторые виды подстилки богаты питательными веществами или углеродом, которые можно легко утилизировать (лабильный углерод), тогда как другие бедны питательными веществами или содержат высокие концентрации органических соединений, таких как лигнин, которые устойчивы к разложению (стойкий углерод). Химические и физические свойства опада определяют пищевую ценность, а также лабильность и токсичность подстилки для беспозвоночных детритофагов и микробов-разрушителей. В то время как некоторые виды подстилки богаты питательными веществами и состоят из подвижного углерода (подстилка высокого качества), другие могут иметь высокие концентрации некоторых вторичных соединений и неподатливого углерода, такого как лигнин (подстилка низкого качества), которые могут ингибировать или препятствуют деятельности микробов-деструкторов и детритофагов беспозвоночных.

Показано [4], что микроорганизмы играют важную роль в разложении мусора, а повышение температуры на 4°C может ускорить микробное разложение в тропических водных системах. Это особенно важно, поскольку разложение в тропических пресноводных экосистемах в основном осуществляется микроорганизмами (т.е. бактериями и грибами).

Целью исследования являлось изучение биodeградации листьев древесных пород в условиях естественной ферментации под водой методом ИК- спектроскопии.

Материалы и методы

Материалом служили листья древесной породы осины, отобранных в зоне увлажнения на территории Ладожского заказника в 2022 и 2024 гг. Исследования подготовленных образцов проводили на базе межкафедральной научно-исследовательской лаборатории университета на спектрометре Bruker, ИК-фурье спектры снимали в диапазоне частот 400–4000 см⁻¹ с разрешением 2 см⁻¹, расстоянием между точками около 1 см⁻¹, усреднением 150 см⁻¹. Образец готовили в виде таблеток с использованием порошка KBr. При интерпретации ИК-спектров

наиболее информативными являются области $4000 - 2500 \text{ см}^{-1}$ и $2500 - 1500 \text{ см}^{-1}$. Интерпретацию полученных результатов проводили, опираясь на работы [2,7,8]. Обработка данных проведена с использованием Microsoft Excel. В качестве примера представлены образцы материала осины (рис. 1), который подвергался исследованию в данной работе.



Рис. 1. Изображение состояния опада в условиях естественной ферментации в экосистеме (а) и предварительно высушенного при нормальных условиях ферментированного образца опада листа осины (*Populus tremula* L.) (б) перед подготовкой к исследованию.

Результаты исследований

Для большинства исследованных образцов опада осины содержание СН (алканов) групп в общей структуре опада увеличивается у ферментированных образцов по сравнению с не ферментированными. Содержание –ОН и С=С групп в модифицированных структурах в результате естественного процесса ферментирования уменьшается. Следует отметить, что количество карбонильных групп практически не изменяется. Особенность ферментации в зоне естественного протекания процесса при увлажненных условиях, где доминируют гидробионты в органогенном слое почвы, значительно увеличивается количество нитросоединений в исследованных образцах осины.

Сравнительные данные результата ИК- спектроскопии образцов опада осины, которые были высушены при нормальных условиях и хранились в лаборатории в бумажном крафт пакете представлены в таблице 1: неферментированные образцы (массовый опад в точках формирования слоя опада в рекреационной зоне) - позиция 1; ферментированные образцы (закладка октябрь 2022 и отбор октябрь 2023 год до массового опада) - позиция 2.

Таблица 1.

Сравнительные характеристики ИК спектров образцов опада осины, исследования 2024 года.

Функциональные группы/ образцы	Алканы	Карбонильные соединения	Нитро соединения	Спирты ОН	Алкены	Спирты С–О
Длина волн	2810	1740	1510	3400	1650	1100
Осина	58.2	7.4	0.31	289	29.2	315
Осина ферм.	73.7	9	1.84	264	24.8	318

Интерпретировать полученные данные следует опираясь на нижеизложенные данные, полученные авторами в аналогичных исследованиях. Алканы [1] содержатся в современных и ископаемых растительных материалах, в почвах, а также в озерных и морских осадках. Вследствие прочной консервации, в последние десятилетия активно используют n-алканы как биомаркеры растительных сообществ и климатических условий при палеорекострукциях. Присутствующие в торфах алканы, стероиды и тритерпеноиды являются биомаркерами – соединениями, отражающими источник и условия накопления органического вещества. Их

состав свидетельствует о вкладе в торф той или иной группы торфообразующих растений, условиях торфообразования и о процессах, протекавших при разложении торфа [10].

Характерной особенностью хвойных растений, в отличие от лиственных, является присутствие помимо алканов большого количества других компонентов, в частности смол. Алканы, из-за своего строения (прочные сигма связи), являются очень стабильными, практически не вступают в химические реакции, и сохраняются неизменными на всех этапах преобразования органического вещества [5].

Природными источниками поступления углеводов, в том числе и нормальных алканов в почву являются растительные и, в меньшей степени, животные остатки. Алканы играют важную роль в создании почвенной гидрофобности, регулируют скорость разложения органического вещества, увеличивая стабильность почвенных агрегатов и плодородие почв. Твердые алканы встречаются в природе в виде залежей горного воска – озокерита, в восковых покрытиях листьев, цветов и семян растений, входят в состав пчелиного воска. Высшие алканы содержатся в кутикуле растений, предохраняя их от высыхания, паразитных грибов и мелких растительноядных организмов. Увеличение алканов в ферментированных образцах и объясняется их биомаркерными свойствами в торфах.

В связи с тем, что в составе аминокислот азот находится в аминной форме, нитратный азот в растениях, прежде чем включиться в состав аминокислот, подвергается восстановлению в аммонийную форму с помощью специальных ферментных систем. Восстановление нитратного азота в аммонийный в клетках растений, водорослей, грибов и бактерий осуществляется в два этапа. На первом этапе под действием фермента нитратредуктазы происходит превращение нитратов в нитриты, а затем нитриты с участием фермента нитритредуктазы восстанавливаются с образованием аммонийной формы азота, которая используется для синтеза аминокислот и амидов. У большинства растений при активном фотосинтезе и достаточном количестве углеводов, являющихся источниками образования НАД \times Н, процесс восстановления нитратов практически полностью происходит в корнях. Однако при недостатке света и низких температурах, ослабляющих синтез углеводов, а также избыточном азотном питании значительная часть нитратов поступает в вегетативную часть растений и подвергается восстановлению в листьях [11]. Этим объясняется увеличение количества нитросоединений в ферментированных образцах.

Таким образом, ИК спектроскопия биodeградации листьев древесных пород в условиях естественной ферментации под водой показала, что для большинства образцов содержание СН (алканов) групп увеличивается у ферментированных образцов по сравнению с неферментированными. В результате биodeградации уменьшается содержание –ОН и С=С групп. Практически не изменяется количество карбонильных групп. Значительно увеличивается количество нитросоединений при биodeградации.

Библиографический список

1. Анохина Н. А. Биогенные углеводороды в почвах парковых зон города Москвы // дисс...канд. биол. наук. Москва 2020. 124с.
2. Брель А. К. Спектральные методы анализа органических соединений [Текст] Брель А. К., Василькова Е. А., Ниязов Л. Н., Хайдаров А. А., Ахмедов В. Н. - Бухара: Издательство “Durdona”, 2019. 105 с.
3. Вшивкова Т. С., Иваненко Н. В., Якименко Л. В., Дроздов К. А. Введение в биомониторинг пресных вод // Учебное пособие Редактор М.А. Шкарубо Владивосток Издательство ВГУЭС. 2019. 241 с.
4. Дучко М. А., Гулая Е. В., Серебренникова О. В., Стрельникова Е. Б., Прейс Ю. И. Распределение n-алканов, стероидов и тритерпеноидов в торфе и растениях болота Тёмное // Известия Томского политехнического университета. 2013. Т. 323. № 1 С.40-44.
5. Киселева А. А. Палеореконструкция условий и источников вещества углеобразования // Проблемы геологии и освоения недр с. 47-48. Available from: <https://core.ac.uk/download/pdf/132418741.pdf>

6. Миндубаев А.З. Биодegradация? Нет, биосинтез // Национальные приоритеты России. 2021. № 4 (43) С. 89-102.
7. Ситникова В. Е. Практикум по колебательной спектроскопии: Учебное пособие / Т.Н. Носенко, В.Е. Ситникова, И.Е. Стрельникова, М.И. Фокина– СПб: Университет ИТМО, 2021. 173 с.
8. Тарасевич Б. Н. ИК спектры основных классов органических соединений. Справочные материалы. Москва. 2012. 54с.
9. Gessner M. O. et al. (Mark O. Gessner, Christopher M. Swan, Christian K. Dang, Brendan G. McKie, Richard D. Bardgett, Diana H. Wall, Stephan Hättenschwiler Diversity meets decomposition // Trends Ecol. Evol. 2010. V. 25, I 6 P. 372–380.
10. Gustavo H. Migliorini, Gustavo Q. Romero Warming and leaf litter functional diversity, not litter quality, drive decomposition in a freshwater ecosystem // Scientific Reports | 2020 11p 10:20333 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77382-7> www.nature.com/scientificreports.
11. Available from: [11.https://studopedia.ru/1_121325_vosstanovlenie-nitratnogo-azota-v-rastenyah.html?ysclid=ly9y8nb9fi299070666/](https://studopedia.ru/1_121325_vosstanovlenie-nitratnogo-azota-v-rastenyah.html?ysclid=ly9y8nb9fi299070666/)

УДК 676.157

БЕЗНОЖЕВОЙ РАЗМОЛ ВОЛОКНИСТОГО ПОЛУФАБРИКАТА ИЗ ОДНОЛЕТНИХ РАСТЕНИЙ В ЦЕЛЛЮЛОЗНО-БУМАЖНОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

М.М. Литвинова, Р.А. Марченко, Ю.Д. Алашкевич

*Сибирский государственный университет науки и технологий им. М.Ф. Решетнёва,
Красноярск, Россия*

Жизнеспособность технической конопли основана на ее положительных физических и механических свойствах при переработке в готовую продукцию. Это особенно важно при рассмотрении вопроса об использовании методов безножевого размол для обработки волокнистых полуфабрикатов из технической конопли. Уникальные свойства волокон технической конопли в сочетании с преимуществами технологии безножевого размол обладают потенциалом для создания инновационных и устойчивых решений в целлюлозно-бумажном производстве. Используя преимущества, присущие технической конопле в качестве сырья, и оптимизируя методы переработки, можно снизить зависимость от традиционных древесных ресурсов.

Ключевые слова: размол технической конопли, техническая конопля, безножевой размол.

KNIFE-FREE GRINDING OF FIBROUS SEMI-FINISHED PRODUCTS FROM ANNUAL PLANTS IN PULP AND PAPER PRODUCTION

M.M. Litvinova, R.A. Marchenko, Y.D. Alashkevich

Reshetnev Siberian State University of Science and Technology, Krasnoyarsk, Russia

The viability of using cannabis for technical purposes is based on the positive physical and mechanical characteristics of the plant when processed into finished products. This becomes especially significant when considering the utilization of knife-free grinding techniques for processing fibrous semi-finished products from industrial hemp. The distinct features of industrial hemp fibers, in conjunction with the benefits of knife-free milling techniques, have the capacity to generate innovative and environmentally friendly solutions in the pulp and paper manufacturing industry. By leveraging the inherent advantages of industrial hemp as a raw material and optimizing manufacturing processes, it is feasible to reduce reliance on traditional wood-based resources.

Keywords: grinding of technical hemp, technical hemp, non-knife grinding.

Производство целлюлозы и бумаги из волокнистых полуфабрикатов, в значительной степени зависит от эффективного процесса размол для получения качественной готовой продукцией. Традиционно этот процесс включает использование ножей для резки, дробления, расчесывания и отделения волокон [1]. Однако использование ножей сопряжено с такими проблемами, как более короткие волокна, которые впоследствии не дают возможность вторичной обработки волокон. Для устранения этих ограничений в качестве инновационной альтернативы появилась концепция размол без использования ножей. По сравнению с ножевым размол, безножевой размол обеспечивает более деликатный и щадящий режим обработки, что особенно выгодно для волокон, которые уже подверглись ножевому размолу. Следовательно, наряду с достижениями в области ножевых машин большое значение имеют исследования в области методов безножевого размол. Все способы и устройства для безножевого размол волокнистых материалов, основаны на явлениях, происходящих в жидкостях и являющихся результатом гидродинамических факторов. В этих машинах обработка волокнистых материалов обычно включает в себя комбинацию различных физических воздействий, которые можно разделить на четыре основные категории [2,3]:

1. Ударное воздействие: вызвано быстрым перемещением волокон относительно друг друга и твердых частей устройства.

2. Эффект кавитации: Он возникает в результате образования, расширения и схлопывания кавитационных пузырьков в жидкости при определенных условиях и их взаимодействия с волокнистым материалом.

3. Пульсационное воздействие: это происходит из-за попеременного повышения и понижения гидравлического давления во взвешенной массе и тесно связано с распространением волн давления и разрежений в жидкости. В некоторых случаях этот эффект называют "акустическим ударом", а не "пульсацией".

4. Силы трения, обусловленные вязкостью и градиентом скорости движущейся жидкости.

В зависимости от принципа действия и типа используемого ударного воздействия оборудование для безножевого размола можно разделить на следующие категории:

- Роторно-пульсационные системы, которые включают в себя измельчители, волокнообразователи, супратонаторы и импульсные мельницы. В этих системах преобладают вращательные и пульсационные удары.

- Струйно-барьерные машины, которые оснащены неподвижным и подвижным барьером, используемым для размола.

- Кавитационные устройства, такие как кавитационные гидродинамические трубки.

- Акустическое оборудование, включая струйные пластинчатые устройства (гидродинамические акустические генераторы), электрогидравлические генераторы и системы, генерирующие гидравлический удар, а также пьезо- и магнитострикционные излучатели.

В исследованиях, проведенных Ю.Д. Алашкевичем и его учениками, продемонстрированы заметные изменения в потоке струи из сопла, зависящие от диаметра сопла и силы удара струи о преграду. Полученные результаты показывают, что взаимодействие между струей и препятствием вызывает явления кавитации. В целлюлозно-бумажном производстве большое значение имеет не только технология размола, но и выбор сырья. Древесина хвойных пород традиционно используется в качестве сырья для производства из-за ее длинных волокон, которые необходимы для изготовления бумажных листов. В связи со значительным расширением производства готовой продукции целлюлозно-бумажного производства появилась необходимость изыскания других видов сырья, отличающиеся краткосрочным созреванием.

Однолетние растения включают в себя широкий спектр видов, таких как солома, тростник, подсолнечник и техническая конопля. Среди этих однолетних растений техническая конопля выделяется как особенно перспективное сырье для наших целей. Техническая конопля — это травянистое растение, которое может достигать 1-6 метров в высоту, в зависимости от таких факторов, как генетическая изменчивость, условия окружающей среды и методы ведения сельского хозяйства. В процессе роста у этого вида развиваются прочные, деревянистые стебли диаметром от 2,5 до 5 сантиметров. Помимо использования в целлюлозно-бумажном производстве, техническая конопля демонстрирует удивительную универсальность для различных промышленных применений [4]. Стебель технической конопли состоит из двух основных компонентов: внутренней сердцевины, которая составляет примерно 65-75% от общей структуры стебля и известна как "древесная часть" или "костра". Эта древесная часть содержит примерно 40-48% целлюлозы и значительное количество лигнина (примерно 20%), аналогичного тому, который содержится в древесине твердых пород. Внешний компонент, называемый волокнистой частью, составляет оставшуюся часть стебля и содержит приблизительно 62,4% целлюлозы при сравнительно более низком содержании лигнина (около 5-7%) [5]. Этот уникальный состав подчеркивает потенциал технической конопли как ценного источника целлюлозы для различных промышленных применений, таких как целлюлозно-бумажное производство, и обещает создание экологически чистых и устойчивых производственных процессов. При анализе характеристик волокнистого полуфабриката, получаемого из технической конопли, следует отметить его повышенную прочность. В частности, выделяется его высокая прочность на разрыв. Кроме того, годовой цикл роста конопли обеспечивает ее легкодоступным сырьем, что отличает ее от других источников на основе древесины. Потенциал для производства бумаги и последующей переработки зависит от длины

волокна. Более длинные волокна из технической конопли обладают способностью эффективно удваивать объем технологических циклов по сравнению с теми, которые основаны на материалах на основе древесины [6].

В Сибирском государственном университете науки и технологий им. М.Ф. Решетнёва на кафедре Машин и аппаратов промышленных технологий были проведены исследования по переработке волокон технической конопли. Первоначальная подготовка включала в себя измельчение лубяной части стебля конопли. Учитывая, что волокна технической конопли имеют длину от 2 до 4 метров, перед дальнейшей обработкой их необходимо предварительно измельчить. Следовательно, начальная фаза процесса включала в себя этап предварительного измельчения с использованием дробилки-дезинтегратора «Рекорд». Последующий этап включал размол обработанного материала с использованием безножевой установки типа «Струя-преграда» [7]. Этот эксперимент проводился при давлении в рабочем цилиндре 12 МПа. Устройство оснащалось соплом с внутренним диаметром 2 мм, предназначенным для распыления струи волокнистой суспензии на преграду, при этом струя суспензии выбрасывалась со скоростью 130 м/с. Для сравнения качественных и количественных показателей при размолу использовали три вида концентрации суспензии: 0,5; 1; 1,5 %.

На рис. 1 показана зависимость степени помола от времени размолу по шкале Шоппер-Риглера.

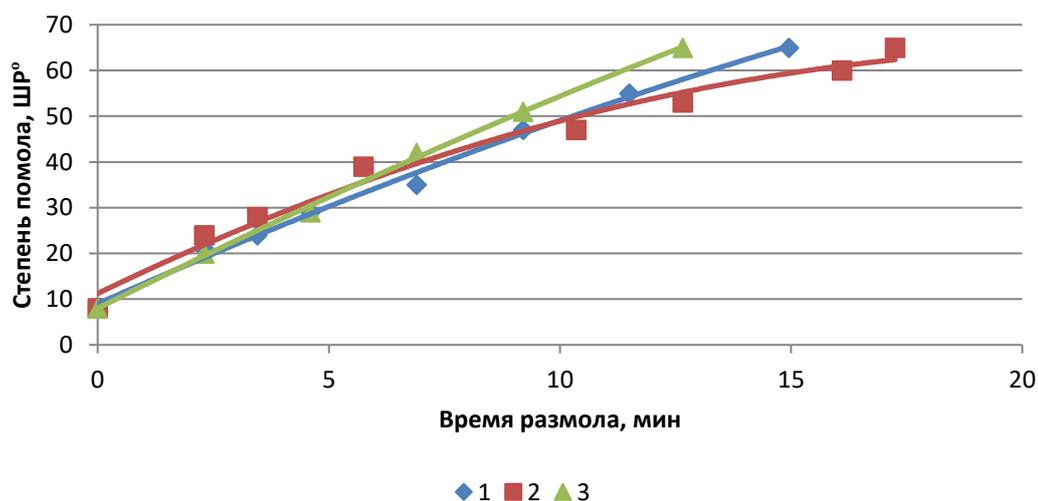


Рисунок 1. Зависимость степени помола по школе Шоппер-Риглера от времени размолу
1 – Размол технической конопли при концентрации 1%; 2 – Размол технической конопли при концентрации 1,5%; 3 – Размол технической конопли при концентрации 0,5%

Для всех случаев размолу, согласно, рисунку имеет место изменения, как качественных, так и количественных зависимостей. Не зависимо от условий размолу и вида полуфабриката, наблюдается, рост времени обработки волокна, что, в конечном счете, может отразиться на производительности размольной установки. Качественные характеристики процесса размолу в виде параболы, наблюдается при концентрации 1,5%. При концентрации 1% и 0,5% качественные характеристики представлены в виде линейной зависимости. Не зависимо от вида размалываемого полуфабриката при безножевом размолу количественные зависимости очень близки друг к другу. Ю.П. Лосева в своей работе определила, что с увеличением концентрации суспензии, эффект кавитации снижется [8]. Графические данные, приведённые выше подтверждают эти представления, с увеличением концентрации суспензии интенсивность её размолу снижется. Это объясняется тем, что при низкой концентрации суспензии происходит более активное воздействие кавитационных факторов.

На рис. 2 представлены зависимости разрывной длины готовых изделий от степени помола при различных концентрациях.

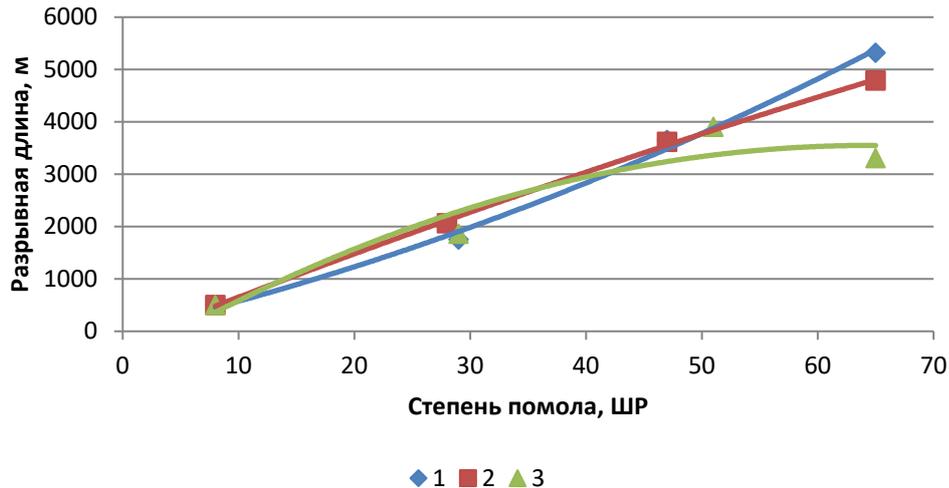


Рисунок 2. Зависимость показателя разрывной длины готовых изделий от степени помола по шкале Шоппер-Риглера. 1 – Размол технической конопли при концентрации 1%; 2 – Размол технической конопли при концентрации 1,5%; 3 – Размол технической конопли при концентрации 0,5%

Зависимости имеют параболический характер, однако, количественные характеристики отличаются. Наибольшие прочностные характеристики достигаются при размоле волокнистой суспензии с концентрацией 1%. Также из рисунка видно, что суспензия с концентрацией 0,5% превосходит по показателям разрывной длины отливки, полученной при размолу с высокой концентрацией, однако, при достижении 40° ШР, показатель разрывной длины начинает снижаться. И далее наилучшим показателем разрывной длины оказывается зависимость с высокой концентрацией (1,5%), который снижается при достижении 50 ° ШР.

На рисунке 3 представлена зависимость показателя сопротивления раздиранию от степени помола при различных концентрациях суспензии.

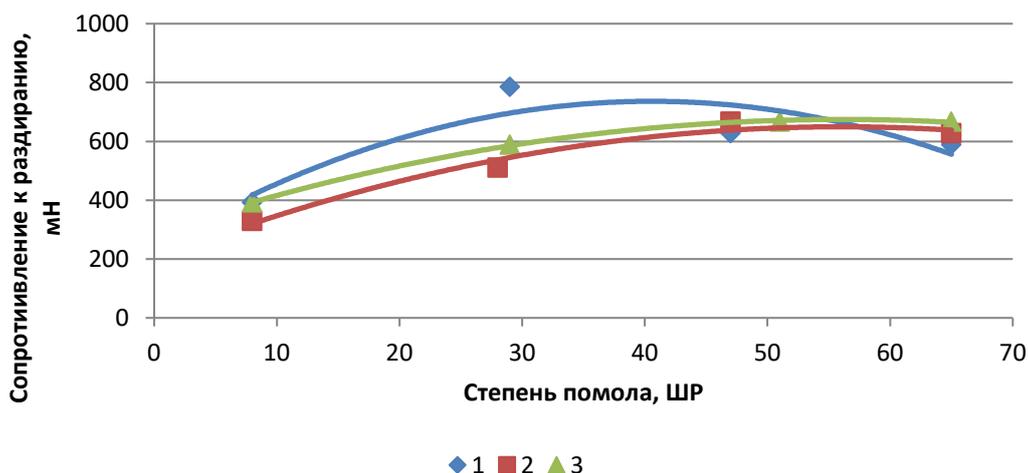


Рисунок 3 – Зависимость показателя сопротивления раздиранию готовых изделий от степени помола по шкале Шоппер-Риглера. 1 – Размол технической конопли при концентрации 1%; 2 – Размол технической конопли при концентрации 1,5%; 3 – Размол технической конопли при концентрации 0,5%

Готовые изделия, полученные из суспензии с концентрацией 1,5% имеет более низкий показатель сопротивления раздиранию, тогда как при размолу суспензии с концентрацией 1 % удается достичь значений более 700 мН для материала, которые не подвергался химической обработки. Аналогично с показателями разрывной длины наибольшее значение показателя сопротивлению раздиранию достигается при размолу суспензии с концентрацией 1%. Таким

образом размол суспензии с концентрацией 1% является наиболее предпочтительным способом обработки волокон при помощи безножевой установки типа «Струя-преграда».

Библиографический список

1. Корда, Ж. Размол бумажной массы / Ж. Корда, З. Либнар, Ю. Прокоп. – М.: Лесная промышленность, 1967. – 421 с.
2. Алашкевич, Ю. Д. Основы теории гидродинамической обработки волокнистых материалов в размольных машинах [Текст]: дис. ... док.техн. наук: 05.21.03 / Ю. Д. Алашкевич. – Красноярск, 1987. – 361 с.
3. Марченко Роман Александрович. Интенсификация безножевого размола волокнистых полуфабрикатов в целлюлозно-бумажном производстве: диссертация ... кандидата Технические наук: 05.21.03 / Марченко Роман Александрович; [Место защиты: Сибирский государственный технологический университет], 2016.- 161 с.
4. Влияние концентрации волокнистой массы из технической конопли на физико-механические характеристики готовой продукции / А. А. Карелина, Ю. Д. Алашкевич, В. А. Кожухов, К. А. Хохлов // Проблемы механики целлюлозно-бумажных материалов : Материалы VII Международной научно-технической конференции имени профессора В.И. Комарова, Архангельск, 14–16 сентября 2023 года / Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова».
5. Koren A., Sikora V., Kiproviski B., Brdar-Jokanovic M., Acimovic M., Konstantinovic B.; Latkovic, D. Controversial taxonomy of hemp. *Genetika* 2020, 52, 203–212.
6. J. Fike, Industrial hemp: renewed opportunities for an ancient crop, *Crit. Rev. Plant Sci.* 35 (2016) 406–424, <https://doi.org/10.1080/07352689.2016.1257842>.
7. Патент № 2363792 С1 Российская Федерация, МПК D21C 1/00. установка для измельчения волокнистого материала: № 2008119775/12: заявл. 19.05.2008: опубл. 10.08.2009 / Ю. Д. Алашкевич, В. И. Ковалев, А. И. Невзоров, Р. А. Марченко; заявитель Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Сибирский государственный технологический университет".
8. Лосева Ю.П. Использование электрогидравлического эффекта в бумажной промышленности // Бум. пром-сть. – 1957. - №9. – с. 8-9.

УДК 630.8+606+582.28

БИОКОНВЕРСИЯ КОРЫ ХВОЙНЫХ ГРИБАМИ РОДА TRICHODERMA

О.О. Мамаева, Е.В. Исаева, В.С. Федоров

Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика М. Ф. Решетнева, Красноярск, Россия

В данной работе представлены результаты изучения влияния способов предварительной подготовки коры хвойных пород на степень биоконверсии. В качестве биодеструкторов использовали микроскопические грибы рода *Trichoderma*. Предподготовку проводили с помощью экстракции моноэтаноламином и гидродинамической активации.

Ключевые слова: биоконверсия, кора, субстрат, экстракция, гидродинамическая активация, *Trichoderma*, компонентный состав

BIOCONVERSION OF CONIFEROUS BARK BY FUNGI OF THE GENUS TRICHODERMA

O.O. Mamaeva, E.V. Isaeva, V.S. Fedorov

Reshetnev Siberian State University of Science and Technology, Krasnoyarsk, Russian Federation

The results of this work present methods for pre-preparing the bark of double rocks at the level of bioconversion. Microscopic fungi of the genus *Trichoderma* are used as biodestructors. Pre-preparation of technology using extraction with monoethanolamine and hydrodynamic activation.

Keywords: bioconversion, bark, substrate, extraction, hydrodynamic activation, *Trichoderma*, component composition.

Кора является крупнотоннажным отходом деревоперерабатывающих производств (10-14 % от общего поступившего объема чистой древесины, что более 100 тысяч м³ в год) [1, 2]. Следовательно, кора – это важный компонент вторичного сырья и может использоваться в разных областях народного хозяйства. В коре содержится значительное количество органических веществ, что делает ее ценным удобрением для сельского хозяйства и садоводства [3]. Данный вид отхода используют в качестве природного материала для мульчирования почвы, что помогает сохранить влагу, предотвращает рост сорняков и защищает растения от перепадов температур. Также кору используют в производстве биотоплива и других энергетических ресурсов. Кора может быть переработана и использована, например, для производства древесно-полимерных композитов или других строительных материалов [4, 5].

На сегодняшний день показана растущая популярность не только химической обработки коры и получения из нее различных соединений, но и микробиологической переработки, что указывает на перспективность ее применения как уникального природного материала и возобновляемого ресурса [4, 6-8].

Важными компонентами коры являются экстрактивные вещества, содержание которых достигает 20 %, в частности дубильные вещества. Основными компонентами дубильных веществ являются таннины. Кроме того, в составе коры различных древесных пород обнаружены терпеноиды, эфиры терпеноидов, тритерпеновые спирты, эфирные масла, стерины, терпены, сесквитерпены, флавоноиды, сложные эфиры жирных кислот, липиды, фенолы, углеводы, сапонины, гидроксикумарины, стильбеноиды, нецеллюлозные моносахариды (арабиноза, ксилоза, манноза) и многие другие вещества [4]. Поэтому для более глубокой переработки коры методом биоконверсии целесообразно проводить предподготовку, с помощью которой удаляют

экстрактивные вещества (имеющие самостоятельное применение), тем самым повышают реакционную способность коры, степень утилизации сырья и выход целевого продукта [9].

Целью данной работы было изучение влияния способов подготовки коры на степень биоконверсии грибами рода *Trichoderma*.

Сырьем для биоконверсии служили отходы деревоперерабатывающего завода г. Торжка (смесь коры хвойных пород). Размер фракций исходной коры составлял 7-10 мм.

В работе использовали следующие субстраты на основе коры:

- без предварительной подготовки (субстрат 1);
- после экстракции 1 %-м раствором моноэтаноламина (МЭА) в течение 5 ч с целью извлечения веществ, обладающих дубящими свойствами (субстрат 2);
- после гидродинамической активации в течение 30 мин в водной среде на кавитационном гидроударном диспергаторе (радиус ротора 277 мм, частота вращения 3000 об/мин, производительность 25 м³/ч, содержание сухих веществ в суспензии – до 10 % по массе) (субстрат 3);
- после последовательной экстрагирования 1 %-м МЭА в течение 5 ч и гидродинамической активации в водной среде в течение 30 мин (субстрат 4) [9].

Для обогащения субстратов биогенными элементами вводили соли (NH₄)₂SO₄ (1,0 г/л) и Na₂HPO₄ (0,5 г/л). Влажность сырья составляла 65-70 %. Далее сырье подвергали глубокой стерилизации при 0,1 МПа несколько раз с интервалом в 24 ч.

В качестве биодеструктора использовали штамм К6-15 *Trichoderma* spp. В последнее время появилась тенденция применения микроскопических грибов рода *Trichoderma* spp. в качестве основы биопрепаратов для эффективной трансформации содержащих лигноцеллюлозу растительных полимеров в компоненты гумуса [10].

Засев субстратов осуществляли споровой суспензией гриба с титром 1·10⁶ спор/г абсолютно сухой массы сырья. Посевы инкубировали в термостате при (28±2) °С в течение 19 сут. Расчеты титра спор и убыли массы описаны в работе [9]. Компонентный состав исходной и биодеструктированной коры определяли по методикам, принятым в химии растительного сырья [11]. Экстрактивные вещества выделяли с помощью последовательной 3-часовой экстракции горячей водой (жидкостный модуль 1:50) и этиловым спиртом (жидкостный модуль 1:20).

О степени конвертируемости субстрата можно судить по результатам, представленным в таблице 1.

Таблица 1

Компонентный состав субстратов до и после биоконверсии (БК)

Компонент	Содержание, % а.с.с.							
	субстрат 1		субстрат 2		субстрат 3		субстрат 4	
	до БК	после БК	до БК	после БК	до БК	после БК	до БК	после БК
Вещества, экстрагируемые горячей водой	9,84	$\frac{5,10}{4,71}$	6,25	$\frac{3,71}{2,41}$	3,73	$\frac{4,32}{4,07}$	2,34	$\frac{3,44}{3,00}$
Вещества, экстрагируемые этиловым спиртом	6,56	$\frac{8,33}{7,69}$	3,42	$\frac{6,28}{4,08}$	4,91	$\frac{3,76}{3,54}$	7,91	$\frac{4,74}{4,14}$
Легкогидролизуемые полисахариды	15,15	$\frac{11,69}{10,79}$	15,44	$\frac{11,59}{7,53}$	16,98	$\frac{12,05}{11,34}$	17,73	$\frac{10,44}{9,11}$
Трудногидролизуемые полисахариды	21,99	$\frac{17,01}{15,70}$	26,29	$\frac{16,88}{10,97}$	23,15	$\frac{21,23}{19,98}$	25,19	$\frac{18,02}{15,73}$
Лигниновые вещества	25,18	$\frac{31,79}{29,34}$	24,94	$\frac{36,69}{23,85}$	27,45	$\frac{32,61}{30,69}$	29,09	$\frac{31,03}{27,09}$

Примечание. В числителе данные без учета убыли массы, в знаменателе указаны данные с учетом убыли массы; относительная стандартная ошибка опыта не превышает 5 %.

Для сравнения химического состава исходных субстратов производили пересчет полученных данных с учетом коэффициента убыли массы для каждого образца в процессе культивирования гриба. Количество каждого компонента, входящего в состав субстрата, рассчитано на единицу абсолютно сухого остатка. Установлено, что максимальную субстратразрушающую активность гриб проявил на субстратах 2 и 4, при этом убыль массы составила 25 и 14 % соответственно. Для субстратов 1 и 3 убыль массы составляет порядка 7 % [9].

Полученные данные в ходе изучения компонентного состава субстратов до и после биоконверсии свидетельствуют о том, что культивирование K6-15 *Trichoderma* spp. приводит к изменению содержания всех компонентов субстратов. На рис. 1 наглядно показана степень утилизации суммы экстрактивных веществ, полисахаридов и лигнинных веществ.

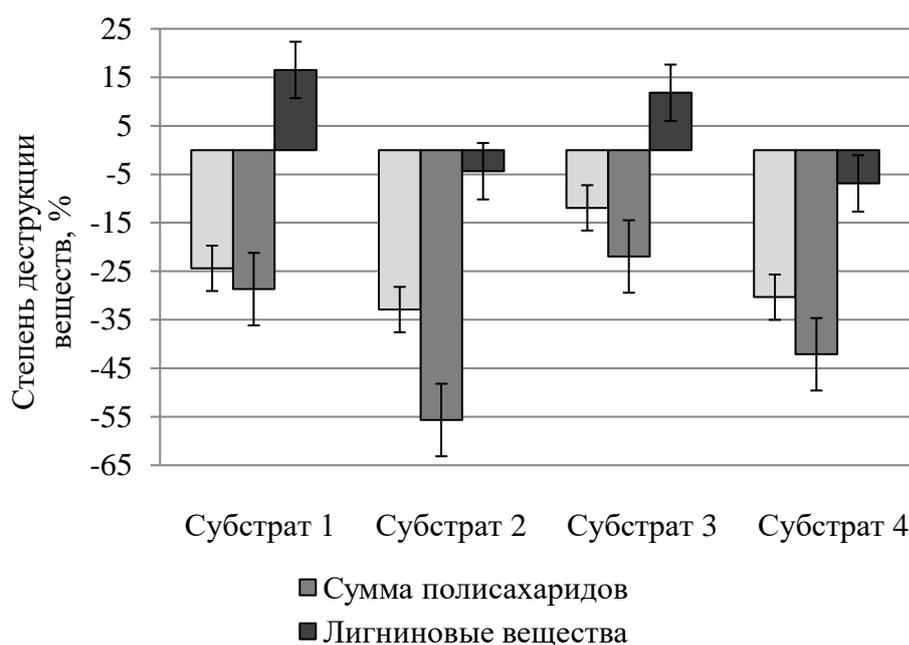


Рис. 1. Степень деструкции основных групп веществ компонентного состава коры

Установлено, что в процессе биоконверсии происходит снижение большей части суммы полисахаридов (от 22 до 56 %) за счет способности грибов рода *Trichoderma* образовывать целлюлолитические ферменты. Более глубокая их трансформация зафиксирована на субстрате 2 (кора после экстракции МЭА), причем утилизация как легко-, так и трудногидролизуемых полисахаридов происходит с одинаковой степенью (на 52-58 %). Следует отметить, что на данном субстрате зафиксировано максимальное спорообразование ($1,35 \cdot 10^9$ спор/г на 19 сут культивирования). На коре после экстракции МЭА и гидродинамической активации (субстрат 4) сумма полисахаридов уменьшилась на 42 % (легкогидролизуемые – на 49 %, трудногидролизуемые – на 38 %). При этом титр спор составляет порядка $0,7 \cdot 10^9$ спор/г. Наименьшее снижение полисахаридов (на 22 %) отмечено на субстрате 3 (кора после гидродинамической активации) в основном за счет деструкции легкогидролизуемой части (до 33 %). Конверсия целлюлозы не превысила 14 %.

Известно, что грибы рода *Trichoderma* являются продуцентами лигнолитических ферментов [12]. Установлено, что в процессе биоконверсии на субстратах 2 и 4 содержание этой группы веществ снизилось на 4 и 7 % соответственно. На других субстратах отмечено увеличение доли лигнинных веществ вследствие перераспределения компонентного состава.

Следует отметить, что в результате биоконверсии происходит также утилизация наиболее доступной для грибов группы экстрактивных веществ. Результаты показали, что в процессе биотрансформации субстратов происходит снижение содержания экстрактивных веществ на 12-33 %. Причем на субстратах 1 и 2 это вызвано уменьшением доли водорастворимых веществ. Максимальное их снижение зафиксировано на субстрате 2 (до 61 %) по сравнению с исходным

субстратом. При использовании в качестве предподготовки гидродинамической активации (субстрат 3), а также последовательной экстракции 1 %-м раствором МЭА и гидродинамической активации (субстрат 4) снижение содержания этой группы веществ происходит за счет спирторастворимых соединений (на 28 и 48 % соответственно, в сравнении с исходным субстратом).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что кора, обработанная 1 %-м раствором моноэтаноламина в течение 5 ч, является наиболее благоприятным субстратом для развития К6-15 *Trichoderma* spp. Биоконверсия (микробиологическая утилизация) данного субстрата происходит на 25 % (что в 2-4 раза выше, чем при использовании других методов предподготовки). Конверсия происходит за счет деструкции основных групп экстрактивных веществ (до 33 %) и лигноуглеводного комплекса (до 36 %).

Библиографический список

1. Переработка и использование древесной коры / ЛеспромИнформ. URL: <https://lesprominform.ru/jarticles.html?id=2640> (дата обращения: 22.05.2024).
2. Fedorov V.S., Ryazanova T.V. Bark of Siberian Conifers: Composition, Use, and Processing to Extract Tannin. *Forests* 2021, 12, 1043. <https://doi.org/10.3390/f12081043>.
3. Изотов Д. В. Биоактивные компоненты из древесной коры и торфа, специальные химические реагенты и лекарственные средства: от инновации к применению // Инновации и технологии в лесном хозяйстве: материалы междунар. науч.-практ. конф. Санкт-Петербург: Федеральное бюджетное учреждение «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт лесного хозяйства», 2011. С. 45-47.
4. Пастори З., Горбачева Г. А., Санаев В. Г. и др. Состояние и перспективы использования древесной коры. *Лесной вестник. Forestry Bulletin*, 2020. Т. 24, № 5. С. 74-88. DOI 10.18698/2542-1468-2020-5-74-88.
5. Колосова, А. С., Пикалов Е. С. Современные эффективные теплоизоляционные материалы на основе древесного сырья // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*, 2021. № 3. С. 66-77.
6. Исаева Е. В., Харченко А. И., Мамаева О. О. и др. Конверсия коры хвойных грибами *Pleurotus pulmonaris* // Решетневские чтения : материалы XXVII Междунар. науч.-практ. конф., посвященной памяти генерального конструктора ракетно-космических систем академика М.Ф. Решетнева. Красноярск: Сибирский государственный университет науки и технологий им. акад. М.Ф. Решетнева, 2023. С. 808-810.
7. Федоров, В. С., Рязанова Т. В., Мамаева О. О. Биоконверсия как способ утилизации древесных отходов сосны обыкновенной *Pinus Sylvestris* // Решетневские чтения: материалы XXVI Междунар. науч.-практ. конф., посвященной памяти генерального конструктора ракетно-космических систем академика М. Ф. Решетнева. Красноярск: Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика М.Ф. Решетнева, 2022. С. 850-852.
8. Рязанова, Т. В., Чупрова Н. А., Лунева Т. А. Воздействие гриба рода *Trichoderma* на лигнин коры древесных пород // *Катализ в промышленности*, 2014. № 6. С. 64-70.
9. Мамаева, О. О., Исаева Е. В. Влияние предподготовки коры хвойных на спорообразование грибов рода *Trichoderma* // *Леса России: политика, промышленность, наука, образование: материалы VIII Всерос. науч.-техн. конф.* Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени С.М. Кирова, 2023. С. 475-477.
10. Zhang F., Huo Y., Cobb A.B. et al. *Trichoderma* biofertilizer links to altered soil chemistry, altered microbial communities, and improved grassland biomass // *Frontiers in Microbiology*. 2018 V. 9 P. 1–11. doi:10.3389/fmicb.2018.00848/
11. Рязанова Т.В., Чупрова Н.А., Исаева Е.В. Химия древесины. Красноярск: СибГТУ, 2012. 358 с.
12. Кочерова, А. В. Скрининг микромицетов – продуцентов лигнинолитических продуцентов ферментов // *Молодые ученые в решении актуальных проблем науки: сб. ст. всерос. науч.-практ. конф.* Красноярск: СибГТУ, 2013. Т. 2. С. 49-50.

УДК 577.114

ИЗУЧЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛА ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ В ПРОДУКТАХ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА: МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ И СВОЙСТВА ПЕКТИНА

Р.М. Одилова, Е.Н. Нуруллина, А.В. Броднева

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

ктины – это природные полисахариды, добываемые из растительного сырья, такого как яблоки, цитрусовые, свекла и другие фрукты и овощи. Они обладают ценными функциональными свойствами, включая способность образовывать гели, регулировать вязкость, связывать металлы и улучшать усвоение питательных веществ. Изучение пектинов из сельскохозяйственных продуктов открывает новые возможности для их использования в различных сферах, способствуя развитию устойчивого сельского хозяйства и созданию новых продуктов и технологий. Методом кислотного экстрагирования получены образцы пектинов из продуктов сельского хозяйства: картофеля и семян тыквы. Изучено влияние кислотности и природы гидролизующего агента на выход пектина. Показано, что выделенные из нетрадиционного сырья пектины не уступают традиционному яблочному. Наилучшие результаты получены из семян тыквы. Анализ диаграмм TGA/DTG позволил судить о минимальном наличии остаточных растворителей в полученных продуктах.

Ключевые слова: пектиновые вещества, пектин, сельское хозяйство, гидролиз, экстракция.

STUDY OF THE POTENTIAL OF PECTIN SUBSTANCES IN AGRICULTURAL PRODUCTS: METHODS OF PRODUCTION AND PROPERTIES OF PECTIN

R.M. Odilova, E.N. Nurullina, A.V. Brodneva

Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia

Pectins are natural polysaccharides extracted from plant material such as apples, citrus fruits, beets and other fruits and vegetables. They have valuable functional properties including the ability to form gels, regulate viscosity, bind metals, and improve nutrient absorption. The study of pectins from agricultural products opens new opportunities for their utilization in various applications, contributing to the development of sustainable agriculture and the creation of new products and technologies. Pectin samples from agricultural products: potato and pumpkin seeds were obtained by acid extraction method. The influence of acidity and nature of hydrolyzing agent on pectin yield was studied. It is shown that pectins isolated from non-traditional raw materials are not inferior to traditional apple pectin. The best results were obtained from pumpkin seeds. The analysis of TGA/DTG diagrams allowed to judge about the minimal presence of residual solvents in the obtained products.

Keywords: pectin substances, pectin, agriculture, hydrolysis, extraction.

Введение

Пектин - представляет собой семейство сложных полисахаридов, которые находятся в клеточных стенках растений и выполняют функцию “цемента”, связывающего клетки. [1] Его молекула была впервые выделена в 1790 году французским химиком Луи Николя Вокленом.

Различают четыре типа пектиновых веществ: протопектин, пектиновая кислота, соли пектиновой кислоты - пектаты и пектин. [2]

Коммерческий пектин получают в основном из сельскохозяйственных продуктов. Он состоит преимущественно из пектина со следами пектиновой кислоты.

Благодаря уникальным свойствам, возможная область применения пектинов обширна и включает в себя производство пищевых продуктов (например, желированных конфет, джемов, мармеладов), фармацевтическую промышленность (для создания лекарственных форм), косметическую индустрию (в производстве кремов, масок, шампуней), текстильную промышленность (для улучшения свойств тканей) и т.д. [3-4]

К основным способам извлечения пектина из растительного сырья с помощью которых получают три вида пектина: низкоэтерифицированный, высокоэтерифицированный и амидированный относятся химический способ, экстракция и ферментация. [5-7]

В настоящее время в Российской Федерации пектин не производят, отечественные компании являются дистрибьютерами или торговыми представителями ведущих зарубежных производителей, а объёмы импорта пектина в нашей стране составляют в среднем 4,5 тыс. т., в связи с чем исследования в данной области весьма актуальны.

Целью работы являлось изучение процесса выделения пектина из продуктов растительного происхождения, а также оптимизация этого процесса и изучение физико-химические свойства полученного продукта.

Методы и методики проводимых исследований

В данной статье для получения пектина в качестве растительного сырья использовали – картофель и семена тыквы. Синтез и исследование свойств полученных пектинов проводили на основе методик "ГОСТ 29186-91. Межгосударственный стандарт. Пектин. Технические условия"

Для синтеза пектина была применена стратегия «сверху вниз» данный подход основан на идее синтеза молекулярных компонентов, которые затем объединяются и реагируют между собой для образования целевого продукта.

Основные этапы синтеза, заключались в следующем: сушка сырья; измельчение; проведение мягкого гидролиза; отделение твердой фракции; этерификация; фильтрация, сушка и измельчение целевого продукта. Этап мягкого гидролиза проводили при следующих параметрах: на протяжении двух, трех и четырех часов при температуре 80°C сырье нагревали в кислотной среде. В качестве кислот использовали соляную и лимонную кислоты. Далее с помощью фильтровальной сетки отделяли жидкую фракцию от твердой. [8]

Экстракция осуществлялась следующим образом: жидкую фракцию, полученную после гидролизата, упаривали в 2 раза, затем добавляли 96%-этиловый спирт в соотношении 1:1,5. В результате образовывались хлопья пектина. С помощью вакуумного фильтрования смесь разделяли. Осадок сушили в термошкафу и полученный целевой продукт измельчали (табл. 1).

Таблица 1

Сводная таблица экспериментальных данных

Сырье	Гидролизующая кислота	Время гидролиза, ч	Гидролиз							Целевой продукт	
			pH	V жидкости	m твердой фракции	Мутность	Цвет	Сухой вес, %	PВ, %	m пектина, г	Выход пектина в расчете на вес сырья, %
Картофель	HCl	2	1,62	7	5,42	0	3	1,66	1,23	0,03	1,5
		3	1,28	10	4,14	1	1	1,19	1,64	0,05	2,5
		4	3,683	11,5	6,09	2	1	0,5	1,71	0,05	2,5
	C ₆ H ₈ O ₇	2	3,25	11	0,91	1	1	1,16	1,21	0,01	0,5
		3	3,13	10	5,05	4	1	1,06	1,41	0,02	1
		4	3,15	10,5	6,22	3	2	0,92	1,43	0,02	1
Семена тыквы	HCl	2	1,42	15,5	2,58	1	4	1,31	1,91	0,08	4
		3	1,33	16	3,19	4	4	0,5	2,62	0,09	4,5
		4	1,905	17	2,99	5	5	0,89	2,7	0,09	4,5
	C ₆ H ₈ O ₇	2	3,16	15	3,64	1	3	0,27	1,8	0,06	3
		3	2,91	13	3,67	2	2	0,5	1,8	0,07	3,5
		4	2,996	15	3,73	5	2	0,4	1,93	0,08	4

Образцы полученного целевого продукта были проанализированы с помощью TGA/DTG методов - это два подхода, которые совместно применяются для исследования свойств материалов. Диаграммы представлены на рис. 1 и 2.

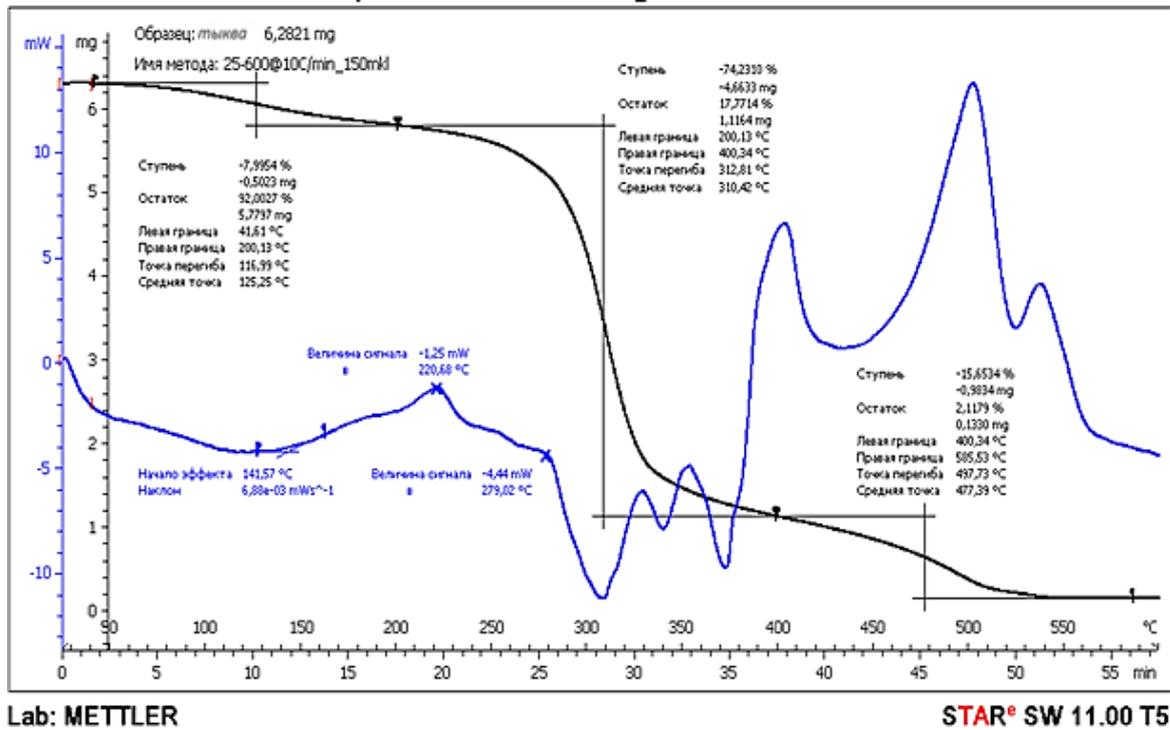


Рисунок 1. TGA/DSC - анализ пектина из тыквы

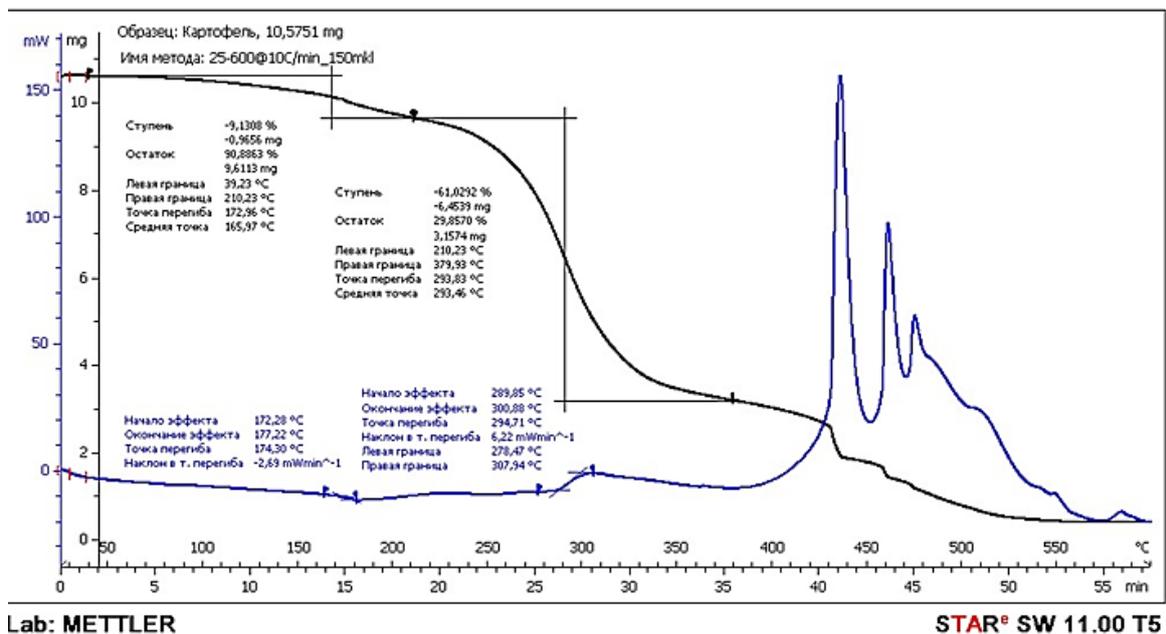


Рисунок 2. TGA/DSC - анализ пектина из картофеля

Выводы

Природа экстрагента, время экстракции, pH среды и температура процесса оказывают существенное влияние на выход пектиновых веществ из продуктов сельского хозяйства. Из полученных экспериментальных данных можно увидеть, что:

✓ максимальный выход пектиновых веществ из семян тыквы (4,5%) наблюдался, когда в качестве гидролизующего агента использовали соляную кислоту при времени обработки в 3 часа;

✓ наибольший выход пектина из картофеля происходил также под воздействием соляной кислоты за 3 часа;

✓ использование лимонной кислоты в качестве агента при более высокой кислотности и увеличенном времени показал меньший выход по целевому продукту;

✓ анализ диаграмм мутности, цвета, отношения выхода твердой фракции и жидкой, рВ и выход пектиновых веществ свидетельствует о стабильности проведенных исследований.

Характер полученных диаграмм TGA/DTG показал, что:

✓ на начальном этапе нагрева до температуры 100°C потеря массы вещества связана с испарением молекул этилового спирта и воды;

✓ далее при повышении температуры до 200-310°C происходит значительное разрушение полисахаров - сопровождающееся изменением массы вещества.

Результаты проведенных исследований указывают на необходимость более тщательного исследования свойств пектиновых веществ, содержащихся в семенах тыквы.

Библиографический список

1. Оводов Ю.С. Современные представления о пектиновых веществах // Биоорган. химия. – 2009. – Т. 5, № 3. – С. 293–310.

2. Тыщенко В.М. Пектины и пектиносодержащие продукты // Вестник Оренбургского государственного университета. – Оренбург: ОГУ, 2006. – № 13. – С. 290–291.

3. Шелухина Н.П., Ашубаева З.Д., Аймухамедова Г.Б. Пектиновые вещества, их некоторые свойства и производные. – Фрунзе : Илим, 1970. – 71 с.

4. Михеев Л.А. Выделение пектина из растительного сырья и изучение его химических свойств / Ульяновский государственный университет // Вестник ВГУ. Серия «Химия. Биология. Фармация». – 2013. – № 2. – С. 53–55.

5. Минзанова С.Т. Пектины из нетрадиционных источников: технология, структура, свойства, биологическая активность / С.Т. Минзанова, В.Ф. Миронов, А.И. Коновалов, А.Б. Выштакалюк [и др.]. – Казань : Печать Сервис XXI век, 2011. – 224 с.

6. Бутова С.Н. Характеристика пектинов из нетрадиционного сырья / С.Н. Бутова, Е.Р. Вольнова, К.В. Зуева // Молодой ученый. – 2020. – № 22 (312). – С. 424–426.

7. Саломов Х.Т. Сравнительная характеристика пектина из различного растительного сырья / Х.Т. Саломов, Н.Ш. Кулиев, Ш.С. Хикматова [и др.] // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2000. – № 12. – С. 70–71.

8. Хрундин Д.В. Влияние температурного фактора на функциональные и технологические свойства пектина / Д.В. Хрундин, Н.К. Романова, О.А. Решетник // Известия вузов. Пищевая технология. – 2009. – № 1. – С. 26.

УДК 66.061.34 + 582.982 + 547.814.5

ЭКСТРАКЦИЯ *C,O*-ГЛИКОЗИЛФЛАВОНОВ ИЗ ЗЕЛЕННЫХ ОТХОДОВ *CUCUMIS SATIVUS* ГЛУБОКИМИ ЭВТЕКТИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

Д.Н. Оленников, Н.И. Кащенко, К.В. Маркова

ФГБУН Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия

Зеленые отходы тепличного производства огурцов (*Cucumis sativus* L.) содержат различные метаболиты, в том числе флавоноиды из группы *C,O*-гликозилфлавонов, обладающих биологической активностью. В настоящей работе приводятся результаты разработки способа экстракции флавоноидов из травы *C. sativus* с применением глубоких эвтектических растворителей (DES), среди которых наиболее эффективным оказалась смесь холина хлорид – дипропиленгликоль – вода. Определены оптимальные условия ультразвукового воздействия, состава DES, соотношения сырье:экстрагент и других параметров на эффективность извлечения флавоноидов из растительного сырья. После твердофазной экстракции на макропористой смоле Amberlite XAD-2 получена сумма флавоноидов, содержащая различные *C,O*-гликозилфлавоны с суммарным содержанием 876.07 мг/г. Проведенные исследования впервые показали эффективность DES для экстракции флавоноидов из зеленых отходов *C. sativus*.

Ключевые слова: огурец посевной, сельскохозяйственные отходы, глубокие эвтектические растворители, флавоноиды, *C,O*-гликозилфлавоны.

Глубокие эвтектические растворители (DES) представляют собой новый класс аналогов ионных жидкостей, используемых для извлечения различных соединений из природных матриц и состоящих из акцепторов (НВА) и доноров водородных связей (HBD) [1]. Как растворители для экстракции DES обладают преимуществами в эффективности извлечения, меньшем времени экстракции, низкой стоимости, отсутствии токсичности, биоразлагаемости и улучшенной чистоты продукта, что в результате предполагает широкий спектр их применения [2]. В настоящее время методы, применяющие DES, широко исследуются для извлечения флавоноидов из растительного сырья [3].

Зеленые отходы тепличных хозяйств являются в большинстве своем неиспользуемым побочным материалом, появляющимся при производстве пищевой продукции. Утилизация вегетативных частей растений в сельском хозяйстве проводится в результате компостирования, что не позволяет использовать потенциал биологически активных соединений, которые часто обладают значительно большей экономической привлекательностью в отличие от органических удобрений. Одной из наиболее часто выращиваемых тепличных культур является огурец посевной (*Cucumis sativus* L.) семейства Cucurbitaceae, мировая продукция зеленых отходов от производства которого может достигать до 1 млн. т/год. Зеленые части *C. sativus* являются источником различных флавоноидов, среди которых доминируют *C,O*-гликозилфлавоны, обладающие ингибирующим действием на панкреатическую липазу человека и рассматриваемые в качестве потенциальных терапевтических и лекарственных агентов для лечения заболеваний, связанных с нарушением обмена липидов [4–8]. Ранее DES не применялись для экстракции флавоноидов из *C. sativus*, в связи с чем целью настоящей работы является разработка методики экстракции суммы *C,O*-гликозилфлавонов из зеленых отходов огурца посевного с применением DES.

Листья *C. sativus* (сорт Маша F1) были собраны в экспериментальном тепличном хозяйстве ИОЭБ СО РАН (Республика Бурятия, Россия) и высушены при 45°C до влажности $\leq 5\%$ в конвекционном сушильном шкафу. Профилирование и количественный анализ экстрактов осуществляли с помощью высокоэффективной хроматографии с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием с ионизацией электрораспылением (ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС) на жидкостном хроматографе LCMS-8050 (Shimadzu, Columbia, MD, USA), используя

колонку ReproSil-Pur 120 C18-AQ (250 мм × 4,6 мм × 5 мм; Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Germany) и условия анализа описанные ранее [4, 7]

Для создания DES применяются различные комбинации НВА и НВД из возобновляемых, недорогих и легкодоступных ресурсов. В настоящей работе в качестве НВА использовался холина хлорид, являющийся наиболее распространенным компонентом DES, а как НВД использовались различные доступные типы диолов и полиолов (глицерин = Гл, ксилит = Кс, сорбитол = Со, мальтит = Ма, 1,2-этандиол = ЭтД, 1,3-пропандиол = ПрД, 1,4-бутандиол = Буд, 1,5-пентандиол = ПеД, 1,6-гександиол = ГеД, дипропиленгликоль = ДППГ), в связи с их меньшей вязкостью по сравнению с DES, содержащими карбоновые кислоты или сахара. Молярное соотношение компонентов в DES было 1:1. Применение трех методов экстракции травы *C. sativus* – перемешивание при комнатной температуре, нагревание на водяной бане, ультразвуковая экстракция (УЗЭ), показало, что наиболее эффективным извлечением флавоноидов обладала смесь холина хлорид – дипропиленгликоль в условиях УЗЭ (рис. 1).

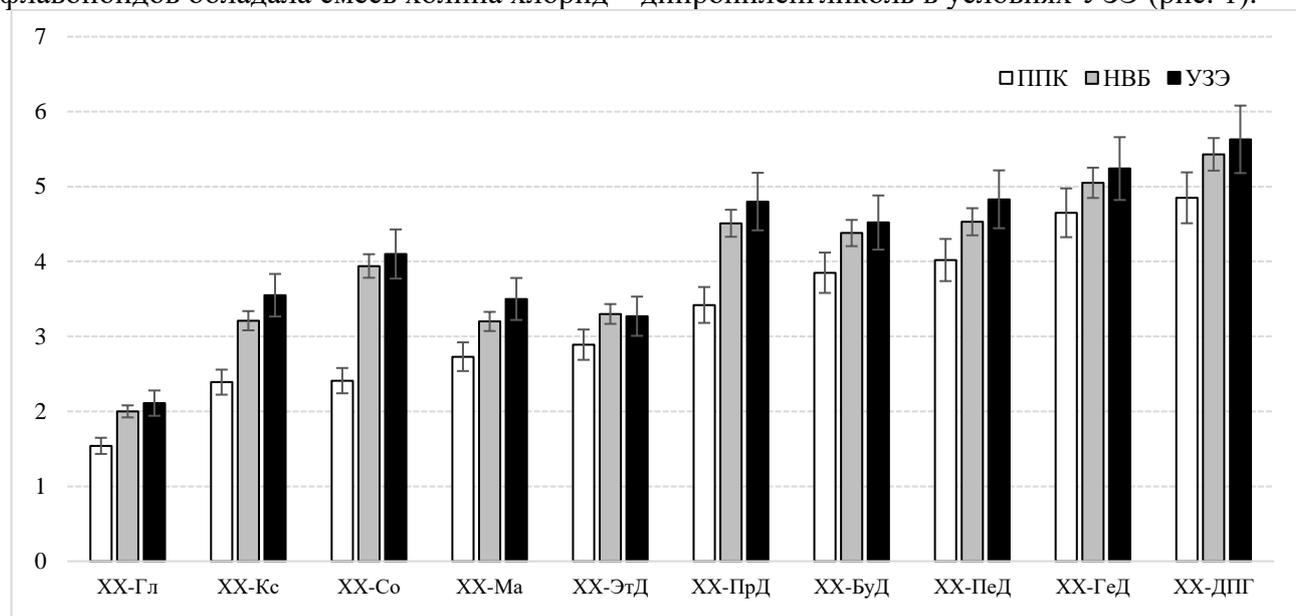


Рис. 1. Эффективность экстракции флавоноидов из травы *C. sativus* различными DES в условиях перемешивания при комнатной температуре (ППК), нагревания на водяной бане (НВБ, 50°C) и ультразвуковой экстракции (УЗЭ, 50°C). По оси абсцисс – тип экстрагента, по оси ординат – концентрация флавоноидов, мг/г возд.-сухого сырья.

Очевидно, что на результативность экстракции влияла природа компонентов НВД, особенно это касалось DES на основе диолов, которые были наиболее эффективными для извлечения флавоноидов. Следует отметить, что с увеличением длины углеродной цепи C2 до C6 выход флавоноидов возрастал, что, вероятно, связано с повышенной гидрофобностью НВД.

Возрастание мощности ультразвука с 20 Вт до 450 Вт приводило к повышению выхода флавоноидов (рис. 2а). При большей мощности ультразвука скорость молекулярных колебаний была выше, а межмолекулярные взаимодействия усиливались, что способствовало растворению флавоноидов. Однако дальнейшее повышение мощности ультразвука негативно отражалось на экстракции флавоноидов, что было обусловлено влиянием высокочастотных вибраций на сетчатую структуру, образующуюся внутри DES, приводя к нестабильности, а сильный кавитационный эффект разрушал флавоноиды, тем самым снижая способность экстрагировать целевые соединения из фитоматрицы.

Оптимизация соотношения НВА-НВД в DES имеет решающее значение для повышения скорости экстракции флавоноидов из растительного сырья. Учитывая это была изучена способность к экстракции смесей смесь холина хлорид – дипропиленгликоль с соотношением от 2:1 до 1:8 (рис. 2б). В результате было отмечено, что до соотношения 1:4 скорость извлечения общего количества флавоноидов сначала увеличивалась, а затем снижалась. Причиной этого явления может быть то, что снижение содержания холина хлорида приводило к снижению

вязкости и поверхностного натяжения DES, тем самым улучшая эффекты диффузии и массопереноса.

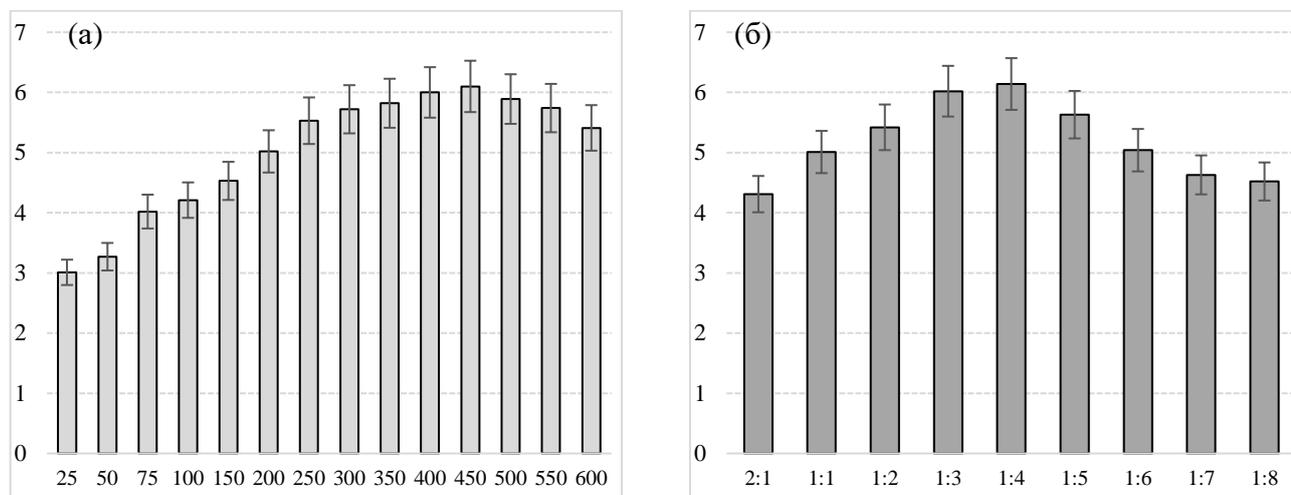


Рис. 2. Влияние мощности ультразвука (а) и соотношения холина хлорид – дипропиленгликоль (б) на выход флавоноидов из травы *C. sativus*. По оси абсцисс – мощность, Вт (а) / соотношение холина хлорид – дипропиленгликоль (б); по оси ординат – концентрация флавоноидов, мг/г возд.-сухого сырья.

Большинство DES имеют относительно высокую вязкость при комнатной температуре, тем самым негативно влияя на межмолекулярные взаимодействия экстрагируемой жидкости. Оптимизация текучести DES играет ключевую роль в повышении скорости экстракции, на что влияет содержание воды в растворителе. При увеличении содержания воды в DES с 5 до 70% скорость экстракции флавоноидов из травы *C. sativus* изменялась, возрастая до 35% воды в DES, а затем снижаясь (рис. 3а).

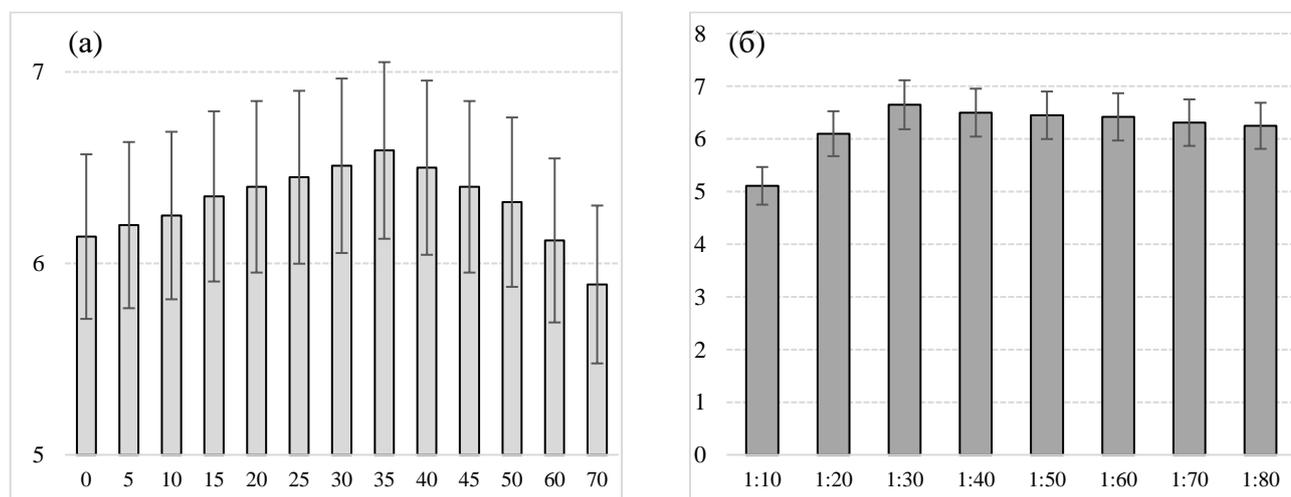


Рис. 3. Влияние концентрации воды в DES (а) и соотношения сырье : DES (б) на выход флавоноидов из травы *C. sativus*. По оси абсцисс – концентрация воды в DES, % (а) / соотношения сырье:DES; по оси ординат – концентрация флавоноидов, мг/г возд.-сухого сырья.

Это, вероятно, было обусловлено тем, что вода как полярный растворитель увеличивала полярность DES, приближаясь к полярности флавоноидов. Дальнейшее разбавление DES водой привело к потере существующих водородных связей вследствие возрастания конкуренции с группами в двух компонентах за образование водородных связей.

Исследование влияния соотношения сырье: экстрагент на эффективность экстракции показало, что с увеличением содержания DES до 1:30 скорость экстракции флавоноидов повышалась, а затем снижалась. Это связано с тем, что при большем содержании растворителя

достигается лучший контакт между растительным сырьем и растворителем, что в свою очередь усиливало массообмен в растворе. Более разбавленный растворитель увеличивал потребление энергии ультразвука и как следствие приводил к неэффективному разрушению клеток. Эффект ультразвуковой кавитации становился менее выраженным и снижался выход целевых компонентов.

После определения параметров температуры (50°C) и времени экстракции (60 мин) была проведена оптимизация процесса экстракции с применением метода Бокса-Бенкена, что позволило повысить эффективность экстракции флавоноидов из травы *C. sativus* до 6.5-6.6 мг/г растительного сырья. Для удаления DES из реакционной среды применялась твердофазная экстракция на макропористой смоле Amberlite XAD-2, как описано ранее [4], в результате чего была получена сумма флавоноидов травы *C. sativus*. Предварительная элюция смолы водой приводила к полному удалению DES, который далее мог быть восстановлен из водных элюатов после удаления воды в вакууме. Предварительные исследования показали, что эффективность экстракции флавоноидов для восстановленного DES составила 95% во втором цикле использования, 92% – в третьем и 86% – в четвертом. Начиная с пятого цикла использования выход флавоноидов снижался до 62% и ниже, что указывало на неэффективность дальнейшего восстановления DES.

Сравнительный анализ данных ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС профилирования и количественного анализа указывали на сходство компонентных составов фракций флавоноидов, полученных с использованием метанола [7] и DES (таблица 1). Суммарное содержание флавоноидов после применения DES в итоговой фракции было выше на 14.5% (876.07 мг/г) в сравнении с таковым в метанол-экстрагируемом продукте (764.50 мг/г). Следует отметить высокое содержание ацилированных *C,O*-гликозилфлавонов **1–5**, обладающих выраженным ингибиторным влиянием на активность панкреатической липазы [6–8].

Таблица 1.

Содержание гликозилфлавонов в сумме флавоноидов *C. sativus*, полученной с применением метанольной (MeOH) и DES экстракций, мг/г от массы фракции \pm S.D.

Соединение	MeOH	DES
Изовитексин 7- <i>O</i> -глюкозид	6.03 \pm 0.14	7.26 \pm 0.18
Изовитексин 4'- <i>O</i> -глюкозид	59.73 \pm 1.14	63.38 \pm 1.25
Изовитексин 2''- <i>O</i> -рамнозид	21.44 \pm 0.24	22.89 \pm 0.45
Изовитексин 7,4'-ди- <i>O</i> -глюкозид	47.21 \pm 0.95	50.15 \pm 0.98
Изовитексин 4',2''-ди- <i>O</i> -глюкозид	33.18 \pm 0.69	35.63 \pm 0.71
Изовитексин 7- <i>O</i> -гентиобиозид	2.86 \pm 0.06	3.22 \pm 0.06
Изовитексин 2''- <i>O</i> -(6'''- <i>O</i> - <i>n</i> -кумароил)-глюкозид (1)	51.26 \pm 1.01	53.86 \pm 1.07
Изовитексин 2''- <i>O</i> -(4'''- <i>O</i> - <i>n</i> -кумароил)-глюкозид (2)	7.11 \pm 0.15	9.27 \pm 0.20
Изовитексин 2''- <i>O</i> -(6'''- <i>O</i> -ферулоил)-глюкозид (3)	115.03 \pm 2.34	159.37 \pm 2.58
Изовитексин 4'- <i>O</i> -глюкозид-2''- <i>O</i> -(6'''- <i>O</i> - <i>n</i> -кумароил)-глюкозид (4)	104.82 \pm 2.14	128.82 \pm 2.18
Изовитексин 4'- <i>O</i> -глюкозид-2''- <i>O</i> -(4'''- <i>O</i> - <i>n</i> -кумароил)-глюкозид (5)	105.39 \pm 2.16	140.39 \pm 2.49
Кукумерин D	210.44 \pm 4.22	211.83 \pm 4.23
Суммарное содержание флавоноидов	764.50	876.07

Таким образом, в настоящем исследовании впервые показана эффективность экстракции флавоноидов из зеленых отходов огурца посевного с применением глубоких эвтектических растворителей как экологически чистых и экономичных растворителей для получения природных фенольных соединений, что обеспечивает теоретическую основу для их дальнейшего практического применения.

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00063 (<https://rscf.ru/project/23-26-00063>).

Библиографический список

1. Smith E.L., Abbott A.P., Ryder K.S. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications // *Chem. Rev.* – 2014. – Vol. 114. – P. 11060–11082. DOI: 10.1021/cr300162p.
2. Serna-Vázquez J., Ahmad M.Z., Boczka G., Castro-Muñoz R. Latest insights on novel deep eutectic solvents (DES) for sustainable extraction of phenolic compounds from natural sources // *Molecules.* – 2021. – Vol. 26. – No. 5037. DOI: 10.3390/molecules26165037.
3. Hao Y., Pei P., Huang J., Li G. Application of deep eutectic solvents on extraction of flavonoids // *J. Sep. Sci.* – 2024. – Vol. 47. – No. 2300925. DOI: 10.1002/jssc.202300925.
4. Olennikov D.N. Separation, characterization and mammal pancreatic lipase inhibitory potential of cucumber flower flavonoids // *Separations.* – 2023. – Vol. 10. – No 255. DOI: 10.3390/separations10040255.
5. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. New flavonoids from *Cucumis sativus* // *Chem. Nat. Comp.* – 2023a. – Vol. 59. – P. 651–654. DOI: 10.1007/s10600-023-04079-4.
6. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. Acylated flavonoids from *Cucumis sativus* inhibit activity of human pancreatic lipase // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2023b. – Vol. 59. – P. 530–538. DOI: 10.1134/S0003683823040099.
7. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. Green waste from cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivation as a source of bioactive flavonoids with hypolipidemic potential // *Agronomy.* – 2023c. – Vol. 13. – No 2410. DOI: 10.3390/agronomy13092410.
8. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. New acylated *C,O*-glycosylflavones from *Cucumis sativus* // *Chem. Nat. Comp.* – 2024. – Vol. 60. – P. 235–240. DOI: 10.1007/s10600-024-04295-6.

УДК 615.36.332:612.392.398

КОМПЛЕКСНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ ШРОТА ПОДСОЛНЕЧНИКА С ПОЛУЧЕНИЕМ БЕЛКОВОГО КОНЦЕНТРАТА И СОРБЦИОННОГО МАТЕРИАЛА

А.А. Павлова, Ю.А. Смятская

Институт биомедицинских систем и биотехнологий. Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, г. Санкт-Петербург. Россия.

Шрот подсолнечника является многотоннажным и перспективным вторичным сырьем масложировой промышленности, ценным свойством которого является высокое содержание белка и сравнительно низкая себестоимость. При этом высокая концентрация хлорогеновой кислоты (ХГК) в подсолнечном шроте и ее способность образовывать темноокрашенные комплексы с белками при их экстракции ограничивает использование растительного белка подсолнечного шрота в пищевой промышленности. В данной работе были изучены процессы дефенолизации шрота подсолнечника янтарной кислотой в мягких условиях (температурный режим, время, концентрация), а также экстракции белка шрота подсолнечника с использованием протеолитического ферментного препарата (ФП). Показано, что промывка шрота подсолнечника раствором янтарной кислоты позволила снизить содержание массовой доли ХГК в белковой вытяжке до $2,35 \pm 0,47\%$, а использование протеолитического ФП для интенсификации процесса щелочной экстракции в мягких условиях позволило увеличить степень экстракции белковых соединений шрота подсолнечника до $60,0 \pm 4,5\%$. Химическая активация, при экстракции белка, создала пористую структуру и функциональные группы на поверхности сорбента, которые послужили основой для использования отхода глубокой переработки шрота (ОГПШ) в качестве сорбента. Подобранный режим (температура, pH, время) позволил увеличить эффективность сорбции для Zn^{2+} – 99,9%, Cd^{2+} – 89%, Pb^{2+} – 80%, Cu^{2+} – 65%. Проведённые исследования явились основой для разработки ресурсосберегающей экономически целесообразной технологии комплексной переработки возобновляемого растительного сырья – подсолнечного шрота – с получением продуктов пищевого назначения, а также сорбента для очистки сточных вод от ионов тяжелых металлов (ИТМ).

Ключевые слова: шрот подсолнечника, дефенолизация, хлорогеновая кислота, экстракция белка, сорбент, сорбционная емкость, ионы тяжелых металлов

COMPLEX TECHNOLOGY OF PROCESSING SUNFLOWER MEAL TO PRODUCE PROTEIN CONCENTRATE AND SORPTION MATERIAL

A. Pavlova, Yu. Smyatskaya

Institute of Biomedical Systems and Biotechnologies. Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg. Russia.

Sunflower meal is a multi-tonnage and promising secondary raw material of the fat and oil industry, the valuable property of which is a high protein content and relatively low cost. At the same time, the high concentration of chlorogenic acid (CGA) in sunflower meal and its ability to form dark-colored complexes with proteins during their extraction limits the use of vegetable protein of sunflower meal in the food industry. In this work, the processes of defenolization of sunflower meal with succinic acid under mild conditions (temperature, time, concentration), as well as the extraction of sunflower meal protein using a proteolytic enzyme preparation (EP) were studied. It was shown that washing sunflower meal with succinic acid solution allowed reducing the content of the mass fraction CGA in the protein extract to $2.35 \pm 0,47\%$, and the use of proteolytic EP to intensify the alkaline extraction process under mild conditions allowed to increase the degree of extraction of protein compounds of sunflower meal to $60 \pm 4.5\%$. Chemical activation, during protein extraction, created a porous structure and functional groups on the surface of the sorbent, which served as the basis for the use of waste from deep processing

of meal (WFPOМ) as a sorbent. The selected mode (temperature, pH, time) allowed to increase the sorption efficiency by Zn^{2+} – 99,9%, Cd^{2+} - 89%, Pb^{2+} - 80%, Cu^{2+} - 65%.

The conducted research was the basis for the development of a resource-saving economically feasible technology for the complex processing of renewable plant raw materials - sunflower meal - to produce food products, as well as a sorbent for wastewater treatment from heavy metal ions (HMI).

Keywords: sunflower meal, defenolization, chlorogenic acid, protein extraction, sorbent, sorption tank, heavy metal ions

Введение. Подсолнечный шрот представляет собой остаток после экстракции масла из семени подсолнечника и является ценным вторичным ресурсом. Благодаря своему химическому составу шроты масличных культур привлекательны для производства экологически чистых ингредиентов. Основным интерес представляют белки, извлекаемые из семян подсолнечника, которые являются запасными и выполняют уникальную функцию источника свободных аминокислот [2].

Для получения белкового сырья научным сообществом предложены следующие методы: щелочная экстракция (NaOH), солевая экстракция (NaCl) и солевая экстракция в щелочной среде. Предложенные методы имеют ряд недостатков. Так, экстракция солевыми и щелочными растворами вызывает связывание фенольных соединений, таких как хлорогеновая кислота, с амино- и тиольными группами аминокислот, что в свою очередь приводит к образованию темноокрашенных продуктов; а использование концентрированных солевых растворов для экстракции связано с рядом технологических трудностей и должно включать трудоемкие стадии очистки от ионов натрия. Также использование кислотных растворов для экстракции белка связано с трудностями по утилизации отработанных кислотных раствором и ограничивает технологическое использование полученного белка [1].

Несмотря на то, что белки семян подсолнечника обладают высокой питательной ценностью, их широкое применение ограничено присутствием вторичных продуктов, а именно фенольных веществ, в основном представленных хлорогеновой кислотой. В ряде случаев термин «хлорогеновые кислоты» рассматривается как обобщенное название продуктов этерификации хинной кислоты кофейной. Обычно при проведении количественного анализа хлорогеновой кислоты в растительных образцах определяют суммарное содержание её изомеров: 3-кофеилхинная (3-CQA), 4-кофеилхинная (4-CQA) и 5-кофеилхинная (5-CQA) кислоты. [2] В литературных источниках содержится информация о многочисленных подходах, в которых экстракции подсолнечного белка предшествуют, комбинируются или сопровождаются единичными операциями, которые отделяют фенолы от семян в основном это дорогостоящая процедура промывки шрота спиртами до истощения [1,3].

Также при экстракции белка из шрота подсолнечника будет образовываться многотоннажное побочное сырье – отход глубокой переработки шрота подсолнечника. Существующие способы утилизации твердых растительных отходов могут наносить вред экологии. Так, например, в результате сгорания органической части отходов (способ утилизации подсолнечного шрота - «сжигание твердых отходов») образуются диоксид углерода, пары воды, оксиды азота и серы, аэрозоль, оксид углерода, бенз(а)пирен и диоксины [4]. Внедрение комплексной переработки подсолнечного шрота позволит снизить экологические риски.

Актуальность: проблема дефицита белка требует поиска дополнительных пищевых ресурсов, актуальным решением которых является использование растительных белков для создания продуктов высокой пищевой и биологической ценности. Разработка малоотходных технологий имеет важное экономическое значение – сорбенты, изготовленные из побочного сырья экстракции белка, могут решить помимо проблемы очистки воды от ИТМ и другую задачу, а именно, утилизацию отходов.

Цель: разработка комплексной технологии переработки шрота с получением белоксодержащего сырья и сорбционного материала.

Методы исследования

Определение массовой доли хлорогеновой кислоты в белке подсолнечного шрота:

использовали спектрофотометрический метод на спектрофотометре с УФ-видимого диапазона SHIMADZU («UVmini-1240», Япония) с расчетом концентрации ХГК из градуированного графика [1].

Методы экстракции белка: щелочной, солевой, солевой в щелочной среде, ферментативный в щелочной среде [1].

Методика качественного анализа белка. Для качественного анализа белка использовали спектрофотометрическое измерение УФ-поглощения на (SHIMADZU («UVmini-1240», Япония)): анализ по Бредфорду [1].

Эффективность сорбции ионов тяжелых металлов (модельный раствор Pb^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} с концентрацией 10 мг/дм³) определяли на анализаторе вольтамперометрическом ТА-Lab; расчет результатов проводился с помощью программного обеспечения ТА-Lab.

В условиях установившегося равновесия в системе определяли эффективность извлечения (Э,%) ионов тяжелых металлов в растворе по формуле:

$$\text{Э} = \frac{(C_0 - C_k)}{C_0} * 100 \quad (1)$$

где C_0 – начальная концентрация ионов (мг/дм³), C_k – конечная концентрация (мг/ дм³).

Микроструктурные исследования морфологии поверхности сорбента проведены на базе «Центра коллективного пользования (ЦКП) «Материаловедение и диагностика в перспективных технологиях» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физико-технического института им. А. Ф. Иоффе РАН (Институт им. А. Ф. Иоффе). Этот объект коллективного пользования создан на базе Физико-технического института им. А. Ф. Иоффе, финансируемого Минобрнауки России (номер проекта RFMEFI62117X0018). Режим получения фото: вторичные электроны, ток пучка 12 пкА, ускоряющее напряжение - 5кэВ.

Результаты и обсуждения

1. Дефенолизация шрота подсолнечника. С целью сохранения физико-химических характеристик подсолнечного шрота определена оптимальная концентрация янтарной кислоты – 7%, в результате обработки которой зафиксировано снижение содержания хлорогеновой кислоты на 68% от её изначального содержания в подсолнечном шроте. (табл.1)

Таблица 1

Содержание хлорогеновой кислоты в белке подсолнечного шрота

Образец	Спектры поглощения, полученные для белкового концентрата ($\lambda_{max} = 320$ нм)	Масса ХГК в навеске белка, г	Массовая доля ХГК в белковой вытяжке, %
Шрот без обработки	1,83	0,30±0,06	7,27±1,45
Шрот + 1% р-р ЯК	1,38	0,22±0,04	5,49±1,10
Шрот + 3% р-р ЯК	1,38	0,22±0,04	5,47±1,10
Шрот + 5% р-р ЯК	0,88	0,14±0,03	3,47±0,69
Шрот + 7% р-р ЯК	0,58	0,09±0,02	2,35±0,47
Шрот + 10% р-р ЯК	0,31	0,05±0,01	1,24±0,25

При этом увеличение времени и температуры нецелесообразно, так как по результатам исследования при повышении температуры процесс дефенолизации замедляется, а при увеличении времени наблюдается денатурация белка до аминокислотных групп.

Подобран следующий режим дефенолизации подсолнечного шрота: концентрация янтарной кислоты – 7%, гидромодуль 1:10, время экстракции 20 мин., при $T = 22 \pm 2$ °С. Разработанный способ позволяет сократить содержание массовой доли хлорогеновой кислоты в белковой вытяжке до 2,35±0,47%.

2. Экстракция белка из дефенолизированного шрота. Была поставлена серия экспериментов со сравнением различных методов экстракции белка из дефенолизированного подсолнечного шрота (солевая, щелочная, солевая экстракция в щелочной среде и ферментативная экстракция) по результатам которой определено, что ферментативная экстракция позволяет получить целевой продукт с наибольшим содержанием белка – $60,0 \pm 4,5\%$. (рис. 1)

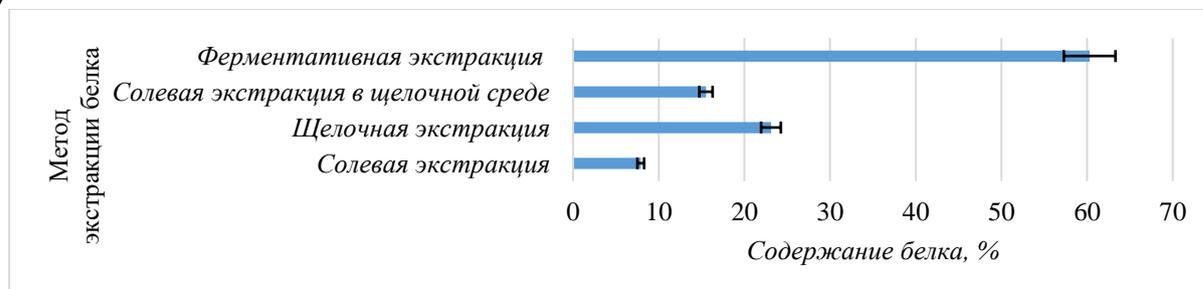


Рис. 1. Влияние метода экстракции на содержание белка

Подобран режим ферментативной экстракции белка из дефенолизированного подсолнечного шрота: соотношение фермент/субстрат – 0,3%, щелочная среда (pH=9.5), гидромодуль 1:10, время экстракции на водяной бане 40 мин., при $T = 37 \pm 2$ °C. Разработанный способ получения белкового концентрата из подсолнечного шрота позволяет получить целевой продукт светлого цвета с высоким содержанием белка и наибольшим удалением из него фенольных соединений без использования токсичных реагентов.

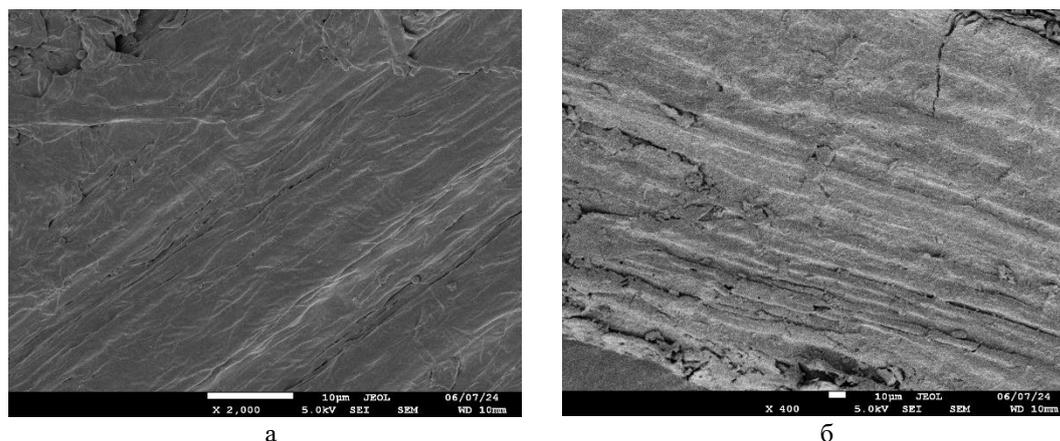


Рис. 2. Микроструктурные исследования до (а) и после (б) ферментной обработки x 3000

3. Морфология поверхности сорбента. Из рис. 2 видно, что микроструктура подсолнечного шрота в нативном состоянии имеет гладкую и ровную поверхность после воздействия ферментного комплекса мы наблюдаем образование неровностей, трещин и пор. Возможно предположить, что за счет, образовавшейся структуры будет протекать процесс физической сорбции, в этом случае ионы металлов будут задерживаться в образовавшихся порах и тем самым будет снижаться концентрация металлов в очищаемом растворе.

Также из микрофотографии видно, что концентрация ферментного препарата была подобрана верно, ферментный комплекс точно разрушил структуру нативного шрота и сформировал нужную поверхность без полного разрушения.

4. Эффективность сорбции ОГПШ по отношению к ионам тяжелых металлов. Наибольшее влияние на эффективность сорбции среди рассматриваемых параметров оказывает значение pH среды. (табл. 2) Анализ табл. 2 показывает, что наибольшая сорбция наблюдается при pH 6. Повышение температуры раствора мало влияет на сорбцию ИТМ. Это свидетельствует о том, что сорбция идет преимущественно за счет ионного обмена, который практически не зависит от температуры. Увеличение времени сорбции также нецелесообразно.

Таблица 2

Влияние pH среды на эффективность сорбции

ИТМ ($C_0=10$ мг/дм ³)	Эффективность сорбции, %		
	pH 1	pH 6	pH 12
Zn	41	99	29
Cd	46	89	94
Pb	12	80	94
Cu	-	65	32

Определен режим сорбции ИТМ: $t=30$ мин., $T=22\pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6$. Подобранные параметры позволили увеличить эффективность сорбции по Zn^{2+} – 99%, Cd^{2+} - 89%, Pb^{2+} - 80%, Cu^{2+} - 65%.

Заключение

В данной работе разработана комплексная технология переработки шрота подсолнечника с получением белкового концентрата и сорбционного материала. Очистка подсолнечного шрота от фенольных соединений была проведена с помощью выдержки сырья в слабом водном растворе янтарной кислоты. Данная обработка позволяет сократить содержание хлорогеновой кислоты на 68% по сравнению с содержанием ХГК в белковой вытяжке из подсолнечного шрота без предварительной дефенолизации. Проведен сравнительный анализ существующих методик экстракции белка из подсолнечного шрота и обоснован выбор ферментативной экстракции для дефенолизованного шрота, позволяющий получить белковый концентрат кремового цвета с содержанием белка $60,0\pm 4,5\%$. Побочный продукт получения белка (отход глубокой переработки шрота) был рассмотрен в качестве сорбента для очистки сточных вод – подобраны режимы сорбции, которые позволили увеличить эффективность сорбции для Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} .

Библиографический список

1. Лабейко М.А., Гладкий Ф.Ф., Жулинская О.В., Нечитайло Ю.И. Влияние способа экстрагирования на эффективность извлечения хлорогеновой кислоты из подсолнечного шрота. *Norwegian Journal of Development of the International Science*. 2020. №44. С.23-27.
2. Павлова, А. А. Технология получения белоксодержащего сырья с пониженным содержанием фенольных соединений из шрота подсолнечника / А. А. Павлова, Ю. А. Смятская // *Бутлеровские сообщения*. – 2023. – Т. 76, № 12. – С. 63-72
3. Степуро М.В., Лобанов В.Г., Щербаков В.Г. Влияние обработки белковых концентратов из семян подсолнечника раствором янтарной кислоты на их функциональные свойства. *Известия вузов. Пищевая технология*. 2006. №2-3. С.71-72.
4. Shchekoldina T., Aider M. Production of low chlorogenic and caffeic acid containing sunflower meal protein isolate and its use in functional wheat bread making. *J. Food Sci. Technol*. 2014. Vol.51. No.10. P.2331-2343.

УДК 674.8

К ВОПРОСУ О КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКЕ ДРЕВЕСНЫХ ОТХОДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ РЕЦИКЛИНГА

А.А. Петрова, Ю.Д. Алашкевич, И.А. Воронин

"Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика М.Ф. Решетнева", 660037, Красноярский край, г. Красноярск, просп. им. газеты "Красноярский рабочий", 31

Проблема иррационального использования древесных отходов является актуальной для лесопромышленного комплекса России. В статье приведены некоторые виды древесных отходов, таких как кора, отходы лесопиления, отходы форматно-обрезной резки, уловленное волокно и отходы лиственных пород, а также рассмотрена возможность их комплексного использования в условиях деревоперерабатывающего предприятия. Для каждого вида древесных отходов определено оптимальное процентное содержание в общей древесной массе.

Ключевые слова: древесные отходы, рециклинг, древесно-волокнистые плиты, деревопереработка, физико-механические показатели.

INTEGRAL PROCESSING OF WOOD WASTE USING RECYCLING TECHNOLOGY

A.A. Petrova, Yu.D. Alashkevich, I.A. Voronin

Reshetnev Siberian State University of Science and Technology, 31 Krasnoyarsky Rabochny Av., 660037, Krasnoyarsk, Russia

The problem of irrational use of wood waste is relevant for the Russian timber industry. The article presents some types of wood waste, such as bark, sawmill waste, format-edging waste, captured fiber and hardwood waste, and also considers the possibility of their integrated use in a wood processing enterprise. For each type of wood waste, the optimal percentage in the total wood mass has been determined.

Keywords: wood waste, recycling, wood fiber boards, wood processing, physical and mechanical properties.

Эффективность работы любого современного предприятия лесопромышленного комплекса напрямую связана с применением в его деятельности инновационных технологий, без которых невозможно производство современных востребованных продуктов. Непрерывная модернизация деятельности предприятия невозможна без применения новых технологий и достижений научно-технического прогресса [1].

Для предприятий лесопромышленного комплекса наиболее важной проблемой остается большое количество отходов, образующихся в процессе производства пиломатериалов на всех стадиях производства древесного полуфабриката и готовой продукции. Отходы деревопереработки часто применяются в качестве твердого топлива для нужд предприятия. Однако использование отходов деревопереработки для получения тепловой энергии является неэффективным, так как себестоимость древесных отходов превышает стоимость полученной таким образом энергии. Проблему комплексного использования образующихся древесных отходов деревоперерабатывающего предприятия поможет решить применение технологии рециклинга [2, 3].

Рециклинг представляет собой процесс возвращения отходов, выбросов и сбросов в производственные процессы, что позволяет экономить на ресурсах, посредством вовлечения в производство вторичного сырья, а также уменьшать негативное воздействие на экологию, снижая выбросы в атмосферу и гидросферу. В условиях деревоперерабатывающего предприятия

рециклинг является актуальной технологией переработки древесных отходов. Для обеспечения комплексного использования древесных отходов деревоперерабатывающего предприятия целесообразно использовать их в имеющемся производстве древесноволокнистых плит.

На базе филиала СибГУ в г. Лесосибирске проводился ряд лабораторных экспериментов в соответствии с ГОСТ 10633-2018 [4], направленный на исследование влияния древесных отходов на физико-механические характеристики готовых древесноволокнистых плит.

Для исследований были использованы отходы в виде коры, полученной после окорки бревен, отходов лесопиления, полученных при производстве пиломатериалов экспортного назначения, отходов форматно-обрезной резки (ФОР), полученных при торцовке и обрезке древесноволокнистых плит, уловленного волокна, полученного из сточных вод при производстве ДВП, а также отходы лиственных пород. Для применения перечисленных отходов в древесно-плитном производстве они должны предварительно пройти подготовку [5, 6].

Соответствие физико-механических показателей полученных древесноволокнистых плит с использованием древесных отходов проводилось для древесноволокнистых плит мокрого способа производства марки Т, группы Б по ГОСТ 4598-2018 «Плиты древесно-волокнистые мокрого способа производства».

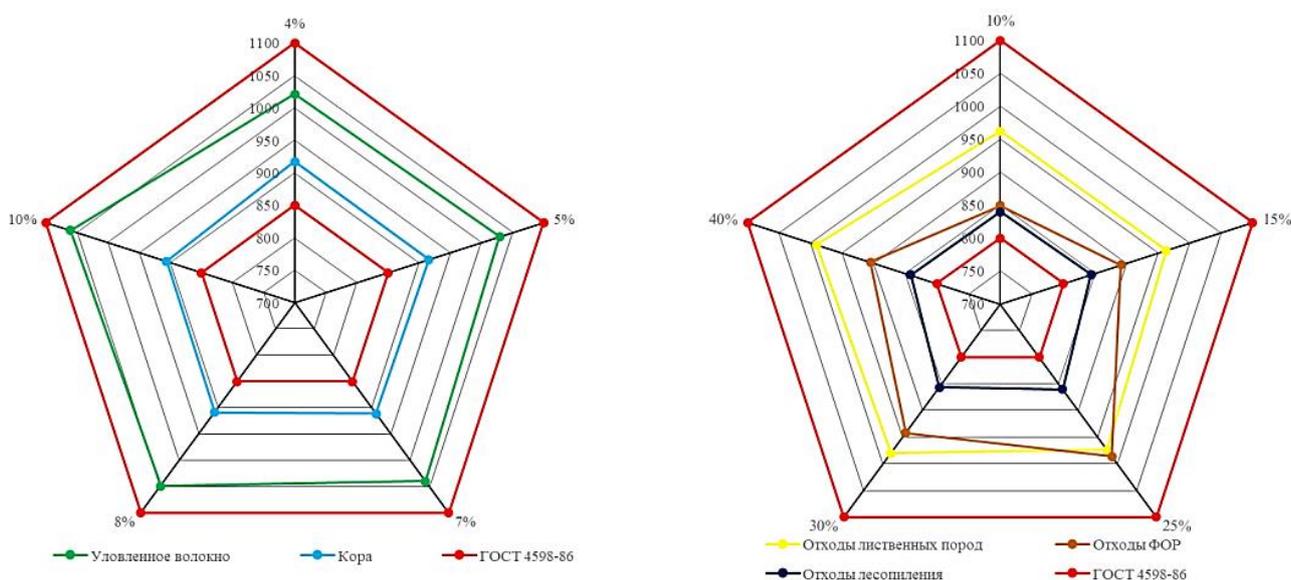


Рисунок 1. Зависимость плотности ДВП от процентного содержания древесных отходов в общей массе

На рис. 1 представлены графики, отображающие значения плотности древесноволокнистых плит с применением отходов деревопереработки. Как видно из графика, уловленное волокно и кора соответствуют требованиям ГОСТ и входят в установленные пределы 800-1100 кг/м³, однако отходы в виде уловленного волокна имеют более высокий показатель плотности в сравнении с корой. Отходы лиственных пород соответствуют установленным пределам плотности.

Отходы ФОР также соответствуют требованиям, а при добавлении 25% их в общую массу имеют более высокий показатель плотности в сравнении с остальными отходами. Отходы лесопиления отвечают требованиям ГОСТ по плотности, однако имеют самый низкий показатель при всех перечисленных процентных содержаниях в общей массе.

По проведённым экспериментам представлены графики, отображающие значения прочности древесноволокнистых плит мокрого производства с применением отходов деревопереработки (рис. 2).

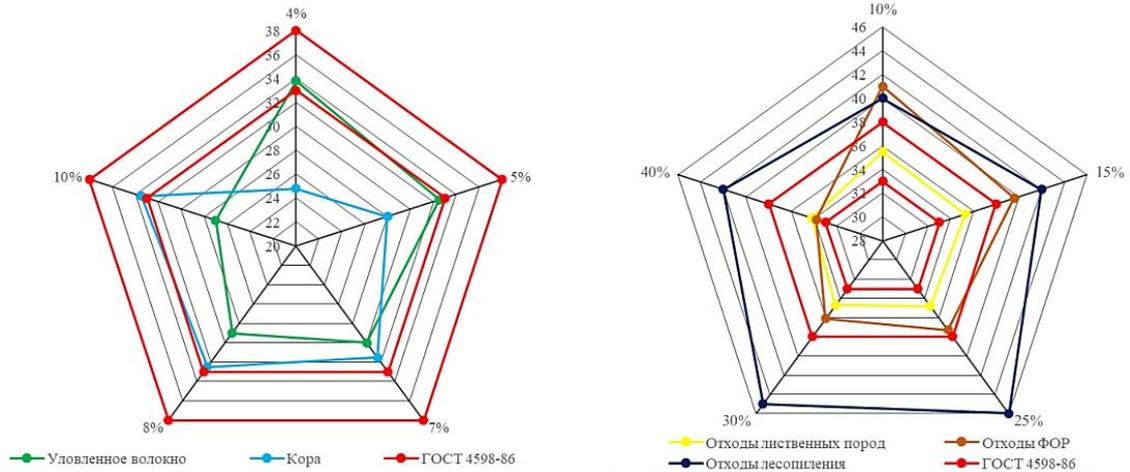


Рисунок 2. Зависимость прочности ДВП от процентного содержания древесных отходов в общей массе

Как видно из графика при использовании уловленного волокна в количестве 4% требования ГОСТ выполняются, при использовании 5% несоответствие составляет 0,5 МПа, при дальнейшем увеличении содержания уловленного волокна в общей массе до 10% показатель прочности не соответствует требованиям и не входит в установленные пределы 33-38 МПа. Показатель прочности при использовании коры в размере 4-7% не соответствует требованиям ГОСТ, при содержании в общей массе 8% показатель меньше на 0,5 МПа, при использовании 9-10% значения показателя входят в установленные пределы по прочности.

Отходы лиственных пород удовлетворяют требованиям ГОСТ, показатель прочности при их добавлении находится в пределах 33-38 МПа. При использовании 25-40% отходов ФОР требования ГОСТ соблюдаются, а добавление 10-20% отходов превышает требуемые показатели. Добавление отходов лесопиления в размере 10-40% способствует повышению прочности древесноволокнистых плит, при этом установленные ГОСТ показатели превышены.

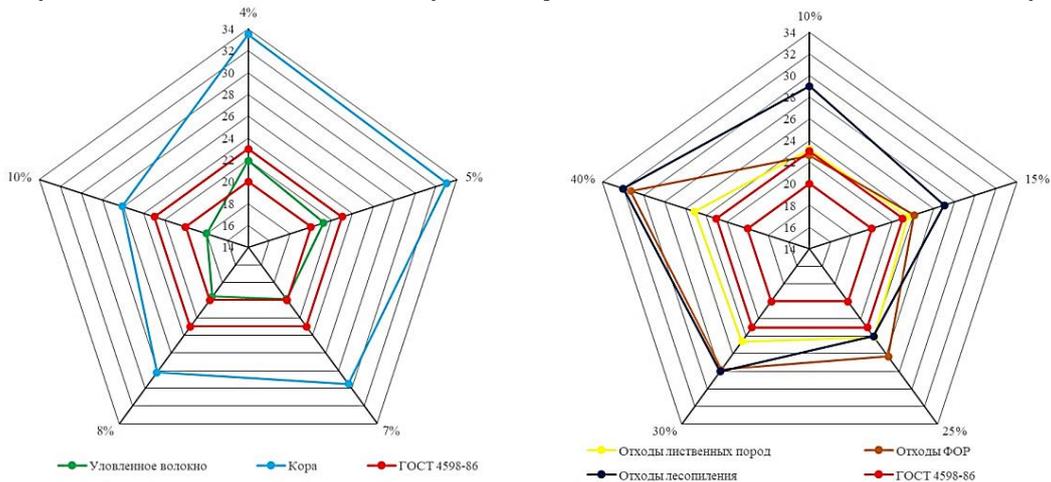


Рисунок 3. Зависимость водопоглощения ДВП от процентного содержания древесных отходов в общей массе

Добавление отходов деревопереработки также влияет на водопоглощение древесноволокнистых плит, степень воздействия зависит от вида отходов, их структуры и процентного содержания в общей массе. На рисунке 3 представлены графики отображающие значения водопоглощения древесноволокнистых плит с применением отходов деревопереработки.

Из графика, представленного на рисунке 3, видно, что показатель водопоглощения древесноволокнистых плит с добавлением уловленного волокна в количестве 4-6% требования ГОСТ соблюдаются и полученные значения входят в установленный предел 20-23%, добавление 7% уловленного волокна снижает показатель на 0,1%, при дальнейшем добавлении

водопоглощение плит уменьшается и при использовании в общей массе 10% волокна составляет 18%. Использование коры в размере 4-10% значения показателя водопоглощения не соответствует требованиям ГОСТ и превышают допустимые показатели.

Показатели водопоглощения представленные на рисунке 3 соответствуют требованиям ГОСТ при использовании 10% отходов ФОР, при использовании их в размере 15% показатель превышает установленное значение на 1,1%, использование отходов лиственных пород в количестве 10-20% в общей массе не соответствует требованиям на 0,2-0,7% соответственно. Добавление данных видов отходов в остальных процентных содержаниях, а также отходов лесопиления от 10% до 40% показывает значительные отклонения от установленных ГОСТ пределов по водопоглощению.

Полученные данные свидетельствуют о возможности комплексной переработки древесных отходов с применением технологии рециклинга в условиях деревоперерабатывающего предприятия. Оптимальные значения содержания в общей массе древесных отходов, при соответствии физико-механических характеристик требованиям ГОСТ, составляют: уловленное волокно – 4%; отходы лиственных пород – 10-15%; отходы ФОР – 10%, при этом показатель прочности древесноволокнистой плиты имеет значение выше ГОСТа на 3МПа, а при добавлении в массу отходов ФОР в количестве 25% значение водопоглощения не соответствует требованиям ГОСТ на 1%, однако прочность плиты повышается на 8 МПа.

Таким образом внедрение в технологический процесс деревообрабатывающего предприятия технологии рециклинга позволит уменьшать затраты на утилизацию отходов и получать прибыль от вторичного использования древесных отходов в производстве плитной продукции.

Библиографический список

1. Мельникова Е.В., Рубинская А.В., Ледяева Н.Я., Петрова А.А. Рециклинг промышленных отходов, как одно из направлений инновационного развития предприятий, в: Инновационное развитие российской экономики // Материалы X Международной научно-практической конференции: в пяти томах, Москва, 25–27 октября 2017 года. Том 2. – Москва: Российский экономический университет имени Г. В Плехнова. 2017. – С. 283-284.
2. Зырянов М.А., Медведев С.О., Швецова И.Г. Комплексное использование древесины: заготовка и переработка (на примере Красноярского края) // *Journal of Agriculture and Environment*. – 2022. – № 7(27).
3. Медведев С.О., Мохирев А.П., Черникова А.В. Особенности внедрения технологий комплексной переработки лесных отходов // *Вестник Алтайской академии и экономики и права*. – 2020. - №9-2. –С.283-288.
4. ГОСТ 10633-2018. Плиты древесно-стружечные и древесно-волокнистые. М., 2018. 14 с.
5. ГОСТ 15815-83. Щепя технологическая. Технические условия. М., 1984. 11 с
6. Петрушева Н.А., Чистова Н.Г., Зарипов З.З., Чижов А.П., Алашкевич Ю.Д. Эффективность использования вторичного волокна в производстве древесно

УДК 536.66 +543.86

МЕТОДЫ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ЛИПИДНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ. ТЕСТИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ.

Н.В. Сизова

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химии нефти
Сибирского отделения Российской академии наук
634055, г. Томск, пр. Академический, 4, тел. (3822)-49-14-57, 8-913-8207359
e-mail: SizovaNV@mail.ru*

В работе рассмотрены методы экстракции природных соединений из растительного сырья, и протестирована их антиоксидантная активность. Содержание антиоксидантов измерено методом микрокалориметрии по регистрации теплоты модельной реакции радикального окисления кумола в присутствии экстрактов. Исследовались масляные, углеводородные, углекислотные экстракты. Показана эффективность докритической углекислотной экстракции при низкой температуре углекислоты (21-24⁰С), и давлении 5,8 до 6,8 МПа. Для увеличения выхода липидных компонентов проведена со-экстракция ягод облепихи и жмыха рапса, и показано, что такая технология позволяет выделить из сырья в два раза больше биологически-активных веществ. Количество антиоксидантов зависит от исходного сырья и метода выделения, максимальные концентрации обнаружены в экстрактах, выделенных углекислотой и углеводородами из жмыхов ягод клюквы, брусники, облепихи (до $5,5 \cdot 10^{-2}$ моль/кг). Применяемая в работе методика оценки качества экстрактов по выходу липидных АО позволяет выбрать наиболее эффективный способ переработки растительного сырья.

Ключевые слова: углекислотная экстракция растительного сырья, кинетический метод определения антиоксидантов, масляная экстракция, природные антиоксиданты.

Природные соединения, которые проявляют себя как антиоксиданты (АО) растительного происхождения, одновременно обладают противовоспалительным, антимикробным, противовирусным действием, поэтому антиоксидантная активность является косвенной оценкой лечебных свойств растительных экстрактов.

Источники природных антиоксидантов. Ранее мы изучали зависимость АО-активности объектов растительного происхождения от способа выделения экстрактов [1]. Установлено, что источниками природных антиоксидантов являются розмарин, шалфей, прополис, кора лиственницы, пелоиды, масла черного тмина и зародышей пшеницы, семена и оболочки ягод и т.д. Концентрация антиоксидантов зависит от технологии проведения экстракции, максимально эффективно использовать в качестве экстрагентов органические растворители (спирт, ацетон, гексан, эфиры), что практикуется в исследовательских лабораториях. Для крупнотоннажной переработки растительного сырья этот способ не подходит, вследствие токсичности и дороговизны растворителей. В последние годы развивается флюидная экстракция углекислотой, которая не уступает по эффективности экстракции органическими растворителями, и позволяет получать в едином технологическом процессе как маслянистую, так и водную фракцию растений. Большой плюс этого вида переработки экстракта - отсутствие термического разложения биологически активных веществ (БАВ), недостатками можно назвать высокие требования к технике безопасности и невозможность селективного выделения компонентов. Углекислота экстрагирует эфирные и жирные масла, восковые фракции, которые при вводе в жирные масла выпадают в осадок. Воскообразные углекислотные экстракты успешнее всего применяются в эмульсионных косметических средствах, где воски являются дополнительным загустителем и активом. Часто для увеличения выхода в экстрактор добавляют органический растворитель, на примере экстракции душистых растений диоксидом углерода авторами работы [2] показано, что самый высокий выход экстрактов был получен с помощью полярных растворителей (ацетона или смеси метанол-вода). Высокую антиокислительную активность проявили эфирные масла

чабреца и шалфея, полученные путём экстракции ацетоном, эти экстракты считаются наиболее перспективными для использования в качестве пищевых антиоксидантов.

В натуральных растительных маслах максимально активными антиоксидантами являются гомологи и стереоизомеры токоферола (ТФ), имеющие в составе структурный фрагмент экранированного фенола, они обладают схожей биологической активностью и объединены в группу «витамина Е» [3]. Для разных образцов одного сорта масла количество витамина Е может быть критерием качества и пищевой ценности, его содержание зависит от способа получения, качества сырья, метода очистки. Например, для подсолнечного масла содержание ТФ изменяется от 64 до 98 мг%, в прессованном при низкой температуре масле витамина Е содержится на 30 % больше, чем в рафинированном, дезодорированном масле [4]. Из изученных жирных масел максимальной АО-активностью обладает масло зародышей пшеницы, содержащее токоферолов до 350 мг%. Широко рекламируемое как анти-канцерогенное и анти-мутагенное действие масло черного тмина (*Nigella sativa* oil), (активные вещества: тимохинон, дитимохинон, тимогидрохинон, тимол, токоферолы) по суммарному количеству АО превышает все остальные масла $(6-9) \cdot 10^{-3}$ моль/кг [4].

Ранее, на примере различных технологий извлечения БАВ из облепихи, мы показали эффективность углекислотной экстракции, максимальной АО-активностью обладает сухой концентрат, обогащенный тритерпеновыми кислотами урсанового и олеананового ряда, востребованными для БАД с гиполипидемическим и противосклеротическим действием, и косметики с противовоспалительной и противовозрастной активностью [5].

Материалы и методы.

Антиоксидантная активность изучалась в соответствии с методиками, применяемыми для исследования объектов растительного происхождения [1,4,5] на модельной реакции радикального инициированного окисления кумола при 60 °С, инициатор - азо-бис-изобутиронитрил (АИБН), скорость инициирования - $w_i = 6.8 \cdot 10^{-8}$ л/моль·с. Метод микрокалориметрии (МК) относится к кинетическим методам и основан на регистрации теплоты модельной реакции инициированного окисления кумола в присутствии синтезированных или природных ингибирующих добавок. Измерения проведены на микрокалориметре, произведенным в ИХН СО РАН по оригинальной конструкции. Определив период индукции модельной реакции окисления кумола в присутствии исследуемого объекта, и можно вычислить количество антиоксидантов по формуле:

$$[AO]_0 = \frac{w_i \cdot \tau_0}{f} \quad (1)$$

где f -коэффициент ингибирования; $[AO]_0$ - начальная концентрация антиоксидантов; w_i - начальная скорость инициирования; τ_0 – период индукции модельной реакции.

Объекты исследования. В настоящей работе тестировались масла, масляные экстракты, углекислотные экстракты, масла косметические с добавкой эфирных масел. Масла предоставлены производителями, куплены в аптечных сетях или изготовлены в процессе работы. Докритическая углекислотная экстракция проведена на оборудовании, спроектированном и изготовленном ИП Колесниченко Е.А. (г. Томск). Рабочее давление в установке, при различной плотности сырья, регулируется от 5,8 до 6,8 МПа. Температура углекислоты, при циркуляционном непрерывном процессе внутри установки, составляет 21-24 градуса, время экстракции может варьироваться от 2,5 часов до 96 часов.

Результаты и их обсуждение.

В табл. 1 приведены результаты определения антиоксидантной активности масел, экстрактов. Экстракция маслом (сырье заливается маслом и несколько дней выдерживается при небольшой температуре), незначительно извлекает биологически активные вещества. Одна из причин неэффективности заключается в окислении масла-основы, особенно это проявляется в экстракции свежесобранной травы, как показывают данные таблицы 1, на примере экстракта зверобоя, содержание АО убывает в два раза. Свежая трава содержит влагу, ферменты липазы, что на свету, при доступе кислорода увеличивает гидролитическое окисление.

Исследовали несколько образцов репейного масла от трех разных производителей. ООО ПКП "Лазурин" производит репейное масло способом экстракции корней лопуха подсолнечным

маслом, течении 3-4 суток, при температуре 45-60 °С. Интересная закономерность обнаружена - чем больше емкость для экстракции, тем больше выход экстрактивных веществ корня лопуха, концентрация АО увеличивается с 1,45 до $1,57 \cdot 10^{-3}$ моль/кг, что эквивалентно ТФ 62 мг% (основа) до 68 мг% (экстракт). ООО «БИОЛИТ» производит масло также экстракцией корней лопуха, и это по нашим данным более эффективно, чем добавка CO₂ экстракта корней лопуха, возможно из-за низкого процента ввода.

Если для производства косметического масла использует минеральное масло, то количество АО будет низким, так, например, в косметическом масле зверобоя (ООО НПФ «МЕДИКОМЕД») АО = $1,1 \cdot 10^{-3}$ моль/кг. А вот при выборе в качестве базового масла семян рыжика ярового (*Camelina sativa*), изначально имеем богатую антиоксидантом-токоферолом основу, и заметим, что добавки эфирных масел АО-статус не меняют, а вот экстракция вместо корней семян лопуха значительно повышает активность готового продукта (табл. 1). Выход CO₂-липидной фракции из сухой травы или ягод может составлять от доли процентов до нескольких процентов, поэтому нами показано, что для увеличения эффективности выхода липидной фракции рекомендуется со-экстракция растительного сырья со жмыхами масличных культур. На примере со-экстракции углекислотой рапса и калины, рапса и жмыха облепихи показано, что выход биологически-активных веществ увеличивается в два раза, по сравнению с экстракцией чистого жмыха облепихи.

Максимальную активность показали масла и экстракты, полученные метилтретбутиловым (МТБЭ) и диэтиловым (ДЭЭ) эфирами, количество антиоксидантов многократно превышает значения для других объектов, особенно в экстрактах ягод, по причине синергизма токоферолов и тритерпеновых кислот урсанового и олеананового ряда.

Таблица 1.

Содержание антиоксидантов в маслах и экстрактах.

Объект исследования, производитель	Способ получения, состав	[АО] 10 ⁻³ моль/кг	Эквив. ТФ, мг%
Масла и масляные экстракты			
Подсолнечное масло, исходное для экстракции	Масло подсолнечное, раф., дезодорированное	1,56	67
Масло репейное ООО «БИОЛИТ», г. Томск	Экстракция корней лопуха подсолнечном маслом	1,78	77
Масло репейное, с добавкой CO ₂ экстракта корня лопуха.	Масло подсолнечное, раф., дезод., CO ₂ экстракт лопуха.	1,56	67
Экстракт масляный облепихи. ООО «БИОЛИТ», г. Томск.	Экстракция ягод облепихи подсолнечном маслом	1,28	55
Масло репейное, экстракция корней лопуха, ООО ПКП "Лазурин", г. Новосибирск	Масло подсолнечное, рафинированное, основа Репейное масло, емкость 100 л Репейное масло, емкость 400 л	1,41 1,45 1,57	62 63 68
Масло зверобой косметическое ООО НПФ «МЕДИКОМЕД»	Натуральное косметическое масло зверобоя	1,1	45
Масла на основе масла семян рыжика ярового (<i>Camelina sativa</i>)			
Масло рыжиковое. ООО ПКП «Провансаль», г. Томск	Масло рыжиковое раф., дез., основа для экстракции. АО 0.5% Controx AP 10	2,06	90-100
Масло рыжиковое раф., дез. с добавками эфирных масел.	Масло рыжиковое раф., дез., масла эфирные масла чайного дерева, лаванды розмарина	2,20	95
Исходное для экстракции масло рыжиковое нерафинированное	Масло рыжиковое нерафинированное	2,60	105-117

Экстракт семян лопуха на нерафинированном рыжиковом масле	Экстракт семян лопуха на нерафинированном рыжиковом масле	3,20	140
Экстракт зверобоя на рыжиковом масле	Экстракция маслом свежесобранной, перетертой травы	1,1	44
Масло рыжиковое с углекислотным экстрактом жмыха клюквы 2%	Масло из семян рыжика, раф., дез., СО-2 экстракт жмыха брусники 2%	9,5	410
Масло с углекислотным экстрактом жмыха брусники 2%	Масло из семян рыжика, раф., дез., СО-2 экстракт жмыха брусники 2%	3,2	140
Углекислотные экстракты			
Докритическая углекислотная экстракция боярышника ИП Колесниченко Е.А., г. Томск	Липидная фракция углекислотного экстракта	2,7	120
Докритическая углекислотная экстракция калины и рапса ИП Колесниченко Е.А., г. Томск	Липидная фракция углекислотного экстракта	4,1	180
Сверхкритическая флюидная экстракция брусника, ягода (ООО НИЦ ГОРО)	Липидная фракция углекислотного экстракта	44,6	1900
Сверхкритическая флюидная экстракция клюква, ягода СО ₂ (ООО НИЦ ГОРО)	Липидная фракция углекислотного экстракта	12,5	530
ИП Колесниченко Е.А. СО ₂ экстракт жмыха облепихи СО ₂ экстракт жмыха облепихи и рапса	Липидная фракция экстракта	5,9	254
	Липидная фракция экстракта	12,1	520
Сухие и углеводородные экстракты			
Масло амаранта сорт Чергинский	Экстракция ДЭЭ семян амаранта	6,3	270
Масло амаранта сорт Кизлярец	Экстракция ДЭЭ семян амаранта	3,4	145
Экстракт шрота клюквы	Экстракция шрота МТБЭ	140	6100
Экстракт шрота брусника	Экстракция шрота МТБЭ	84	3600
Экстракт шрота черники	Экстракция шрота МТБЭ	18,5	860
Сухой экстракт облепихи, обогащенный тритерпеновыми кислотами урсанового и олеананового ряда	Экстракция шрота МТБЭ, сушка	55	2400

Выводы

Установлено, что количество антиоксидантов зависит от исходного сырья и способа экстрагирования. Концентрация антиоксидантов, состоящих из комплекса токоферолов, каротиноидов, тритерпеноидов, липофильных кислот, флавоноидов и др. соединений является хорошим критерием качества и биологической активности экстрактов. Масляная экстракция не эффективно экстрагирует БАВ, при использовании свежесобранного сырья процесс окисления масла-основы сильно ускоряется. Органические растворители максимально активно выделяют АО, но применяются чаще в лабораторной практике. Показано, что СО₂ экстракция является эффективным и экологически чистым способом выделения биологически-активных веществ растительного и животного происхождения. Выход липидной фракции из сухой травы или ягод

может составлять от доли процентов до нескольких процентов, поэтому для увеличения эффективности выхода липидной фракции рекомендуется со-экстракция растительного сырья со жмыхами масличных культур. На примере со-экстракции углекислотой рапса и жмыха облепихи показано, что выход биологически-активных веществ увеличивается в два раза, по сравнению с экстракцией жмыха облепихи. Применяемая в работе методика оценки качества экстрактов по содержанию и активности липидных АО позволяет выбрать эффективную технологию переработки растительного сырья.

Благодарности. Исследование выполнено в рамках Государственного задания ФГБУН Института химии нефти СО РАН, финансируемого Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, проект FWRN-2021-0003.

Библиографический список

1. Сизова Н.В. Оценка эффективности экстракции растительного сырья по содержанию липидных антиоксидантов // Материалы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине». Новосибирск, 1-4 октября, 2013 г. Стр.107-109.
2. Кузьмина Т.Д. Влияние способов экстракции на антиоксидантную активность вытяжек ряда ароматических трав, возделываемых в Литве (Нидерланды) // Пищевая и перерабатывающая промышленность. 2000. №3. С.975.
3. Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты // Успехи химии. 1985, т.LIV, вып.9, с.1540-1558.
4. Sizova Natalia V. Content of Tocopherols as a Criterion of Natural Fatty Oil Quality. // Book of Abstracts 2 Annual Russian-Korean Conference “Current issues of natural products chemistry and biotechnology -2012.-September 18-21 -Novosibirsk— Russia. – P. 150
5. Сизова Н.В. Определение биологической активности облепиховых масел и экстрактов методом микрокалориметрии по выходу липидных антиоксидантов // Химия растительного сырья. 2020. №2. С. 223-230.
6. Патент РФ № 2414234. Способ получения средства, обладающего гипохолестеринимическим и гиполипидемическим действием, из шрота клюквы. Колесникова И.В., Митасов М.М., Оганесян Э.Т., Попов С.А., Терехов А.Ю., Шевцов С.А., Щукин Г.И. БИ №8, 2011.

УДК 663.18 : 676.168

ТРАНСФОРМАЦИЯ МИСКАНТУСА ГИГАНТСКОГО В ПРОДУКТЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА: РАСЧЕТ МАТЕРИАЛЬНЫХ ПОТОКОВ

Е.А. Скиба

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), г. Бийск, Россия.

Рентабельность трансформации целлюлозосодержащего сырья в продукты с высокой добавленной стоимостью достижима только при условии получения коммерческой продукции из всех его компонентов. В данной работе представлен расчет материальных потоков при полной переработке мискантуса гигантского в продукты биотехнологического синтеза с выпуском двух групп платформенных (промежуточных) соединений: С6-сахаров и лигнина. Внутри С6-платформы методами биотехнологии получено два платформенных химических соединения, являющимися базовыми в современной технической химии: биоэтанол и молочная кислота, кроме того, получен важнейший биополимер – бактериальная наноцеллюлоза. С целью обеспечения доброкачественности питательных сред из мискантуса гигантского, продукты биотехнологического синтеза получены через стадию ферментативного гидролиза. Для каждого продукта биотехнологического синтеза исследовано четыре авторских способа предварительной химической обработки мискантуса гигантского, проводимых при атмосферном давлении с использованием разбавленных растворов азотной кислоты и гидроксида натрия. Показана высокая эффективность трансформации мискантуса гигантского в продукты биотехнологического синтеза, достигнуты выходы, близкие к мировым лидерам. Наиболее целесообразным методом предварительной обработки мискантуса гигантского является одностадийная обработка разбавленным раствором азотной кислоты, этот способ позволяет повысить выход биоэтанола на 12-40 %, бактериальной наноцеллюлозы – на 13-30 %, молочной кислоты на 13-28 % по сравнению с другими авторскими способами предварительной обработки.

Ключевые слова: мискантус гигантский, щелочная делигнификация, азотная кислота, ферментативный гидролиз, биоэтанол, бактериальная наноцеллюлоза, молочная кислота.

TRANSFORMATION OF MISCANTHUSIASTUS GIANTUS INTO PRODUCTS OF BIOTECHNOLOGICAL SYNTHESIS: CALCULATION OF MATERIAL FLOWS

Ekaterina A. Skiba

*Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies of the Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Biysk, Russia*

The profitability of the transformation of cellulose-containing raw materials into products with high added value is achievable only if commercial products are obtained from all its components. This paper presents the calculation of material flows for the complete processing of giant miscanthus into biotechnological synthesis products with the release of two groups of platform (intermediate) compounds: C6 sugars and lignin. Within the C6 platform, two platform chemical compounds were obtained by biotechnology methods, which are basic in modern technical chemistry: bioethanol and lactic acid, in addition, the most important biopolymer, bacterial nanocellulose, was obtained. In order to ensure the high quality of nutrient media from giant miscanthus, the products of biotechnological synthesis were obtained through the stage of enzymatic hydrolysis. For each product of biotechnological synthesis, four original methods of preliminary chemical treatment of giant miscanthus were studied, carried out at atmospheric pressure using dilute solutions of nitric acid and sodium hydroxide. High

efficiency of transformation of giant miscanthus into products of biotechnological synthesis is shown, yields close to world leaders are achieved. The most appropriate method of preliminary processing of giant miscanthus is single-stage treatment with a dilute solution of nitric acid, this method allows to increase the yield of bioethanol by 12-40%, bacterial nanocellulose - by 13-30%, lactic acid by 13-28% compared to other author's methods of preliminary processing.

Key words: *Miscanthus giganteus*, alkaline delignification, nitric acid, enzymatic hydrolysis, bioethanol, bacterial nanocellulose, lactic acid

Введение

Многочисленные расчёты показывают, что рентабельность переработки целлюлозосодержащего сырья достигается только при условии получения коммерческой продукции из всех его компонентов: целлюлозы, гемицеллюлоз, лигнина, минеральной составляющей (и других, если они входят в состав конкретного вида сырья) [1, 2]. Это достаточно сложно осуществить на практике. Например, такой успешный и дешёвый способ валоризации целлюлозосодержащего сырья, как серноокислотный гидролиз, приводит к образованию отвалов отработанного лигнина, его накапливается от 50 до 70 % от массы сырья. Активно исследуются и частично внедряются технологии переработки отработанного лигнина, но они ограничены высоким содержанием серы [1, 3, 4].

Радикальным выходом из имеющейся проблемы неполной переработки целлюлозосодержащего сырья в полезные продукты является интеграция принципов зеленой химии и биотехнологии в рамках одного биоперерабатывающего завода, что отвечает концепции экономики замкнутого цикла [5]. Возможности зелёной химии позволяют воздействовать на все компоненты лигноцеллюлозной матрицы, а возможности биотехнологии позволяют получить из целлюлозосодержащего сырья не только биоэтанол, но и продукты с высокой добавленной стоимостью, что обусловлено уникальностью метаболизма продуцентов.

В данной работе представлен расчет материальных потоков при полной переработке мискантуса гигантского в продукты биотехнологического синтеза с выпуском двух групп платформенных (промежуточных) соединений: 1) С6-сахаров, 2) лигнина. Внутри С6-платформы методами биотехнологии получено два платформенных химических соединения, являющимися базовыми в современной технической химии – биоэтанол и молочная кислота, а также важнейший биополимер – бактериальная наноцеллюлоза.

Оборудование и материалы

В качестве сырья был использован мискантус гигантский российской селекции (сорт КАМИС, выведенный Калужским НИИСХ), предоставленный ООО «Мастер Брэнд», г. Москва, Россия. Предобработка сырья была проведена в лабораторных условиях при атмосферном давлении и температуре 90-96 °С авторскими способами в одну или две стадии с получением следующих продуктов химической предварительной обработки:

1) продукт азотнокислой обработки (ПАО) получен обработкой сырья 4 %-ным раствором азотной кислоты в одну стадию;

2) продукт щелочной делигнификации (ПЩД) получен обработкой сырья раствором 4 %-ного гидроксида натрия в одну стадию;

3) техническая целлюлоза, азотнокислый способ (ЦАС) получен в две стадии: путём обработки ПАО 4 %-ным раствором гидроксида натрия;

4) техническая целлюлоза, модифицированный щелочной способ (ЦМЩС) получен в две стадии: путём обработки ПЩД 4 %-ным раствором азотной кислоты.

Все четыре полученных продукта были превращены в раствор сахаров путём ферментативного гидролиза с помощью композиции из ферментных препаратов Целлолюкс-А («Сиббиофарм», Россия) и «Ультрафло Коре» («Novozymes A/S», Дания). Ферментативные гидролизаты были использованы для получения трех продуктов биотехнологического синтеза:

– биоэтанола с помощью *Saccharomyces cerevisiae* Y-3136 (ВКПМ), в условиях, описанных в работе [6]. Начальная концентрация субстрата 60 г/л, в течение 24 ч проводился

ферментативный гидролиз, далее в течение 72 ч совмещенный ферментативный гидролиз и спиртовое брожение;

– бактериальной наноцеллюлозы с помощью *Medusomyces gisevii* Sa-12 (ВКПМ) в условиях, описанных в работе [7]. Начальная концентрация субстрата 30 г/л, биосинтез бактериальной наноцеллюлозы проводился после завершения ферментативного гидролиза;

– молочной кислоты с помощью *Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus* (ООО «Барнаульская биофабрика») в условиях, описанных в работе [8]. Начальная концентрация субстрата 90 г/л, биосинтез молочной кислоты проводился после завершения ферментативного гидролиза.

Работа выполнена с использованием приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН.

Обсуждение результатов

Расчет материальных потоков биотехнологической трансформации мискантуса гигантского приведен в таблице 1. Отражены основные и побочные продукты, при этом расчёт дан в натуральном выражении, без пересчёта масс на абсолютно сухие вещества.

На платформе лигнина возможно получение продуктов по двум направлениям. При извлечении ПАО и ЦАС используется 4 %-ный раствор азотной кислоты, под действием азотной кислоты происходит гумификация органических веществ мискантуса гигантского с получением в жидком виде комбинированного лигногуминового удобрения [9], при десятикратном использовании раствора его продуцируется 2,2 т на 1 т мискантуса и в него переходит ~ 62 % сухих веществ сырья. При извлечении ПЩД и ЦМЩС используется 4 %-ный раствор гидроксида натрия, это классический сценарий, отработанный раствор после десятикратного использования может быть применен для получения бетона повышенной прочности в строительстве [10], либо может быть использован для выделения лигнина и получения его производных [11].

На платформе С6-сахаров из мискантуса гигантского нами получены три продукта биотехнологического синтеза: биоэтанол, бактериальная наноцеллюлоза и молочная кислота. Каждый из продуктов был получен из четырех субстратов: ПАО, ПЩД, ЦАС и ЦМЩС. Поскольку в нативном мискантусе гигантском массовая доля целлюлозы составляет 54 % (что соответствует среднему содержанию в древесине), то на стадии предварительной химической обработки удалось получить неплохие выходы всех четырёх субстратов. Поэтому, несмотря на посредственную эффективность ферментативного гидролиза субстратов из мискантуса, выход продуктов биотехнологической трансформации оказался неплохим.

Выход биоэтанола из мискантуса гигантского в данной работе составляет 14,1-19,8 дал/т, а выход из хвойной древесины 17-18 дал/т [1], т.е. получен хороший выход. На мискантусе сахароцветном нами был достигнут выход биоэтанола 25,2-26,3 дал/т, но для этого мы использовали подпитку, позволившую повысить концентрацию субстрата до 100 г/л [6]; а мировым лидером достигнут выход биоэтанола из мискантуса составил 25,2 -28,4 дал/т при концентрации субстрата 17-20 % [12], поэтому прогноз по высоким выходам биоэтанола из мискантуса гигантского при ферментации с подпиткой положительный.

Таблица 1

Выход основной и побочной продукции, кг из 1 т мискантуса гигантского

Продукция	Способы химической предварительной обработки			
	ПАО	ПЩД	ЦАС	ЦМЩС
Платформа: лигнин				
<i>Основные продукты</i>				
Комбинированное лигногуминовое удобрение	2200	–	2200	–
Отработанный раствор NaOH	–	2200	–	2200
<i>Побочные продукты</i>				
Промывные воды (после HNO ₃)	20000	–	20000	20000
Промывные воды (после NaOH)	–	20000	20000	20000
С6-платформа: биоэтанол				

<i>Основные продукты</i>				
Биоэтанол	155,8	140,0	111,6	139,4
CO ₂	120	107	85	106
<i>Побочные продукты</i>				
Барда	6900	6700	4400	5200
Сивушные масла	0,4	0,7	0,2	0,3
Эфиральдегидный концентрат	0,6	0,7	0,4	0,5
Лютерная вода	230	240	200	210
Сб-платформа: бактериальная наноцеллюлоза				
<i>Основные продукты</i>				
Бактериальная наноцеллюлоза	3550	2950	2725	3137
<i>Побочные продукты</i>				
Отработанная культуральная жидкость	11070	10520	6520	7810
Потери культуральной жидкости на испарение	2390	2220	1500	1780
Промывные воды (после NaOH)	7100	5900	5500	6300
Промывные воды (после HCl)	7100	5900	5500	6300
Сб-платформа: молочная кислота				
<i>Основные продукты</i>				
Молочная кислота	145	113	120	135
<i>Побочные продукты</i>				
Отработанная культуральная жидкость	4855	4687	3080	3665
Гипс	110	85	90	105
ПАО – продукт азотнокислой обработки, ПЩД – продукт щелочной делигнификации, ЦАС – техническая целлюлоза, азотнокислый способ; ЦМЦС – техническая целлюлоза, модифицированный щелочной способ				

В табл. 1 представлен выход бактериальной наноцеллюлозы во влажном состоянии (влажность 99,2 %). Полученный результат близок к описанному в литературе выходу бактериальной наноцеллюлозы из мискантуса сахароцветного [7]. В работе [13] приведена продуктивность бактериальной наноцеллюлозы из мискантуса 14,88 г/л (мискантус предобработан серной кислотой, а затем палып подвергнут ферментативному гидролизу), но выход бактериальной наноцеллюлозы от массы мискантуса не приводится и по материалам работы его посчитать невозможно.

Выход молочной кислоты из мискантуса гигантского составляет 113-145 кг/т, что в 4-5 раз больше, чем в работе [14], где молочная кислота получена из мискантуса путем гидротермической обработки, ферментативного гидролиза и глубинной ферментации с помощью *Rhizopus oryzae*; но это в 4-5 раз меньше, чем было получено из соломы кукурузы в работе [15]. Для трех представленных продуктов биотехнологической трансформации мискантуса гигантского наиболее целесообразным методом предварительной обработки является одностадийная обработка разбавленным раствором азотной кислоты, этот метод позволяет повысить выход биоэтанола на 12-40 %, бактериальной наноцеллюлозы – на 13-30 %, молочной кислоты на 13-28 % по сравнению с другими авторскими способами предварительной обработки.

Заключение

Рассчитаны материальные потоки переработки мискантуса гигантского в продукты биотехнологического синтеза с одновременным получением двух групп платформенных (промежуточных) соединений: Сб-сахаров и лигнина. Показана высокая эффективность конверсии мискантуса гигантского по биотехнологическому маршруту в биоэтанол, бактериальную наноцеллюлозу и молочную кислоту. Наиболее целесообразным методом предварительной обработки является одностадийная обработка мискантуса гигантского разбавленным раствором азотной кислоты, этот метод позволяет повысить выход биоэтанола на

12-40 %, бактериальной наноцеллюлозы – на 13-30 %, молочной кислоты на 13-28 % по сравнению с другими способами предварительной обработки.

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

Библиографический список

1. Холькин Ю.И. Технология гидролизных производств: учебник для вузов. – М.: Лесная промышленность, 1989. – 496 с.
2. Padella M., O'Connell A., & Prussi M. (2019). What is still limiting the deployment of cellulosic ethanol? Analysis of the current status of the sector // *Applied Sciences*. 2019. 9(21). 4523. <https://doi.org/10.3390/app9214523>
3. Zhou, Z., Liu, D., & Zhao, X. (2021). Conversion of lignocellulose to biofuels and chemicals via sugar platform: an updated review on chemistry and mechanisms of acid hydrolysis of lignocellulose // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2021. 146. 111169. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111169>
4. Srivastava, R. K., Nedungadi, S. V., Akhtar, N., Sarangi, P. K., Subudhi, S., Shadangi, K. P., & Govarthanam, M. (2023). Effective hydrolysis for waste plant biomass impacts sustainable fuel and reduced air pollution generation: A comprehensive review // *Science of The Total Environment*. 2023. 859. 160260. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160260>
5. Gani, R., Baldyga, J., Biscans, B., Brunazzi, E., Charpentier, J. C., Drioli, E., ... & Woodley, J. M. (2020). A multi-layered view of chemical and biochemical engineering // *Chemical Engineering Research and Design*. 2021. 155., A133-A145. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2020.01.008>
6. Skiba E.A., Ovchinnikova E.V., Budaeva V.V., Banzaraksaeva S.P., Kovgan M.A., Chumachenko V. A., Mironova G.F., Kortusov A.N., Parmon V.N., Sakovich, G. V. Miscanthus bioprocessing using HNO₃-pretreatment to improve productivity and quality of bioethanol and downstream ethylene // *Industrial Crops and Products*. 2022. 177. 114448. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114448>
7. Skiba E.A., Gladysheva E.K., Golubev D.S., Budaeva V.V., Aleshina L.A., Sakovich G.V., Self-standardization of quality of bacterial cellulose produced by *Medusomyces gisevii* in nutrient media derived from Miscanthus biomass // *Carbohydrate Polymers*. 2021. 252. 117178, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117178>
8. Shavyrkina NA, Skiba EA. Obtaining lactic acid from oat husks // *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021. 11 (1). 99–106. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-99-10621>
9. Skiba E.A., Skiba M.A., Pyatunina O.I. Nitric acid solution after treating miscanthus as a growth regulator of seed peas (*Pisum sativum* L.) in vitro // *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021. 11(3). 413-420. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-413-420>
10. Makul N. Modern sustainable cement and concrete composites: Review of current status, challenges and guidelines // *Sustainable Materials and Technologies*/ 2020. 25. e00155. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2020.e00155>
11. Brienza, F., Cannella, D., Montesdeoca, D., Cybulska, I., & Debecker, D. P. (2024). A guide to lignin valorization in biorefineries: traditional, recent, and forthcoming approaches to convert raw lignocellulose into valuable materials and chemicals. *RSC Sustainability*, 2(1), 37-90. <https://doi.org/10.1039/D3SU00140G>
12. Zhang Y., Oates L.G., Serate J., Xie D., Pohlmann E., Bukhman Y.V., Karlen S.D., Young M.K., Higbee A., Eilert D., Sanford G.R., Piotrowski J.S., Cavalier D., Ralph J., Coon J.J., Sato T.K., Ong R.G. Diverse lignocellulosic feedstocks can achieve high field-scale ethanol yields while providing flexibility for the biorefinery and landscape-level environmental benefits // *GCB Bioenergy*. – 2018. – P. 1-16. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12533>
13. Son, J.; Lee, K.H.; Lee, T.; Kim, H.S.; Shin, W.H.; Oh, J.-M.; Koo, S.-M.; Yu, B.J.; Yoo, H.Y.; Park, C. Enhanced Production of Bacterial Cellulose from Miscanthus as Sustainable Feedstock through Statistical Optimization of Culture Conditions. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2022, 19, 866. <https://doi.org/10.3390/ijerph19020866>
14. Gunes K, Sargin S, Celiktas MS (2023) Investigation of lactic acid production by pressurized liquid hot water from cultivated Miscanthus × giganteus. *Prep Biochem Biotechnol* 53:22–30. <https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2035745>
15. Chung, M. R. W. Y., Tan, I. S., Foo, H. C. Y., Lam, M. K., & Lim, S. (2023). Potential of macroalgae-based biorefinery for lactic acid production from exergy aspect. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(4), 2623-2653. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01375-3>

УДК 547.458.61

ПОЛУЧЕНИЕ ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ КРАХМАЛА И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ

З.К. Таганбекова, А.А. Мещанинова, В.И. Маркин
Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

В работе представлены данные по получению и изучению гидрогелей, изготовленные из крахмала с лимонной кислотой в качестве сшивающего агента в концентрации от 1,2% до 19,8% (от массы крахмала) при разном времени синтеза. Наибольшей водопоглощающей способностью обладают гидрогели с гидромодулем 1 : 10 и количеством лимонной кислоты 2,5% и 5% (от массы крахмала) в условия синтезирования 5 часов. Также изучение кинетики набухания, показало, что максимальная водопоглощающая способность гидрогеля достигается в течение первых 4 ч нахождения в воде. Для образца с лучшим показателем водопоглощения были определены реологические свойства.

Ключевые слова: крахмал, лимонная кислота, гидрогель, водопоглощение, кинетика набухания, реологические свойства.

Гидрогели на основе полисахаридов становятся предметом повышенного интереса в сфере разработки биоматериалов, имеющим определенные управляемые свойства. Гидрофильные гидрогели на основе натурального крахмала, чистого крахмала и его производных играют важную роль благодаря способности поглощать воду, биосовместимости и биоразлагаемости [4]. Благодаря наличию сшивающих агентов, процесс гелеобразования значительно улучшается, что приводит к более качественному гелеобразованию и более мягким условиям синтеза. На процесс гелеобразования может влиять: химические свойства полимеров, их молекулярная масса и химическая структура, концентрация растворителя в жидкости, поглощенная доза и атмосфера [3].

Крахмал, благодаря своей доступности и низкой стоимости как возобновляемого ресурса, часто применяется в качестве компонента для создания сополимеров в составе гидрогелей на полимерной основе. Для придания крахмалу гомогенной структуры его подвергают предварительной желатинизации с помощью тепловой обработки, что необходимо для последующей сополимеризации. [1].

Лимонная кислота может использоваться в качестве сшивающего агента в производстве сверхпоглощающих гидрогелей. Сшивание — это процесс, при котором отдельные полимерные цепи соединяются, образуя трехмерную сетку, которая может удерживать воду. Когда концентрация сшивающего агента, такого как лимонная кислота, увеличивается, количество доступных для связывания воды уменьшается, поскольку больше воды удерживается внутри сетчатой структуры гидрогеля. Это приводит к уменьшению потребления воды гидрогелем, что является характерной чертой сверхпоглощающих полимеров. Они способны поглощать и удерживать воду в количествах, многократно превышающих их собственный вес, но при этом с увеличением степени сшивания их способность к поглощению воды может снижаться.

Полимерные гидрогели обладают важнейшей способностью водопоглощения. Поэтому актуальной задачей считается нахождение таких условий синтеза гидрогелей, благодаря которым влагопоглощающая способность образцов увеличивается на 1000% и выше. Цель настоящей работы – синтез и изучение свойств полимерных гидрогелей на основе крахмала, поперечно сшитых лимонной кислотой.

Для синтеза крахмал желатинизировали (гидромодуль 10). Затем, в полученный полимерный раствор добавляли от 1,2% до 19,8 % (относительно массы крахмала) сшивающий агент – лимонная кислота (ЛК) – путем перемешивания при температуре 50 °С в течение 1-5 ч [2]. Продукт дегидратировали безводным этанолом. Обезвоженный образец сушили на открытом воздухе.

Как можно увидеть на рис. 1, что наибольшую влагопоглощающую способность имеют образцы с концентрацией крахмала 10 % (от массы воды), лимонной кислоты 2,5% и 5 % (от массы крахмала) и при условии 5 ч синтеза -239% и 258% соответственно. Продукты полученные при таком же соотношении крахмала и лимонной кислоты, но при времени синтеза менее 5 ч, проявляют меньшее водопоглощение, следовательно оптимальное время синтеза не менее 5 ч. Также при данном времени синтеза, установлено что оптимальная концентрация лимонной кислоты варьируется от 2,5 до 5%, дальнейшее увеличение сшивающего агента, как и говорилось ранее приводит к снижению водопоглощающей способности.

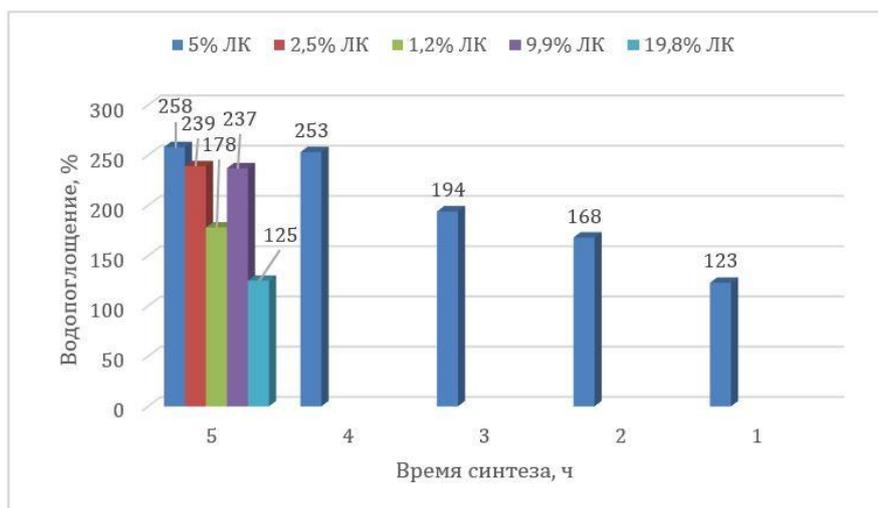


Рисунок 1. Водопоглощающая способность отвержденных образцов на основе крахмала с различной концентрацией лимонной кислоты и временем синтеза. ЛК – лимонная кислота

Также была изучена кинетика набухания образцов гидрогеля. Установлено, что максимальная водопоглощающая способность гидрогеля достигается в течение первых 4 ч нахождения в воде. Причем, изменение водоудерживающей способности проходит через максимум. Определено количество циклов набухания – высушивания всех полученных образцов. Установлено, что на протяжении 3 месяцев после 18 циклов набухания – высушивания образцы не потеряли своих водопоглощающих свойств. Для образца, обладающего наилучшим водопоглощением, исследовано изменение реологических свойств системы крахмал – лимонная кислота во время протекания химической реакции при 50 °С в течение 4 ч. За все время реакции вязкость системы снижалась (рис. 2). Причем максимальное снижение наблюдалось в первые 15–20 мин, что свидетельствует о протекании химического взаимодействия с образованием новых соединений, что приводит к формированию трехмерной сетчатой структуры гидрогеля.

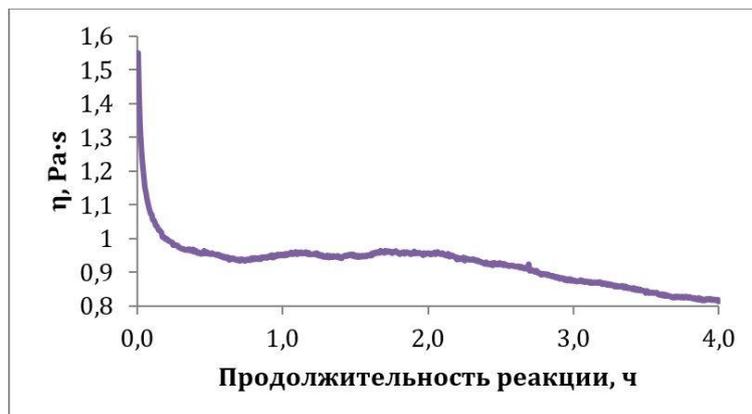


Рисунок 2. Реологические свойства гидрогеля крахмал 10% (от массы воды) и лимонная кислота 5% (от массы крахмала) при 50 °С в течение 4 ч

В полученных гидрогелях подтвердили образование поперечной сшивки, с помощью ИК-спектроскопического исследования. Анализ показал увеличение интенсивности полосы поглощения в области $1790\text{--}1650\text{ см}^{-1}$ свидетельствует о том, что образуются новые сложноэфирные связи. Предположительно при образовании поперечной сшивки сперва протекает реакция этерификации между гидроксильными группами структурного звена крахмала и карбоксильной лимонной кислоты (рис. 3). А после происходит сшивание между образовавшийся молекулой с другим структурным звеном крахмала (рис. 4).

Так как в структурном звене крахмала есть несколько гидроксильных групп, как первичных, так и вторичных, возможно образование сразу нескольких связей по гидроксильным группам в положение 2, 3 и 6, что может делать структуру гидрогеля более плотной. Наиболее вероятно образование сложноэфирной связи в положение 6, так как наиболее реакционноспособными в кислой среде являются первичные гидроксильные группы благодаря большей доступности, они легче образуют сложные эфиры.

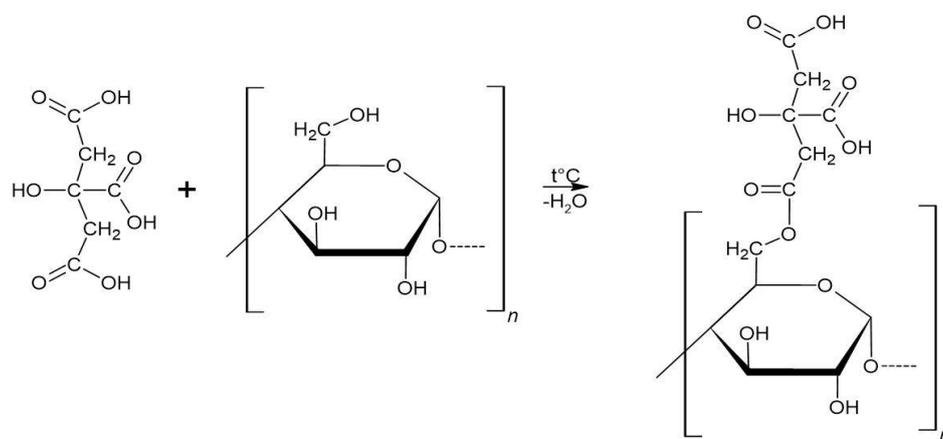


Рисунок 3. Схема одного из возможных вариантов реакции этерификации крахмала с лимонной кислотой по одной ОН-группе в 6 положении

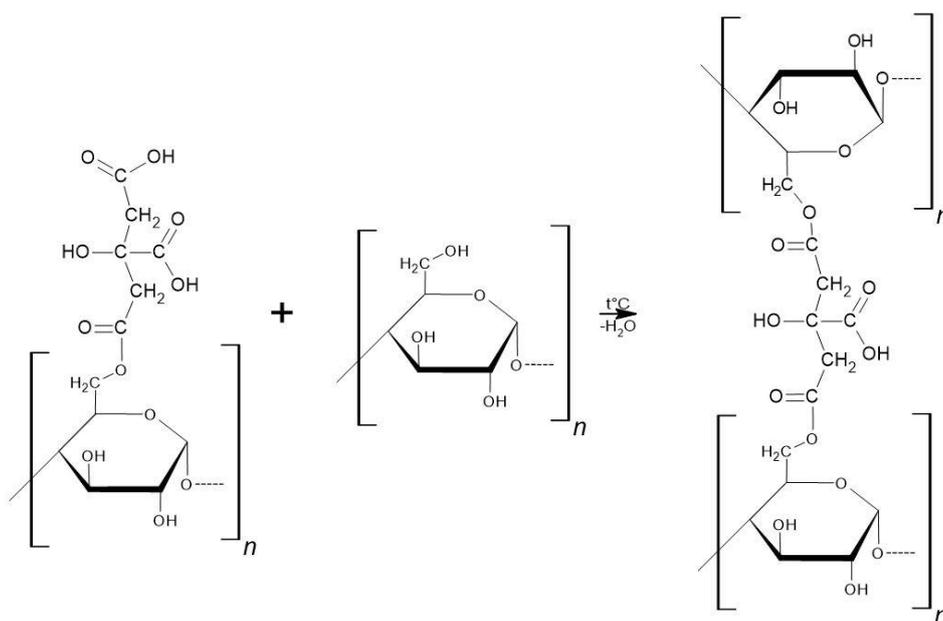


Рисунок 4. Схема одного из возможных вариантов сшивания полимерных цепей крахмала лимонной кислотой в 6 положении

Библиографический список

1. Холназаров Б.А., Тўраев Х.Х., Ширинов Ш.Д., Джалилов А.Т. Синтез суперабсорбентного гидрогеля на основе крахмала, акриловой кислоты и монтмориллонита // *Universum: технические науки*. – М., 2019. – № 8(65). – С. 11–16.
2. Холназаров Б.А., Тураев Х.Х., Ахатов А.А. Синтез и характеристика биоразлагаемых гидрогелей на основе крахмала и лимонной кислоты // *Universum: химия и биология*. — 2020. — № 10. — С. 37-40.
3. Kholnazaev B.A., Turaev Kh.Kh., Dzhililov A.T. Synthesis of starch, acrylamide, acrylic acid and montmorillonitebased superabsorbent polymer composite // *Austrian Journal of Technical and Natural Sciences*. – 2019. – № 5–6. – P. 69–73.
4. Posocco Bianca, Dreussi Eva, Jacopo de Santa, Polysaccharides for the Delivery of Antitumor Drugs // *Materials*. – 2015. – Vol. 8. –P. 2569-2615.

МАССОПЕРЕНОС В ПРОЦЕССАХ ОКИСЛЕНИЯ НАТИВНЫХ ЛИГНИНОВ В ВАНИЛИН КИСЛОРОДОМ

В. Е. Тарабанько, К. Л. Кайгородов, М. А. Смирнова

Институт химии и химической технологии СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

Установлено, что в процессах окисления нативных лигнинов растительного сырья (лен, сосна) кислородом при 160 °С в ванилин и целлюлозу увеличение интенсивности массопереноса приводит к переходу от лимитирующей стадии диффузионного переноса кислорода через поверхность газ-жидкость к стадиям диффузии внутри твердых частиц сырья. Получение максимальных, теоретических выходов ванилина возможно в диффузионном режиме при обоих названных режимах диффузионного лимитирования.

Ключевые слова: ванилин, целлюлоза, костра льна, сосна, окисление, катализ, массоперенос.

Введение

Переработка сельскохозяйственных и древесных отходов в ценные химические продукты – активно развиваемая область исследований. Следует отметить, что немалая часть такого сырья является отходами механической переработки травянистых растений или древесины. Такие лигнины имеют структуру и реакционную способность нативных, в отличие от, например, конденсированных крафт-лигнинов, отходов сульфатной варки целлюлозы. Это предопределяет возможности получения высоких выходов различных монофенольных продуктов в процессах окисления и гидрогенизации лигнинсодержащих сельхозотходов.

Ассортимент сельскохозяйственных отходов достаточно велик, один из них – костра льна. Она образуется в процессе переработки льна в целлюлозное волокно в количестве около 70% от массы льна-сырца и характеризуется высоким содержанием лигнина (20-28%) и хорошим выходом (до 20%) ароматических альдегидов, ванилина и сиреневого альдегида, в процессах ее окисления нитробензолом [1].

Влияние диффузионного контроля и интенсивности массопереноса на скорость и селективность процесса окисления лигнинов молекулярным кислородом количественно не изучено [2]. В работе [3] впервые установлены количественные закономерности влияния интенсивности массопереноса на скорости поглощения кислорода и накопления ванилина:

$$\ln W_{O_2} = 1.87 \ln N + a \quad (1)$$

$$\ln W_V = 1.86 \ln N + b \quad (2)$$

где W_{O_2} и W_V – скорости поглощения кислорода и накопления ванилина соответственно, моль/мин, и N – скорость вращения мешалки, мин⁻¹. Эти зависимости объясняются лимитированием скорости процесса в целом скоростью диффузии кислорода через жидкий диффузионный слой у поверхности раздела фаз газ-жидкость.

В настоящей работе изучено влияние условий массопереноса на природу лимитирующей стадии и селективность рассматриваемого процесса.

Результаты и обсуждение

Влияние объема реакционной массы на процесс каталитического окисления костры льна. В табл. 1 представлены результаты по влиянию объема реакционной массы неизменного исходного состава при постоянной скорости мешалки на основные характеристики процесса окисления костры льна: динамику поглощения кислорода и его объем, обеспечивающий максимальный выход ванилина, динамику накопления ванилина и его максимальные выходы, а также на выходы побочного продукта окисления, лигнокислот.

Наиболее важный результат, следующий из этого массива данных, состоит в том, что интегральные показатели процесса, скорость и количество поглощенного кислорода (ммоль/мин и ммоль соответственно, табл. 1), выходы ванилина и лигнокислот в граммах (табл. 1) почти не зависят от объема реакционной массы. В диапазоне объемов 300-600 мл они колеблются в пределах $\pm 10-15\%$ и менее (Табл. 1).

Простое и естественное объяснение этому результату находится в рамках модели, связывающей скорость химического процесса, лимитируемого процессами массопереноса, с плотностью мощности перемешивания [3], в рамках которой интегральные (массовые) расходы реагентов и выходы продуктов равны произведению концентрации на объем, т.е. не зависят от объема реакционной массы:

$$W_{O_2} = a_3 P_0 = a_3 (P_0/V)V \quad (3)$$

где P_0/V – плотность мощности перемешивания, отношение мощности мешалки к объему реакционной массы.

Таблица 1.

Влияние объема реакционной массы на поглощение кислорода и выходы ванилина и нерастворимых лигнокислот (ЛК), образующихся при окислении костры льна (160 °С, 0,2 МПа кислорода, мешалка 8 ватт, по 5 мас. % костры и щелочи, катализатор - CuO).

Объём, мл	Поглощение кислорода, 40 мин, ммоль	Скорость поглощения кислорода, ммоль/мин	Выход ванилина, г	Выход ЛК, г	Выход ванилина, мас.% на лигнин	Выход ЛК, мас. % на лигнин
200	228	4,79	0,302	1,36	12,3	49
300	263	4,99	0,528	1,89	14,4	45
400	246	5,06	0,492	2,2	10,0	39
600	288	6,03	0,508	2,36	6,9	28
Средние значения в диапазоне 300-600 мл	266±14	5,36±0,45	0,51 ± 0,02	2,13±0,23	-	-

Полученные результаты показывают, что для заданной скорости перемешивания существует некоторый диапазон объемов реакционной массы ($V_{\max}/V_{\min} = 2-3$), в котором объем и интегральные скорость поглощения кислорода (ммоль/мин), выходы ванилина (г) и лигнокислот (г) определяются мощностью перемешивания и от объема реакционной массы не зависят [3,4]. По этой причине существует еще более узкий диапазон объемов реакционной массы около 300 мл, в котором выход ванилина в расчете на лигнин максимален, а расходы реагентов в расчете на получаемый ванилин, следовательно, минимальны.

Влияние скорости перемешивания и объема реакционной массы на скорости гомогенизации водной фазы и сорбции щелочи взвесью порошка костры льна. В рассматриваемом процессе можно выделить несколько стадий массопереноса, существенных для анализа кинетики рассматриваемого процесса, и важнейшие из них – массоперенос через диффузионные слои и границы раздела фаз газ-жидкость и жидкость-твердое (поверхность частицы костры льна), диффузия в объеме частицы костры, а также принудительный массоперенос перемешиванием в объеме жидкой фазы. Далее будет последовательно рассмотрена динамика перечисленных стадий процесса окисления костры льна в ванилин в модельных условиях и сделаны выводы о лимитирующих стадиях процесса.

Среди стадий массопереноса в многофазных процессах стадия выравнивания концентраций растворимых реагентов и продуктов в объеме (здесь и далее – гомогенизация водной фазы), обычно считается самой быстрой [4]. Экспериментально скорость гомогенизации оценивали по продолжительности выравнивания цвета индикатора (фенолфталеина), введенного

в реакционную массу после быстрой загрузки небольшого объема щелочи [4]. Полученные результаты (Рис. 1) показывают, что продолжительность процесса гомогенизации (0,7-4 сек) принципиально, на три-четыре порядка, меньше продолжительности исследуемого процесса окисления (20-40 мин). Следовательно, стадия гомогенизации водной фазы в процессе окисления лигнинов в ванилин и сиреневый альдегид не лимитирует процесс в целом и водная фаза в этих процессах гомогенна, т.е. концентрация реагентов в ее объеме постоянна в заданный момент времени.

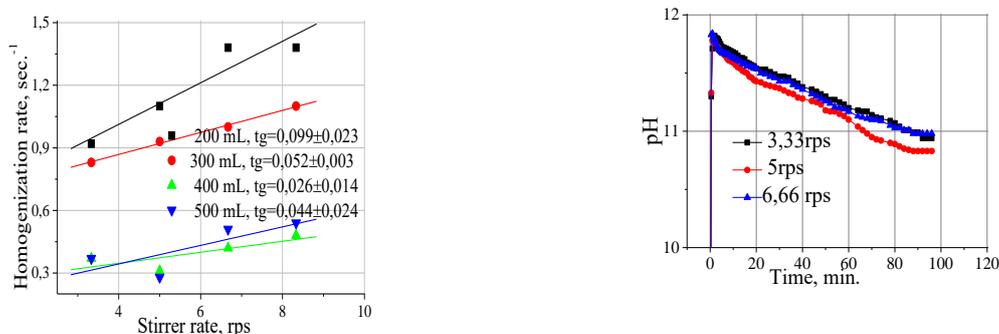


Рис. 1. Влияние скорости перемешивания на скорость гомогенизации, выравнивания концентрации щелочи в объеме водной фазы (а) и на кинетику изменения рН после добавления щелочи к взвеси порошка костры льна в воде (б).

Последние ступени массопереноса в процессе образования ванилина – диффузия реагентов и продуктов в твердой пористой матрице костры льна. Для оценки этих скоростей мы выбрали и использовали простейшую модель – диффузию щелочи в этот субстрат и в этом субстрате. В суспензию костры в воде заливали раствор щелочи и рН-метром регистрировали зависимость рН водной фазы от времени. Первая ступень процесса, выравнивание концентрации щелочи в растворе, протекает быстро и рассмотрена выше (Рис. 1а, 1-4 секунды). Далее протекают намного более медленные процессы диффузии щелочи в капиллярной системе твердых частиц костры льна и, возможно, в твердой фазе (десятки минут, рис. 1б). Наблюдаемая зависимость рН от времени линейна и, следовательно, может быть интерпретирована кинетикой реакции первого порядка, в рамках которой период полупревращения реагента равен 27-29 минут, и он не зависит ни от скорости перемешивания, ни от объема реакционной массы. Это означает, что взаимодействие костры со щелочью определяется скоростью диффузии внутри частиц костры и не лимитируется диффузией щелочи из объема жидкой фазы к внешней поверхности частиц костры льна.

Основной вывод рассмотренного раздела состоит в том, что при плотностях мощности перемешивания, реализованных на двигателе мешалки 8 ватт внутренняя диффузия реагентов и продуктов в частицах костры льна протекает со скоростями, сравнимыми со скоростью процесса окисления в целом, но не лимитирует процесс. Внешнедиффузионный перенос реагентов на границе раздела фаз жидкость-твердое так же не лимитирует процесс в целом. В кинетической схеме процесса окисления костры льна кислородом эти стадии протекают после лимитирующей и по этой причине их скорости равны скорости лимитирующей стадии массопереноса кислорода через диффузионный слой у поверхности раздела фаз газ-жидкость.

Процесс в режиме высокоинтенсивного массопереноса. Рассмотренные выше результаты получены в условиях с невысокой плотностью мощности перемешивания (магнитная мешалка мощностью 8 ватт). Совокупность полученных результатов показывает, что в этих условиях процесс в целом лимитируется массопереносом кислорода из газовой фазы в водную. Возникает вопрос о возможности интенсификации процесса путем повышения эффективности массопереноса вплоть до исключения стадии переноса кислорода в объем жидкой фазы в качестве лимитирующей процесс. Представленные ниже результаты получены на автоклаве с пропеллерной мешалкой и двигателем мощностью 200 ватт.

На рис. 2 даны кривые поглощения кислорода в зависимости от времени для различных скоростей пропеллерной мешалки (200-1200 мин⁻¹). Зависимость скорости поглощения кислорода от скорости вращения мешалки в логарифмических координатах линейна и имеет тангенс угла наклона $\text{tg } \phi = 1,12$, меньший по сравнению с полученным в реакторе с менее интенсивным перемешиванием ($\text{tg } \phi = 1,88$, уравнения (1), (2)) [3]. В рассматриваемой системе это изменение означает, что стадия массопереноса кислорода через диффузионный слой у границы раздела фаз газ-жидкость уже не лимитирует процесс. Следовательно, скорости стадий диффузии кислорода у границ раздела фаз и внутренней диффузии растворяющихся олигомеров лигнина из матрицы костры льна сравнимы между собой.

Время выхода концентрации ванилина на максимум (рис. 3) в реакторе интенсивного перемешивания (25-30 мин) при высокой скорости перемешивания (1200 мин⁻¹) близко к продолжительности процесса в реакторе с низкой интенсивностью перемешивания (рис. 3, 30-40 мин). Сопоставление зависимостей скоростей поглощения кислорода и накопления ванилина от интенсивности перемешивания показывает, что в реакторе интенсивного перемешивания накопление ванилина лимитируется стадиями внутренней диффузии, а в реакторе с низкой интенсивностью перемешивания – стадией массопереноса кислорода через диффузионный слой у границы газ-жидкость. По этой причине в условиях низкой интенсивности массопереноса скорость накопления ванилина зависит от скорости вращения мешалки [3], а при высокой интенсивности – нет (рис. 3).

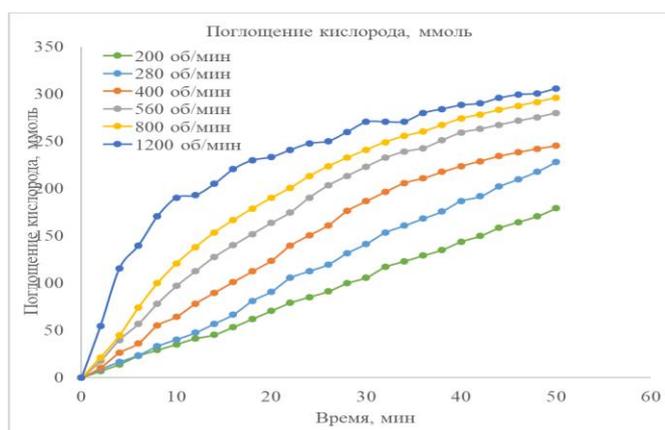


Рис. 2. Зависимости поглощения кислорода от продолжительности процесса и скорости перемешивания в условиях интенсивного массопереноса (турбинная мешалка, двигатель 200 ватт).

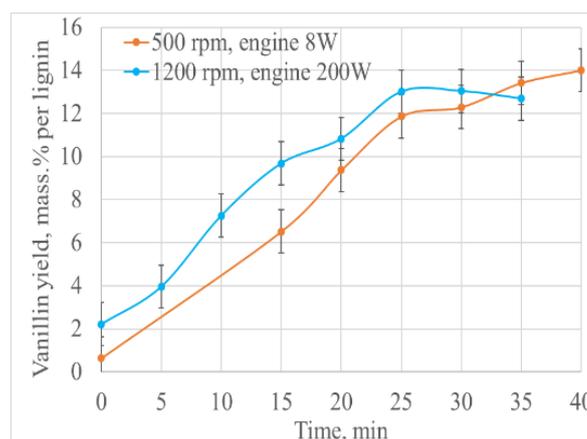


Рис. 3. Зависимости накопления ванилина от продолжительности процесса в условиях интенсивного (голубая линия) и умеренного (красная линия) массопереноса.

Максимальные выходы ванилина в расчете на лигнин в обоих режимах массопереноса, высокоинтенсивном и малой интенсивности, практически не различаются (рис. 3, 13-14%). Следовательно, эффективное проведение процесса окисления нативных лигнинов в ароматические альдегиды возможно в режиме диффузионного лимитирования переноса кислорода у границы раздела фаз газ-жидкость с невысокой интенсивностью массопереноса и энергозатратами.

Заключение

Проведенное постадийное исследование кинетики процесса окисления костры льна в ванилин приводит к следующим выводам:

- (1) - стадия гомогенизации, выравнивания концентраций реагентов в объеме жидкой фазы, протекает очень быстро (1-4 сек) и в этой изотропной водной фазе протекает основная часть реакций окисления;
- (2) – стадии внутренней диффузии щелочи и, следовательно, кислорода в пористые твердые частицы костры, а также осколков макромолекулы лигнина из частиц костры протекают намного медленнее стадии гомогенизации, со скоростями, сопоставимыми со скоростями

процесса окисления в целом; однако, при невысоких плотностях мощности перемешивания эти стадии не лимитируют процесс. В твердой фазе при 160 °С под действием щелочи и кислорода протекают процессы делигнификации, растворения лигнина. Медленной стадией процессов у этой границы раздела фаз, по нашему мнению, является диффузия растворимых фрагментов лигнина из частицы костры к ее внешней поверхности, внешнедиффузионному слою. Переход из этого диффузионного слоя в объем жидкой фазы протекает быстрее и не лимитирует процесс.

(3) - изученный процесс в целом контролируется диффузионным переносом кислорода через поверхность раздела фаз газ-жидкость при невысоких плотностях мощности перемешивания (двигатель магнитной мешалки 8 ватт);

(4) – при повышении интенсивности массопереноса (двигатель пропеллерной мешалки 200 ватт) процесс не переходит в кинетический режим: включается лимитирование стадиями внутренней диффузии реагентов и промежуточных продуктов в частицах костры льна или иного лигноцеллюлозного материала (характерное время – десятки минут), и эти стадии от скорости перемешивания не зависят. По этой причине можно сформулировать следующую гипотезу: процессы окисления лигнинов кислородом, протекающие при 160 °С в течение десятков минут, протекают в диффузионно-контролируемом режиме.

Отметим минимум три причины, благодаря которым нами в диффузионном режиме достигнут теоретический предел выхода ванилина в каталитическом окислении нативного лигнина сосны молекулярным кислородом [2,5]. Во-первых, в найденных условиях скорости расщепления нативного лигнина в твердой матрице, окисления и выхода продуктов деструкции в раствор и их последующего окисления значительно превышают скорости конденсации лигнина. Во-вторых, несмотря на диффузионные ограничения скорости процесса, окисление в основном протекает в гомогенной водной фазе без градиентов концентрации реагентов и продуктов, которые могут снижать селективность окисления. Третья причина высоких выходов альдегидов заключается в том, что феноксильный радикал, образующийся при одноэлектронном окислении аниона ванилина, способен окислять другие фенолят-анионы лигнина, и это равновесие сдвинуто в сторону исходного аниона ванилина [2].

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания Института химии и химической технологии СО РАН (проект FWES-2021-0017) с использованием оборудования Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН.

Библиографический список

1. Buranov A.U., Mazza G. Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial crops and products*. 2008, v. 28, p. 237–259.
2. Tarabanko, V.E.; Tarabanko, N. Catalytic oxidation of lignins into the aromatic aldehydes: general process trends and development prospects. *Int. J. of Molecular Sciences*, 2017, 18, 2421.
3. Tarabanko V.E., Vigul D.O., Kaygorodov K.L., Kosivtsov Y., Tarabanko N., Chelbina Y.V. Influence of mass transfer and acid prehydrolysis on the process of flax shives catalytic oxidation into vanillin. *Biomass Conversion and Biorefinery*. - 2022. - DOI: 10.1007/s13399-022-02366-8.
4. Брагинский Л.Н., Бегачев В.И., Барабаш Е.М. Перемешивание в жидких средах. Ленинград. Химия, 1984, с. 91.
5. Tarabanko V.E., Kaygorodov K.L., Vigul D.O., Tarabanko N., Chelbina Y.V., Smirnova M.A. Influence of Acid Prehydrolysis on the Process of Wood Oxidation into Vanillin and Pulp. *J. Wood Chem. Techn.*, 2020. V. 40, Iss. 6, p. 421-433. DOI 10.1080/02773813.2020.1835984.

ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВ ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПЕРЕРАБОТКИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

К.А. Тараскин¹, Е.К. Барнашова², Е.А. Вертикова², А.Д. Симагин²

¹ *Научно-исследовательский институт прикладной акустики, Московская область, г. Дубна, Россия*

² *Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, г. Москва, Россия*

Успешное развитие современных природоохранных технологий может в значительной степени способствовать сохранению природных богатств Большого Алтая. Важным направлением сохранения лесных массивов может считаться замена древесного сырья в промышленной технологии производства целлюлозы альтернативными источниками на основе травяных растений сельскохозяйственного назначения, значительная часть биомассы которых не находит полезного применения и безвозвратно утилизируется. В настоящем исследовании приведены данные, полученные в результате проведения полевых экспериментов, подтверждающие перспективность возделывания льна-долгунца – потенциального источника целлюлозосодержащего сырья, на посевных площадях различных регионов, при задействовании малопродуктивных типов почв и в условиях неблагоприятного воздействия климатических факторов сезонного характера. Приведены результаты эксплуатации опытной технологической установки по переработке сырья растительного происхождения; полученные результаты явились исходным материалом для проведения сравнительной оценки бисульфитного и пероксидно-щелочного методов выделения целлюлозы из соломы льна. Показана экологическая целесообразность применения промышленной технологии, при реализации которой не образуются серосодержащие сточные воды. Полученные данные могут быть использованы при планировании природоохранных мероприятий на территории Большого Алтая и других регионов Российской Федерации.

Ключевые слова: Экологическая безопасность, лён-долгунец, целлюлоза, переработка растительного сырья, производственные отходы.

Сохранение уникальных природных богатств Большого Алтая является задачей первостепенной важности. Значение этой проблемы многократно возрастает в условиях всеобъемлющего расширения сфер промышленного и агротехнического освоения обширных территорий, в том числе и тех, которые до недавнего времени считались малопригодными для масштабного использования. В этих условиях чрезвычайно возрастает роль новых природосберегающих технологий, минимизирующих ущерб природным биоценозам.

Наиболее серьёзный ущерб природному хозяйству Большого Алтая наносят вырубки лесов. Значительная часть древесины, предназначенной для промышленной переработки, расходуется в качестве сырьевого источника на производство целлюлозы. При анализе технологических процессов, осуществляемых на целлюлозно-бумажных комбинатах (ЦБК), наибольшее распространение получили сульфатный, сульфитный и бисульфитный способы переработки древесины. Существенным преимуществом этих методов является возможность переработки практически любых видов древесного сырья из хвойных и лиственных пород. Известно, что в процессе деятельности наиболее крупных предприятий ЦБК, в результате осуществления технологических операций, образуются побочные отходы производства, которые загрязняют природные водоемы сточными водами с содержанием сульфитных и сульфатных щелоков, волокнами древесины, корой и прочими древесными отходами, а также, кислотами и щелочами, активным хлором, дурно пахнущими веществами. Поэтому, в экологическом отношении, наиболее перспективны окислительные методы получения

целлюлозы — кислородно-содовый или пероксидно-щелочной, при реализации которых не используются серосодержащие реагенты и образуется меньшее количество опасных отходов.

В тоже время, существуют альтернативные сырьевые источники взамен древесины [1], к числу которых могут относиться однолетние травяные растения [2, 3]. Несмотря на то, что по содержанию целлюлозы травяное сырьё несколько уступает древесине [4], необходимо учитывать следующий факт: травянистая продукция восполняется ежегодно, в то время как для полноценного вызревания древесины необходим срок не менее 20 лет. В сельскохозяйственном производстве значительная часть выращиваемой растительной биомассы остаётся невостребованной. Например, солома зерновых культур [5] используется лишь в незначительной степени в животноводстве и ряде смежных направлений, а в основной массе запахивается по окончании сезонных работ или сжигается. Аналогично, при возделывании льна масличных культур [6], востребованным является семенной материал растений – источник ценного пищевого и технического продукта – льняного масла; прочие части растений льна, составляющие порядка 80% от общей массы, как правило не находят широкого практического применения [7] и безвозвратно утилизируются.

Учитывая, что урожайность биомассы травяных культур составляет в среднем $1,0 \div 1,5$ т/га волокна, потенциал производства целлюлозы из этих культур в стране составляет по самым скромным оценкам 40 - 50 тыс. тонн [8], что свидетельствует о целесообразности разработки этого направления. В экспериментальном варианте испытывались самые различные варианты технологической реализации процесса переработки растительного сырья с целью его делигнификации и выделения целлюлозы. Однако, производства в промышленном масштабе до сих пор не реализованы. Одной из причин такого положения можно считать отсутствие серьёзных аргументов в вопросе экологических преимуществ переработки травяного сырья по сравнению с древесным.

Цель работы: обоснование и экспериментальная оценка перспективных направлений в области агротехники и выборе технологий, обеспечивающих сохранение природных биоценозов и реализацию программ региональной экологической безопасности.

Методы и методики исследования

К настоящему времени проведены исследования по оценке перспектив использования различных видов травяных культур в качестве сырьевых источников для получения целлюлозы. С точки зрения урожайности растительных культур, неоспоримым преимуществом обладает мискантус [9] – многолетнее травяное растение, районированное для возделывания в условиях умеренного климата. В работе [10] проведён сравнительный анализ качества целлюлозы, получаемой из мискантуса и соломы льна. Представленные данные указывают на незначительное расхождение показателей, полученных при реализации идентичной технологии делигнификации биоматериала. Исходя из этого факта, с нашей точки зрения, в качестве сырьевого источника наилучшие перспективы может иметь лён, как объект, выращиваемый, в основном, для получения масла, одновременно создающий ежегодно значительные количества побочного продукта – соломы; в отличие от мискантуса, требующего целенаправленного выращивания для получения целлюлозосодержащего сырья.

В рамках настоящего исследования производилась высадка льна в различных регионах, имеющих различия по составу почв и характеру климатических особенностей: в Саратовской и Тверской областях. Состояние почвенных ресурсов как в Тверской, так и в Саратовской областях, остаётся достаточно проблематичным с точки зрения перспектив развития высокопродуктивного землепользования. Для Тверской области основными типами почв являются: дерново-среднеподзолистые, торфяно-подзолисто-глеевые, болотные, подзолисто-болотные и аллювиальные (пойменные) дерновые. В Саратовской области почвенный покров отражает характер ландшафтно-территориального разнообразия; в зависимости от степени возрастания засушливости климата, происходящего по вектору с северо-запада области на юго-восток, существенным образом изменяются структурные признаки почвы. Кроме того, около 50% пахотных земель в зоне чернозёмов, являющихся лучшими почвами по своим агрономическим свойствам, подвержено процессами эрозийной деградации.

Результаты и их обсуждение

Полевые эксперименты были проведены в 2023 году. Климатические характеристики по местам высева льна в 2023 году представлены в таблице 1.

Таблица 1

Климатические характеристики в местах культивации льна в 2023 году.

Регион	Среднесуточная температура			Количество дождливых дней			Летние осадки (% от среднегодового за летний период)
	июнь	июль	август	июнь	июль	август	
Саратовская обл.	20,6	22,2	20,0	3	5	9	72,0
Тверская обл.	17,5	18,5	17,1	14	8	11	114,4

В качестве сельскохозяйственной культуры для тестирования был использован лён-долгунец сорта Универсал. Предпосевная обработка семенного материала проведена по методике [11]. Посев льна осуществляли в первой - второй декадах мая на опытных участках площадью по 16 м². Способ высева – узкорядный, с междурядьями 7,5 см. Глубина заделки семян составляла 4 ÷ 5 см. В качестве параметров урожайности льна использовались следующие характеристики: масса полученной соломы, содержание целлюлозы в биоматериале. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Характеристика урожайности льна-долгунца на опытных участках, 2023 год

Регион	Время посева	Период вегетации, дней	Средняя урожайность соломы, кг/м ²	Содержание целлюлозы в биомассе, % масс.
Саратовская обл.	4 мая	61	2,74	24,7
Тверская обл.	12 мая	74	2,70	23,9

Представленные результаты указывают на возможность получения практически идентичных показателей урожайности при возделывании льна в условиях использования малопродуктивных почв и неблагоприятных погодных влияний. Полученная в результате полевых опытов солома льна была использована для отработки технологии выделения целлюлозы с целью выявления наиболее приемлемого с экологической точки зрения метода. Для сравнения привлекали наиболее распространённую в промышленном масштабе технологию бисульфитной переработки, а также альтернативный вариант – пероксидно-щелочной процесс. Переработку соломы льна производили на специальной опытной установке, предназначенной для переработки растительного сырья, при температуре 95±0.4°С в течение 2 часов. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3

Составы для извлечения целлюлозы и полученные результаты

Исходный материал	Содержание компонентов в технологическом растворе, % масс.				Содержание компонентов в выделенных твёрдых образцах, % масс.			
	Гидроксид натрия	Бисульфит натрия	Пероксид водорода	Вода	Целлюлоза	Лигнин	Влага	Прочие примеси
Лён Тверской обл.	-	15,0	-	85,0	79,8	5,4	5,2	9,6
	10,0	-	10,0	80,0	77,4	7,8	5,0	9,8
Лён Саратовской обл.	-	15,0	-	85,0	76,9	5,5	5,7	11,9
	10,0	-	10,0	80,0	77,1	7,4	5,4	10,1

Таким образом, показана возможность и высокая эффективность извлечения целлюлозы из соломы льна-долгунца с применением каждого из апробированных - бисульфитного и пероксидно-щелочного технологических методов. Сточные воды, образовавшиеся при

реализации бисульфитного метода, загрязнённые серосодержащими соединениями, имеют состав, представленный в таблице 4.

Таблица 4

Состав сточных вод опытной установки переработки биоматериала						
Содержание серных примесей в сточных водах бисульфитного метода, мг/л						
Серосодержащие высокомолекулярные соединения		Серосодержащие ионы солей		Сероорганические соединения		
смолы	полимеры	сульфиты	другие	тиоалканы	тиоспирты	другие
30-70	120-140	440-490	30-45	10-15	70-90	20-60

Для очистки сточных вод от серосодержащих примесей, образующихся при реализации бисульфитного метода переработки растительного сырья могут быть рекомендованы методы каталитической [12, 13] или сорбционной [14] очистки с применением сорбирующего материала на основе оксида кремния [15]. Результаты очистки представлены на рис. 1.

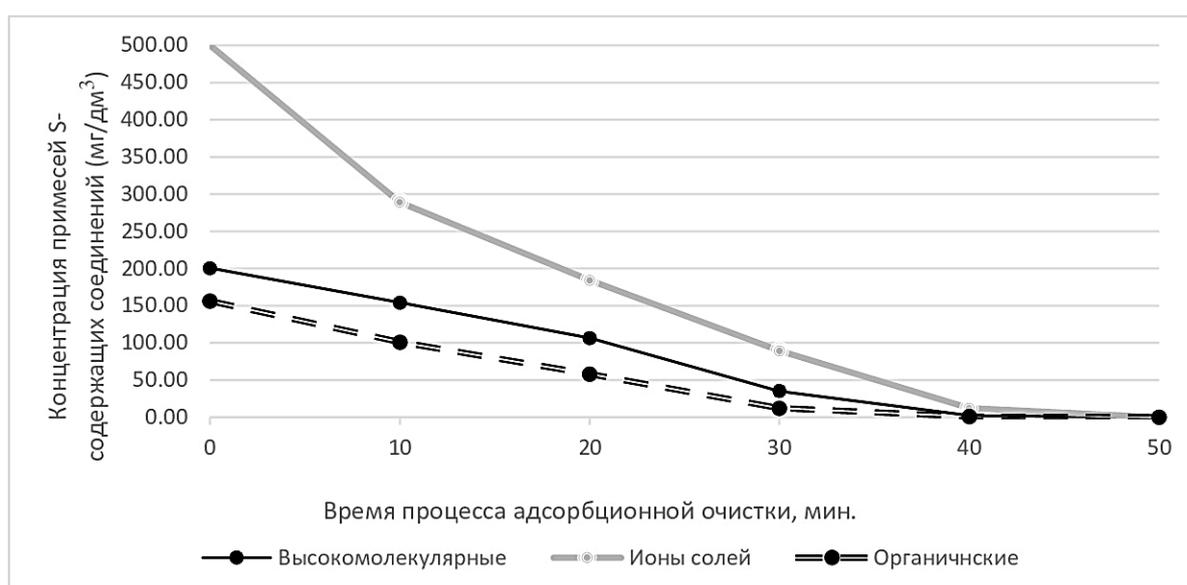


Рисунок 1. Динамика удаления примесей серосодержащих соединений из сточных вод производства переработки растительного сырья

Таким образом, показано, что при реализации бисульфитного метода выделения целлюлозы требуется проведение дополнительной очистки сточных вод от соединений серы. На этом основании может быть рекомендовано внедрение пероксидно-щелочного, экологически более целесообразного метода переработки растительного сырья.

Заключение.

Проведены исследования, целью которых являлась оценка возможности реализации современных природоохранных технологий для обеспечения экологической безопасности региона Большого Алтая. Показано, что для обеспечения сохранности лесных ресурсов, целесообразно осуществить замену древесины в производстве целлюлозы на ежегодно возобновляемый ресурс – биоматериалы, образующиеся в значительных количествах в сельскохозяйственном производстве и не находящие полезного применения.

Рассмотренные варианты травяного сырья на основе мискантуса и льна показали, что наиболее предпочтительным является лён, при переработке которого образуется значительное количество соломы. Проведены полевые эксперименты по выращиванию льна-долгунца сорта Универсал в регионах с низкопродуктивными типами почв в условиях влияния неблагоприятных климатических воздействий и показана высокая устойчивость сортаобразца.

Полученная в результате проведения полевых опытов солома льна-долгунца перерабатывалась на технологической установке с применением бисульфитного и пероксидно-

щелочного методов; полученные результаты указывают на идентичность задействованных способов выделения целлюлозы из травяного сырья. При реализации программ экологической безопасности, предпочтение целесообразно отдать пероксидно-щелочному методу, внедрение которого способствует уменьшению образования опасных производственных отходов.

Библиографический список

1. Будаева В.В., Скиба Е.А. и др. Химическая и биотехнологическая переработка недревесного сырья в высокостойкие продукты // *Фундаментальные исследования и практические разработки в области технической химии*. Бийск: Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, 2021. С. 220–226.
2. Крупин В.И., Демьяновская Н.В., Кудряшов В.Н. Солома – сырьё для бумажной промышленности // *Целлюлоза. Бумага. Картон*. 2010. № 3. С. 50–51.
3. Барнашова Е.К., Вертикова Е.А. и др. Оценка перспектив использования льна долгунца в качестве источника для получения целлюлозы: технология и экологические проблемы // *Тезисы докладов XIII Международной научной конференции «Химия и технология растительных веществ»*. Сыктывкар. 2024. С. 25.
4. Ужахова Л.Я., Арчакова Р.Д., Китиева Л.И. Исследование свойств целлюлозы из травянистых растений // *Endless Light in Science*. 2022. № 6. С. 424–427.
5. Singh S., Dutt D., Tyagi C.H. Complete characterization of wheat straw // *BioResources*. 2011. Vol. 6. № 1. P. 154–177.
6. Симагин А.Д., Симагина А.С. и др. Биоресурсная коллекция льна кафедры генетики, селекции и семеноводства ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева // *Материалы 7-й Международной конференции: «Генофонд и селекция растений»*, Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2024. С. 314–316.
7. Степанова Н.В. Возделывание льна масличного на семена и волокно. Минск: Издательский дом “Белорусская наука”. 2021. 136 с.
8. Миневич И.Э., Ущиповский И. В. Изучение целлюлозы, полученной из вторичного сырья лубяных культур, в качестве потенциального источника для различных отраслей индустрии // *Технические культуры. Научный сельскохозяйственный журнал*. 2023. Т. 3. № 3 (9). С. 49–58.
9. Brosse N., Dufour A. et. al. Miscanthus: a fast-growing crop for biofuels and chemicals production // *Biofuels, Bioprod., Bioref.* 2012. V. 6. I. 5. P. 580-598.
10. Гисматулина Ю.А., Будаева В.В., Золотухин В.Н. Получение целлюлозы из мискантуса и соломы льна-межеумка азотнокислым и комбинированным способами // *Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции*. Бийск: Бийский технологический институт. 2013. С. 270–274.
11. Будник М.И., Сергеев С.Н. и др. Новый научно-методический подход к экологической обработке семян льна, повышающей всхожесть и предотвращающей слипание посевного материала // *Актуальные вопросы биологической физики и химии. «БФФХ – 2023»*: Материалы XVIII международной научной конференции, Севастополь. 2023. С. 116–117.
12. Тараскин К.А., Козырева А.В. и др. Каталитическая очистка сточных вод производства композиционных материалов от примесей сераорганических соединений. Часть 1 // *Водоочистка*. 2022. № 3. С. 16–23.
13. Тараскин К.А., Козырева, А.В. и др. Экспериментальная отработка технологии каталитической очистки производственных сточных вод, содержащих сераорганические соединения. Часть 2 // *Водоочистка*. 2022. № 4. С. 18–27.
14. Тараскин К.А., Орлов Д.С. и др. Адсорбционная очистка сточных вод производства шумоизолирующих композитных материалов от серосодержащих соединений // *Водоочистка. Водоподготовка. Водоснабжение*. 2021. № 5 (161). С. 32–38.
15. Тараскин К.А., Орлов Д.С. и др. Перспективные направления использования сорбентов на основе оксида кремния в технологии очистки сточных вод производства композиционных материалов // *Все материалы. Энциклопедический справочник*. 2023. № 12. С. 10–18.

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ОБРАБОТКА ЛЬНЯНОЙ КОСТРЫ В ПРОЦЕССЕ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЭТАНОЛА: ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ

А.В. Уткина, Е.В. Ожимкова

Тверской государственной технической университет, Тверь, Россия

Трансформация лигноцеллюлозного сырья в биоэтанол решает две важные задачи: утилизируются трудно разлагаемые в естественных условиях крупнотоннажные отходы, а также открываются возможности для получения биоэтанола второго поколения с использованием дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В работе подобран оптимальный состав мультиэнзимной композиции (МЭК) для обработки льняной костры на основе трех коммерческих препаратов; обоснована необходимость предварительной обработки лигноцеллюлозного материала и оптимальная продолжительность стадии отдельного ферментативного гидролиза перед совмещением со спиртовым брожением.

Ключевые слова: лигноцеллюлозные материалы, биоэтанол, ферментативный гидролиз, оптимизация.

Стремительное истощение запасов традиционных энергетических источников, тенденции перехода на альтернативные зеленые технологии синтеза ряда органических веществ, активное внедрение подходов по организации безотходных производств инициируют исследования в области трансформации лигноцеллюлозных материалов в ценный продукт широкого потребления – биоэтанол, важность и значимость которого для мировой и российской экономике ежегодно возрастают [1].

Промышленное получение этанола может быть осуществлено двумя путями: биотехнологическая трансформация углеводсодержащих материалов, в основе которой лежит способность отдельных видов микроорганизмов к спиртовому брожению, и каталитическая гидратация этилена (химический способ). Объем этанола, получаемого химическим синтезом, постоянно сокращается, что связано с существенными недостатками технологии, среди которых выделяют: высокую стоимость материалов (этилена) и низкую конверсию этилена в целевой продукт (менее 5%). Кроме того, в последние десятилетия государственная поддержка направлена на разработку и внедрение преимущественно биотехнологических проектов.

Анализ рынка биоэтанола показал, что общий объем производства спирта в мире в 2023 году составил более 150 млрд. литров, при этом существенная доля этого объема приходится на производственные мощности нескольких стран, которые на протяжении длительного времени сохраняют конкурентное преимущество [2].

На сегодняшний день в России не функционирует ни один специализированный завод по производству биоэтанола, при этом производственные мощности страны, развитая научная база, доступные сырьевые ресурсы и потребность во внедрении ресурсосберегающих технологий создают благоприятные условия для разработки и реализации масштабных биотехнологических проектов по производству биоэтанола.

Сырьевые источники, используемые для синтеза биоэтанола, разнообразны и зависят в основном от климатических условий региона, в котором организовано производство: кукуруза (Соединенные Штаты Америки); сахарный тростник (Бразилия, Колумбия, Эквадор); пшеница, ячмень, рожь (Европейский Союз) и др. Таким образом, сырье представляет собой сахаро- и крахмалосодержащие культуры преимущественно пищевого назначения [3].

Альтернативными сырьевыми источниками, использование которых не сопряжено с риском истощения запасов продовольственной продукции, являются лигноцеллюлозные материалы. В отличие от пищевого крахмалосодержащего сырья, лигноцеллюлозные материалы

характеризуются широкой распространенностью и доступностью, обилием (более 50 % биомассы в мире), возобновляемостью, низкой себестоимостью [1].

Традиционной сельскохозяйственной культурой Тверской области (а также других регионов Центрального и Западно-Сибирского районов России) является лен-долгунец. Согласно данным на 2024 год, в регионе активно функционируют более двадцати льносеющих предприятий, шесть заводов по первичной переработке льна, два предприятия по переработке льноволокна и две льносеменоводческие станции. Процесс переработки льняной тресты характеризуется накоплением большого количества отходов материалов, которые не находят прямого практического применения и лишь частично разлагаются в природных условиях.

Одним из крупнотоннажных агропромышленных отходов является льняная костра, которая представляет собой измельченные одревесневшие части стеблей льна и составляет примерно 60-70% от массы переработанной льняной тресты.

Ключевыми технологическими барьерами в производстве биоэтанола второго поколения, влияющими на экономическую составляющую проектных решений, является сложная структура лигноцеллюлозного сырья (формирование устойчивого биокомпозиционного материала из полимеров, входящих в состав матрицы растительного материала), низкие концентрации и выход биоэтанола, неспособность традиционных культур микроорганизмов сбрасывать пятиуглеродные сахара и др [2].

Основная цель исследований, которые ведутся в направлении улучшения технологических и экономических показателей производства биоэтанола из лигноцеллюлозного сырья, – увеличение выхода целевого продукта и снижение производственных затрат, например, путем оптимизации ключевых параметров процесса.

Длительное время на отечественных предприятиях по производству биоэтанола деструкция биокомпозиционного материала осуществлялась посредством гидролиза концентрированной или разбавленной кислотой, что имело ряд существенных недостатков: повреждение целостности не только экранирующих, но и целевых полисахаридов; необходимость подбора дорогостоящих материалов для изготовления оборудования, контактирующего с кислотами; накопление в среде фурфуроловых соединений, подавляющих рост микроорганизмов на стадии ферментации. Использование ферментных препаратов для обработки льняной костры позволяет вести процесс в мягких условиях без склонности к коррозии или к образованию ингибиторов [3].

Фактически коммерческий энзимный препарат для гидролиза целлюлозы и гемицеллюлозы представляет собой смесь нескольких различных видов ферментов, называемых целлюлазами, выделенных из соответствующих микроорганизмов. Эти ферменты расщепляют гликозидные связи в углеводах. В отличие от гемицеллюлозы, которая относительно легко подвергается гидролизу, целлюлоза имеет кристаллические области, оказывающие сопротивление деполимеризации. Ферменты, способные гидролизовать целлюлозу до мономерных звеньев (глюкозы), представляют собой мультиферментные комплексы, состоящие в основном из трех различных энзимов, а именно: эндо-1,4-β-D-глюканаза (КФ 3.2.1.4; случайным образом разрывает межмолекулярные связи в целлюлозе); экзо-1,4-β-D-глюканаза/экзоцеллобиогидролаза (КФ 3.2.1.91; отщепляет мономеры и димеры с конца цепи целлюлозы); β-глюкозидаза (КФ 3.2.1.21; гидролизует целлобиозу и другие короткие олигомеры целлюлозы в мономеры глюкозы).

В качестве дополнительных ферментов, облегчающих доступ целлюлаз к поверхности целлюлозы за счет деструкции ксиланов, являются ферменты ксиланазного комплекса. Обычно комплекс содержит эндо-1,4-β-ксиланазы, β-ксилозидазы, α-L-арабинофуранозидазу и ацетилксиланэстеразу. Для составления мультиэнзимной композиции (МЭК) в данной работе были применены следующие ферментные препараты: «Целлюлаза», «Ксиланаза», «Пектиназа» (растворимый порошок, ООО Торговый дом «Биопрепарат», Россия). В качестве сырья для получения гидролизата моносахаридов в работе исследован многотоннажный отход агропромышленного комплекса Тверской области – костра льна. Отходы переработки льняного волокна предоставлены ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур».

Характеристика химического состава льняной костры не постоянна и варьируется в зависимости от региона произрастания культуры, методов сбора и хранения материалов. Однако, как и любое лигноцеллюлозное сырье, отходы льняной переработки представляют собой биокomпозицию на основе трех полимеров – целлюлозы, гемицеллюлозы, лигнина. В состав также входят водорастворимые вещества (3,4%), смолы (19%), жиры и воск. Насыпная объемная масса костры составляет 110 кг/м³, средняя влажность (в отвалах) – 15–20%, гигроскопичность – 24,8%, водопоглощение – 220–240% (по массе), температура возгорания – 210–220°C, теплопроводность (в сухом состоянии) – 0,04–0,037Вт/(м×°С).

Химический состав исходного сырья и полученных из него методами предварительной обработки продуктов представлен в таблице 1 [4].

Таблица 1

Химический состав льняной костры и продуктов ее предварительной обработки

Образец	Массовая доля компонента в образце, %			
	Целлюлоза	Пентозаны	Лигнин	Зола
Костра льна	42,9±0,1	34,1±0,1	19,1±0,1	3,8±0,05
Продукт ультразвуковой обработки	83,6±0,1	9,3±0,1	5,4±0,1	1,7±0,05
Продукт азотнокислой обработки	79,8±0,1	9,2±0,1	8,9±0,1	2,1±0,05

Оптимизация состава мультиэнзимной композиции, с одной стороны, предполагает нахождение оптимального соотношения ферментных препаратов, а с другой – изучение кинетики ферментативного гидролиза при различных концентрациях МЭК и обеспечение повышения выхода редуцирующих веществ (в т.ч. и глюкозы). Ферментативный гидролиз субстрата проводился в 0,1 М ацетатном буферном растворе (рН 5,0); начальная концентрация льняной костры – 50,0 г/л по сухим веществам, температурный режим – (50±0,1)°С, скорость перемешивания – 150 об/мин. Экспериментально установлено, что максимальный конечный выход редуцирующих веществ (36,3 г/л) в гидролизате достигается при соотношении ксиланазы:пектиназы:целлюлазы 1/4:1/2:1/4. Концентрации ферментных препаратов: «Ксиланаза» – 17,5; «Пектиназа» – 35; «Целлюлаза» – 17,5 мг/г субстрата.

Предварительная обработка лигноцеллюлозного материала является необходимым этапом в цикле технологических операций, цель которых – производство этанола. Сравнивая два наиболее часто описываемых в литературе метода, установлено, что ультразвуковая обработка – наиболее эффективная технология предварительной обработки материала (с точки зрения увеличения степени аморфности материала и повышения чувствительности полисахаридов к действующим ферментным препаратам). Микроскопирование лигноцеллюлозного материала, подвергнутого действию ультразвука/химических реагентов (разбавленная азотная кислота), показывает, что в материале увеличивается количество аморфных областей, которые легче подвергаются гидролизу по сравнению с кристаллическими формами. Кроме того, увеличивается пористость волокнистых матриц, что способствует проникновению в структуру химических веществ и ферментов.

После нахождения оптимального соотношения ферментов в составе МЭК с целью повышения эффективности ферментативного гидролиза проводилось исследование кинетики гидролитического расщепления льняной костры при различных концентрациях мультиэнзимной композиции с сохранением найденного оптимального соотношения ферментов. Наибольший выход редуцирующих веществ наблюдался при концентрации ферментной композиции 210 мг/г субстрата, что соответствует 3-х кратному увлечению концентраций ферментных препаратов по сравнению с исходными (при их оптимальном соотношении в МЭК). Зависимости концентрации редуцирующих веществ и глюкозы от продолжительности ферментативного гидролиза при концентрации мультиэнзимной композиции 210 мг/г субстрата (продукт ультразвуковой обработки льняной костры) представлены на рис. 1-2.

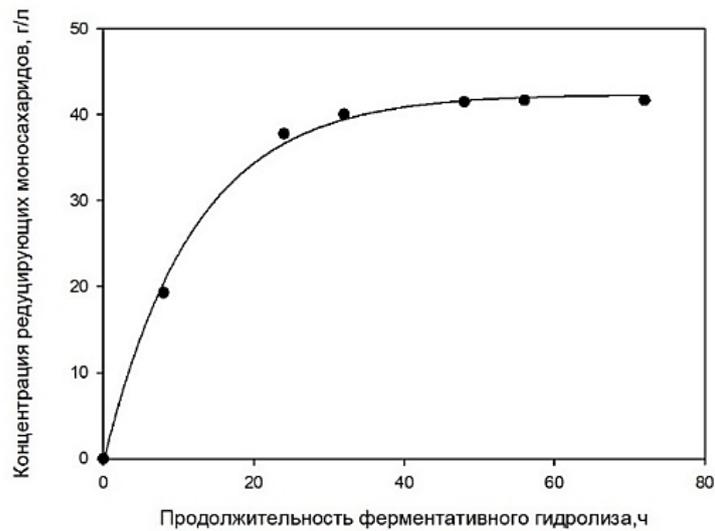


Рис. 1. Зависимость содержания редуцирующих веществ в гидролизате от продолжительности ферментативного гидролиза

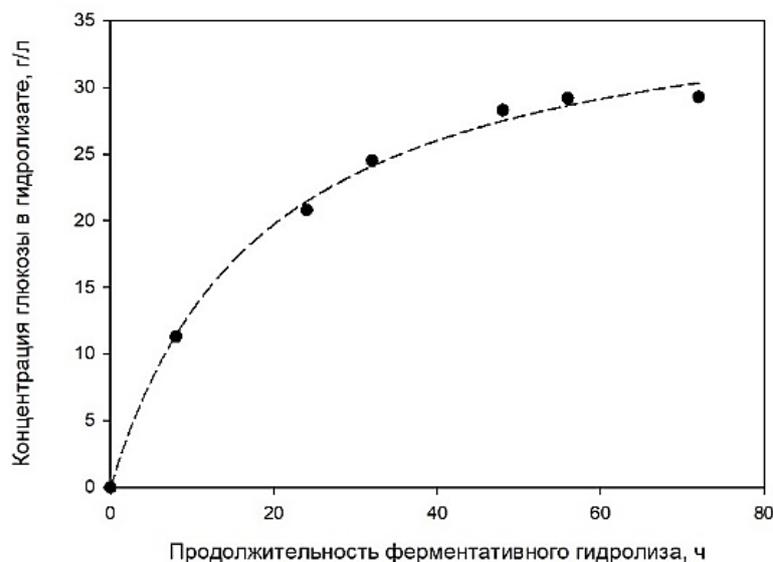


Рис. 2. Зависимость содержания глюкозы в гидролизате от продолжительности ферментативного гидролиза

Как видно из данных, представленных на рис. 1-2, накопление глюкозы в гидролизате идет медленнее, чем общее накопление редуцирующих веществ, однако доля глюкозы не остается постоянной и по мере протекания ферментативного гидролиза возрастает: через 24 ч после внесения ферментных препаратов доля глюкозы составляет 51,4% от общего количества редуцирующих веществ в гидролизате; а через 72 ч содержание декстрозы увеличивается до 70,3%. Наблюдаемая зависимость, вероятно, связана с особенностями механизма реакции ферментативного расщепления целлюлозы до глюкозы: на первом этапе целлюлоза превращается в дисахарид – целлобиозу; на втором – дисахарид гидролизуеться до моносахаридного звена – глюкозы. Последняя стадия характеризуется низкой скоростью и является лимитирующей для процесса [5].

Одной из характеристик процесса ферментативного гидролиза, требующей обязательного обоснования при разработке технологии биосинтеза этанола, является продолжительность стадии перед совмещением со спиртовым брожением. Оптимальная продолжительность стадии ферментативного гидролиза является результатом учета двух основных факторов: накопления в гидролизате редуцирующих веществ, реологических свойств получаемого сахарного сиропа. Первый фактор определяет возможность наиболее полного сбраживания исходных полисахаридов сырья в целевой продукт – биоэтанол, последний влияет на процесс развития дрожжевой культуры (скорость адаптации и синтеза этанола, эффективность утилизации углеводов, физиологическое состояние дрожжей и др.).

Из данных, представленных на рис. 1-2, видно, что увеличение продолжительности стадии ферментативного гидролиза (более 48 ч) не приводит к существенно большему накоплению редуцирующих веществ в растворе: концентрация моносахаридов постепенно увеличивается до некоторого предельного значения, после чего выходит на плато и остается постоянной. В серии экспериментов, направленных на определение оптимальной продолжительности стадии отдельного гидролиза на основании физиологического состояния дрожжевой культуры, по истечении запланированного времени в реакционную массу вносились засевные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Сбраживание, совмещенное с осахариванием, проводилось в анаэробных статистических условиях в течение 5 суток.

Продолжительность стадии ферментативного гидролиза 8-15 часов создаст неблагоприятные условия для жизнедеятельности дрожжей, что объясняется реологическими свойствами среды, обладающей высокой вязкостью среды вследствие большого количества негидролизованного субстрата. При 72-часовом несовмещенном гидролизе концентрация редуцирующих веществ в гидролизате являлась максимальной, однако общее количество дрожжевых клеток снижалось. Это объясняется ингибированием процесса ферментативного гидролиза высокими концентрациями моносахаридов (ингибирование продуктом). В опытах с продолжительностью ферментативного гидролиза 24-48 часов концентрация редуцирующих веществ на момент внесения дрожжей не являлась максимальной, однако в процессе спиртового брожения благодаря утилизации углеводов дрожжами, ферментативный гидролиз возобновлялся и протекал одновременно с ферментацией, что способствовало более высокому выходу глюкозы на 1 т льняной костры.

Библиографический список

1. Tsegaye B. Microbial delignification and hydrolysis of lignocellulosic biomass to enhance biofuel production: an overview and future prospect. / B. Tsegaye, C. Balomajumder, P. Roy // Bull Natl Res Cent. – 2019. – №43 (51).
2. Биоэтанол: технологии получения из возобновляемого растительного сырья и области применения / П.Е. Матковский [и др.] // Альтернативная энергетика и экология. – 2010. - №6. – С. 95–105.
3. Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: a review. / A. Busic [et al.] // Food technology and biotechnology. – 2018. – №3. – P. 289–311.
4. Оболенская А.В. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы / А.В. Оболенская, З.П. Ельницкая, А.А. Леонович. – Москва: Экология, 1991. – 320 с.
5. Миронова Г.Ф. Повышение эффективности процесса получения биоэтанола из шелухи овса: специальность 03.01.06 «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»: диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук / Миронова Галина Федоровна; Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева. – Москва, 2021. – 118 с.

УДК 543.421/.424: 582.949.22

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ *TEUCRIUM CHAMAEDRYS L.* И *TEUCRIUM SCORDIUM L.*

Е.В. Феськова, В.Н. Леонтьев

Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь

В настоящей работе представлены результаты исследований антиоксидантной активности экстрактов дубровника обыкновенного (*Teucrium chamaedrys L.*) и дубровника чесночного (*Teucrium scordium L.*) из коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Установлено, что экстракты *Teucrium chamaedrys L.* обладают большей антиоксидантной активностью по сравнению с экстрактами *Teucrium scordium L.* Водно-этанольный экстракт *Teucrium chamaedrys L.* проявляют большую активность, чем водно-метанольный экстракт, для *Teucrium chamaedrys L.* антиоксидантная активность сопоставима как для водно-этанольного так и для водно-метанольного экстрактов.

Ключевые слова: дубровник обыкновенный, дубровник чесночный, антиоксидантная активность, экстракт, 2,2 – дифенил – 1 пикрилгидразил

THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *TEUCRIUM CHAMAEDRYS L.* AND *TEUCRIUM SCORDIUM L.* EXTRACTS

A. Feskova, V. N. Leontiev

Belarusian State Technological University, Minsk, Republic of Belarus

This work presents the results of the antioxidant activity determination of the extracts from *Teucrium chamaedrys L.* and *Teucrium scordium L.* from the collection of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus. We found that *Teucrium chamaedrys L.* extracts have slightly greater antioxidant activity compared to *Teucrium scordium L.* extracts. The water-ethanol extract of *Teucrium chamaedrys L.* shows greater activity than the water-methanol extract, for *Teucrium chamaedrys L.* antioxidant activity is comparable to the water-ethanol and water-methanol extracts.

Keywords: *Teucrium chamaedrys L.*, *Teucrium scordium L.*, antioxidant activity, extract, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

Введение. Дубровник (*Teucrium*) – крупный и полиморфный род семейства Яснотковые (*Lamiaceae*), представленный преимущественно многолетними кустистыми или травянистыми растениями, распространенный практически по всему миру и обычно произрастающий в солнечных местах [1, 2]. По данным Plants of the World Online (интернет проект Королевских ботанических садов Кью) род включает 291 вид, по данным World Flora Online Plant List («Список растений Мировой флоры онлайн») – 314 видов [2, 3].

Виды Дубровника используются в качестве лекарственных трав уже более 2000 лет. Первые упоминания о лечебных свойствах этого рода растений представлены в греческой мифологии. Название *Teucrium* происходит от имени Teucer, сына Telamon (царь Саламиса), который первым применил эти растения в лечебных целях [1].

Широко используемый в народной медицине некоторых стран дубровник обыкновенный (*Teucrium chamaedrys L.*) распространен по всей Европе, за исключением Северной. Он также произрастает в Северной Африке и в Западной Азии [1]. Дубровник обыкновенный используется для приготовления чаев, настоек, вин; благотворно воздействует на пищеварительную и иммунную системы, обладает противовоспалительным, противоревматическим, мочегонным эффектом. Использовался как противомаларийное, спазмолитическое, диабетическое средство,

для лечения геморроя, желудочных болей, анемии, болезней сердца, кишечных колик, заболеваний почек, при обветривании и трещинах на кончиках пальцев [1, 4].

Однако в литературе встречаются сообщения о 45 случаях заболевания токсическим гепатитом после приема препаратов дубровника обыкновенного (*Teucrium chamaedrys* L.), что обусловлено содержанием в экстрактах данного вида неоклеродановых дитерпеноидов теукрина А и теухамедрина А, обладающих гепатотоксичностью [5].

Дубровник чесночный (*Teucrium scordium* L.) – многолетнее растение, произрастающее в Южной и Юго-Восточной Европе, на Ближнем Востоке и в Северной Африке. В народной медицине цветущие ветви применяют для приготовления чая и тонизирующих лекарственных препаратов, трава оказывает глистогонное, противогрибковое, антисептическое и тонизирующее действие [1]. Также дубровник чесночный обладает жаропонижающим, вяжущим, потогонным, мочегонным, слабительным, стимулирующим, тонизирующим, глистогонным и общеукрепляющим действием [6].

Дубровник обыкновенный и дубровник чесночный содержат в своем составе флавоноиды, дубильные вещества, эфирные масла, ириоиды, дитерпены, сапонины [6, 7].

Целью работы было определение антиоксидантной активности (АОА) экстрактов дубровника обыкновенного и дубровника чесночного из коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси.

Экспериментальная часть. На первом этапе методом Фолина-Чокальтеу в модификации Синглетона и Росси [8] определено содержание фенольных соединений в водно-этанольных экстрактах из листьев исследуемых видов *Teucrium*. Установлено, что содержание фенольных соединений (мг-экв галловой кислоты / г сырья) составило для *Teucrium chamaedrys* L. $12,19 \pm 0,21$, для *Teucrium scordium* L. – $15,68 \pm 0,34$.

Антиоксидантную активность (АОА) суммы биологически активных веществ (БАВ) из листьев дубровника обыкновенного и дубровника чесночного изучали спектрофотометрическим методом с 2,2 – дифенил – 1 пикрилгидразилом (DPPH). Метод основан на реакции DPPH^{*} с антиоксидантом (АН) по схеме:



После добавления к раствору DPPH^{*} исследуемого образца происходит взаимодействие антиоксидантов со свободными катион-радикалами DPPH^{*}. В результате этой реакции снижается интенсивность окраски DPPH^{*}. Ход реакции контролировали по изменению оптической плотности при 517 нм [9-11].

Приготовление экстрактов: к навеске сырья массой $0,1 \pm 0,001$ г прибавляли 10 мл 70 %-ного этилового или 70 %-ного метилового спирта, экстракцию БАВ вели в течение 30 мин при температуре 65 °С. Затем экстракты фильтровали и доводили объем фильтрата до 10 мл соответствующим экстрагентом. Перед анализом экстракты разбавляли в 5 раз.

К 3,9 мл 0,125 мМ раствора DPPH в метиловом спирте добавляли 0,1 мл разбавленного экстракта. Оптическую плотность образцов измеряли на спектрофотометре SPECORD 200 (Analytik Jena, Германия) в кюветах толщиной 1 см.

Антиоксидантную активность суммы БАВ рассчитывали по формуле:

$$\text{АОА} = \frac{(A_0 - A) \cdot 100}{A_0} \%,$$

где A_0 – оптическая плотность 0,125 мМ раствора DPPH в метиловом спирте;

A – оптическая плотность раствора DPPH после добавления разбавленного экстракта [10].

Обсуждение результатов. Зависимость АОА (%) от времени реакции (мин) представлена на рис. 1.

Анализируя данные, представленные на рис. 1, можно сделать вывод, что экстракты дубровника обыкновенного обладают большей АОА, чем экстракты дубровника чесночного. Ингибирование 50 % свободных радикалов у экстрактов из дубровника обыкновенного

достигалось приблизительно через 103 мин, из дубровника чесночного – 119 мин (водно-этанольный экстракт).

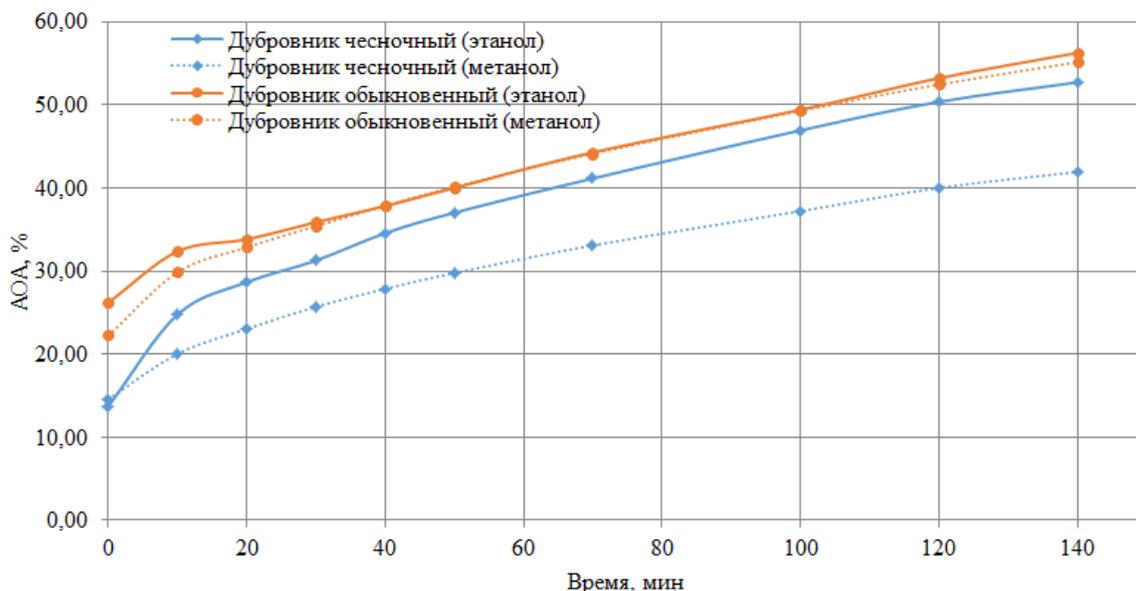


Рис. 1. Зависимость АОА от времени реакции

Водно-этанольный экстракт дубровника чесночного показывает большую АОА по сравнению с водно-метанольным экстрактом, а для дубровника обыкновенного АОА не различается для двух экстрактов. Предположительно, различия в АОА обусловлены качественным составом БАВ экстрактов исследуемых видов. Вероятнее всего, фенольные соединения дубровника чесночного, обладающие большей АОА, лучше экстрагируются менее полярным растворителем (этиловым спиртом), в то время как полярность растворителя не оказывает влияния на экстракцию фенольных соединений из дубровника обыкновенного.

Заключение. Не смотря на более низкое содержание фенольных соединений в экстракте дубровника обыкновенного по сравнению с экстрактом дубровника чесночного, АОА активность экстрактов дубровника обыкновенного выше. Возможно, среди фенольных соединений дубровника обыкновенного есть вещества, обладающие большей АОА, или их содержание выше, по сравнению с дубровником чесночным.

Для более точной интерпретации полученных результатов предполагается провести анализ компонентного состава экстрактов дубровника исследованных видов методом высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии.

Благодарности. Выполнение работы финансировалось в рамках НИР «Идентификация и анатомо-терапевтическо-химическая классификация биологически активных соединений коллекции лекарственных растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси» ГПНИ «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия», № госрегистрации в ГУ «БелИСА» 20211495 от 21.05.2021. Авторы выражают признательность сотрудникам Центрального ботанического сада НАН Беларуси И.Н. Тычине, В.В. Титку, Б.Ю. Аношенко за предоставленные образцы растительного сырья.

Библиографический список

1. A Review of the Phytochemistry, Traditional Uses and Biological Activities of the Essential Oils of Genus *Teucrium* / R. Gagliano Candela [et al.] // *Planta Medica*. 2020. doi:10.1055/a-1293-5768.
2. URL: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30039259-2>.
3. URL: <https://wfo.plantlist.org/taxon/wfo-4000038030-2023-12?page=1>.
4. Composition of the essential oil of *Teucrium chamaedrys* L. (*Lamiaceae*) from Turkey / E. Bagci [et al.] // *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010, Vol. 4, N 23, P. 2588–2590.

5. Two Contemporary Cases of Hepatitis Associated with *Teucrium Chamaedrys* L. Decoction Use. Case Reports and Review of Literature / L. Gori [et al.] // Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology. 2011, Vol. 109, N 6, P. 521–526. doi:10.1111/j.1742-7843.2011.00781.x.
6. Morteza-Semnani K., Saeedi M., Akbarzadeh M. Essential oil composition of *Teucrium scordium* L. // Acta Pharmaceutica. 2007, Vol. 57, N 4, P. 499–504. doi:10.2478/v10007-007-0040-6.
7. Chemical Fractionation Joint to In-Mixture NMR Analysis for Avoiding the Hepatotoxicity of *Teucrium chamaedrys* L. subsp. *chamaedrys* / S. Piccolella [et al.] // Biomolecules. 2021, Vol. 11, N 5, P. 690–704.
8. Коннова С.А., Каневский М.В., Алиева З.О., Шувалова Е.П. Методы выделения и анализа флавоноидов высших растений и исследования их активности в отношении ризобактерий: учебно-методическое пособие для студентов биологического факультета / С.А. Коннова, М.В. Каневский, З.О. Алиева, Е.П. Шувалова. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2015. – 31 с.
9. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity / LWT - Food Science and Technology. 1995, Vol. 28, N 1, P. 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
10. Adesanwo J. K., Makinde O. O., & Obafemi C. A. Phytochemical analysis and antioxidant activity of methanol extract and betulinic acid isolated from the roots of *Tetracera potatoria* // Journal of Pharmacy Research. 2013, Vol. 6, N 9, P. 903–907. doi:10.1016/j.jopr.2013.09.003
11. Lu, Y., Khoo, T. J., Wiart, C. Antioxidant Activity Determination of Citronellal and Crude Extracts of *Cymbopogon citratus* by 3 Different Methods // Pharmacology & Pharmacy. 2014, Vol. 5, P. 395–400. doi: 10.4236/pp.2014.54047.

УДК 579.26(470.21)

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ОЧИСТКИ И ВОССТАНОВЛЕНИЯ НАРУШЕННЫХ ТЕРРИТОРИЙ КОЛЬСКОГО ПОЛУОСТРОВА

Н.В. Фокина, А.С. Сошина, В.А. Мязин, А.А. Чапоргина, Е.С. Латюк

Институт проблем промышленной экологии Севера КНЦ РАН, Россия, г.Апатиты

Приведены результаты многолетних исследований сотрудников лаборатории экологии микроорганизмов ИППЭС КНЦ РАН возможности использования биотехнологического потенциала аборигенных штаммов микроорганизмов, выделенных из загрязненных сред северных регионов, в следующих отраслях: очистка сточных вод от минеральных соединений азота, фосфора, калия, сульфатов с использованием биотехнологий (потенциал высших растений и микроорганизмов); очистка территорий, загрязненных нефтью и нефтепродуктами (НП), с применением методов биоремедиации и сорбентов в условиях Кольского Севера; биовыщелачивание цветных металлов из бедных руд Мурманской области; проблема влияния микроорганизмов на процессы флотации при обогащении руд.

Ключевые слова: микроорганизмы, биоремедиация, загрязнение, соединения азота, нефтепродукты, обогащение сульфидных и несulfидных руд

USING BIOTECHNOLOGY TO CLEAN AND RESTORE DISTURBED AREAS OF THE KOLA PENINSULA

N.V. Fokina, A.S. Soshina, V.A. Myazin, A.A. Chaporgina, E.S. Latyuk

Institute of Industrial Ecology Problems of the North, Kola Science Center of the Russian Academy of Sciences, Russia, Apatity

The article presents the results of long-term research by the staff of the Laboratory of Microorganism Ecology of the INEP KSC RAS on the possibility of using the biotechnological potential of indigenous strains of microorganisms isolated from contaminated environments of the northern regions in the following areas: wastewater treatment from mineral compounds of nitrogen, phosphorus, potassium, sulfates using biotechnology (potential of higher plants and microorganisms); cleaning of territories contaminated with oil and oil products (OP), using bioremediation methods and sorbents in the conditions of the Kola North; bioleaching of non-ferrous metals from poor ores of the Murmansk region; the problem of the influence of microorganisms on flotation processes during ore enrichment.

Keywords: microorganisms, bioremediation, pollution, nitrogen compounds, oil products, enrichment of sulfide and non-sulfide ores

Введение

Микроорганизмы, обладая необычайно высокой физиологической активностью и разнообразием функций, составляют основной генофонд, противостоящий изменениям окружающей среды. Микробиота северных почв отличается рядом специфических черт, обусловленных особенностями среды их обитания [2,8]. Большой интерес проявляется к функционированию микроорганизмов в экстремальных климатических условиях в рамках как изучения механизмов приспособления, так и выделения новых видов и использования их биотехнологического потенциала.

Мурманская область характеризуется уникальным сочетанием природных и антропогенных факторов – суровые климатические условия и интенсивное развитие промышленности. Крупными предприятиями, воздействующими на природные экосистемы Кольского Севера, являются Оленегорский горно-обогатительный комбинат (Олкон),

Кандалакшский алюминиевый завод, Кольская горно-металлургическая компания (Кольская ГМК), Ковдорский и Ловозерский горно-обогатительные комбинаты и Кировский филиал АО «Апатит». Несмотря на то, что в настоящий момент в Мурманской области не ведется добыча нефти, из-за наличия функционирующего морского торгового порта и перевалки нефтепродуктов, актуальным направлением для нашего региона является очистка территорий, загрязненных нефтью и НП.

Возрастание техногенной и антропогенной нагрузки на окружающую среду со стороны промышленного производства ведет к накоплению комплекса экологических проблем, что усугубляется уязвимостью экосистем Арктики, низким потенциалом их самоочищения. В связи с этим на первое место выходят разработки в сфере природоохранных технологий.

Основными направлениями деятельности лаборатории экологии микроорганизмов Института проблем промышленной экологии Севера КНЦ РАН являются изучение микробиологических процессов в системе добычи, переработки, трансформации полезных ископаемых и хранения производственных отходов, а также разработка биотехнологий очистки и ремедиации природных и техногенных сред от широкого спектра загрязняющих веществ.

Объекты и методы

Исследования по указанным направлениям проводятся в естественных средах тундровой, лесотундровой и таежной зон, а также на территориях, подверженных воздействию выбросов промышленных предприятий, и средах, загрязненных нефтепродуктами (Кольский залив, заповедник «Пасвик», рис. 1).

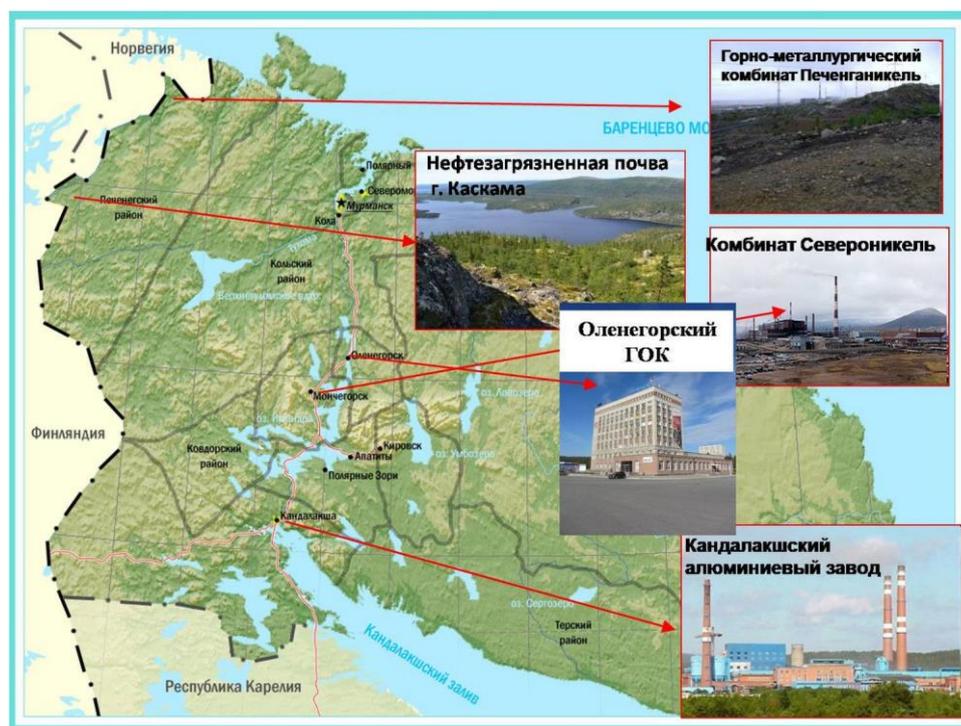


Рис. 1. Районы исследования фоновых и загрязненных территорий.

Для определения состояния окружающей среды проводятся химические и микробиологические анализы. Микробиологический анализ включает определение общей численности бактерий и грибов методами поверхностного и глубинного посева на селективные питательные среды, расчет биомассы бактерий и грибов, а также длины грибного мицелия – методом флуоресцентной микроскопии с использованием поликарбонатных мембранных фильтров. Идентификация микроскопических грибов проводится с использованием световой микроскопии на основе культурально-морфологических признаков с привлечением молекулярно-генетических методов исследований.

Результаты исследований

Совместно с ПАБСИ КНЦ РАН проводятся исследования по созданию биоплато на прудах-отстойниках Кировогорского карьера АО «ОЛКОН» (г. Оленегорск, Мурманская обл.) и АО «Карельский окатыш» (г. Костомукша, республика Карелия) с целью снижения содержания минеральных соединений азота в сточных карьерных водах [6]. Ежемесячно в отстойник поступает в среднем 5000 – 6000 кг нитратов, 30 – 50 кг нитритов, 60 – 80 кг аммонийного азота. Разрабатываемая нами технология основывалась на создании плавающих биоплато (рис. 2). На данное изобретение были получены патенты РФ № 2560631 и 2773122 [3,4].



Рис. 2. Плавающее биоплато для очистки сточных карьерных вод от минеральных соединений азота.

Для создания фитоценоза биоплато был подобран ассортимент аборигенных растений-гидрофитов: мать-и-мачеха, осоки, пушица многоколосковая или узколистая, п. Шейхцера, вахта трехлистная, белокрыльник болотный, калужница болотная, хвощ топяной, х. болотный, ива филиколистная, и. козья или Бредина, сфагнум, ряска, разработан способ их закрепления и выращивания на водной поверхности в условиях Арктики. В воде пруда выявлены микроорганизмы, трансформирующие минеральные соединения азота и способствующие вместе с растениями снижению концентрации аммонийного и нитратного азота в водоеме. В ходе лабораторных опытов было установлено, что оптимальная величина покрытия водоема растительностью биоплато должна составлять не менее 50% от общей площади очищаемого водоема. В 2021 году общая площадь ФОС составила около 55% от площади отстойников. Содержание нитрат-ионов в результате очистки воды снижалось в среднем на 21%, нитрит-ионов – на 71%, ионов аммония – на 58%. В дальнейшем происходило увеличение площади биоплато за счет новых конструкций в виде садков с мхом (рис.3).

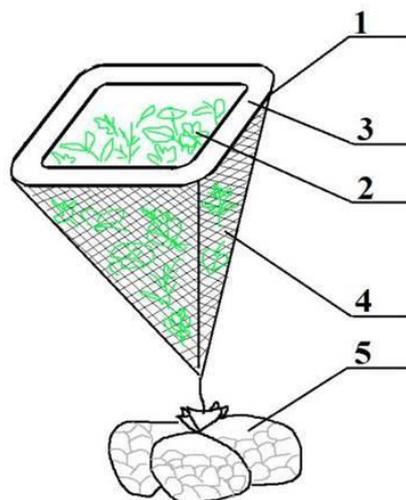


Рис. 3. Фитосадок. 1 – каркас, 2 - биологическая загрузка, 3 – рамка, 4 – сетчатая садковая часть, 5 - якорь.

В настоящее время ведется разработка устойчивых плавающих платформ для размещения фитомодулей, которые могут нести на себе как надводные укореняющиеся растения, так и погруженные водные растения, полностью находящиеся в толще воды. Платформы могут соединяться между собой, образуя барьер на пути движения воды в отстойнике. Количество платформ, их конфигурация и размещение подбирается в соответствии с параметрами существующего отстойника.

В результате исследований по очистке территорий, загрязненных нефтью и НП, выявлено, что бактерии проявляют устойчивость к загрязнению почвы легкими углеводородами при их содержании до 10%. Это относится в целом как к сапротрофным бактериям, особенно к их пигментированным формам, так и к специализированной группе углеводородокисляющих бактерий. В отношении микромицетов было установлено, что загрязнение почв НП в большей степени оказывает влияние на видовой состав и структуру комплексов микроскопических грибов, чем на их численность. Отмечено снижение видового разнообразия и изменение их видовой структуры. Определено, что максимальное значение содержания углеводов в почве, при котором возможно самоочищение территории за один вегетационный период в условиях Кольского Севера составляет 15 г/кг для светлых НП и 5 г/кг для темных НП. Нами выделены штаммы бактерий и микроскопических грибов из аборигенных микроорганизмов, обладающие высокой нефтеструктурной активностью [7,9].

В результате многолетних полевых исследований подтверждена эффективность биологических методов очистки и восстановления нефтезагрязненных территорий в Кольской Субарктике. Приемы биостимуляции и сорбционно-биологической очистки сокращают время очистки загрязненной почвы в 2-2,5 раза и снижают степень фитотоксичности почвы. Способность биогеосорбентов на основе анальцимсодержащих и глауконитсодержащих пород, термоактивированного вермикулита и гранулированного активированного угля сохранять на своей поверхности жизнеспособные бактериальные клетки в течение длительного времени, стимулировать ферментативную активность почв и рост тест-растений в загрязненной почве при температуре +7°C позволяет рекомендовать их применение для очистки и восстановления нефтезагрязненных почв в северных регионах.

В ходе проведения исследований подобран ряд растений, устойчивых к загрязнению почвы НП: двукосточник тростниковидный, волосенец песчаный, овсяница луговая, рожь двулетняя и другие. Данные виды растений можно рекомендовать для проведения этапа фиторемедиации при очистке почв.

Как известно, минерально-сырьевые ресурсы Мурманской области представлены крупными запасами апатит-нефелинового и медно-никелевого сырья. С 2004 г. сотрудниками лаборатории проводятся работы по изучению функционирования микроорганизмов в целостной системе переработки апатит-нефелиновых и медно-никелевых руд на обогатительных фабриках ОАО "Апатит" и Кольской ГМК [1,5]. В результате проведенных исследований было установлено, что флотационный процесс как сульфидных, так и несulfидных руд способствует развитию бактерий. Максимальной численности бактерии достигают в пенном продукте за счет благоприятного температурного режима и наличия питательных веществ, поступающих в процесс с флотореагентами. Доминирующие в оборотной воде и в продуктах обогащения руд на разных стадиях технологического процесса грамотрицательные неспорообразующие бактерии, принадлежащие к роду *Pseudomonas*, оказывают негативное влияние на показатели технологического процесса. Выявлено возрастание времени флотации медно-никелевой руды и ухудшение флотуемости кальцийсодержащих минералов и апатита из апатит-нефелиновой руды. Это объясняется взаимодействием бактерий с активными центрами минералов и интенсивной флокуляцией при флотации, ведущей к нарушению селективности процесса. Разработан способ по снижению негативного влияния бактерий с использованием гипохлорита натрия, как эффективного бактерицидного соединения, эффективно ингибирующего развитие бактерий в оборотных водах обогатительных фабрик. Он практически полностью стерилизует бактериальную суспензию в течение 5 мин при концентрации 2-5 мг/л, что позволяет сократить расходы собирателей при флотации апатит-нефелиновой руды.

Таким образом, исследования сотрудников лаборатории направлены на комплексное изучение биотехнологического потенциала всех основных групп микроорганизмов природных сред, подверженных антропогенному воздействию, в суровых климатических условиях Мурманской области. Использование новых методов изучения почвенной микробиоты на физиологическом и генетическом уровнях будет способствовать открытию новых видов с уникальными чертами, которые можно использовать в процессе биоремедиации загрязненных территорий и минимизации негативного воздействия на окружающую среду.

Благодарности. Работа выполнена в рамках темы НИР 9-22-2716 «Микробиота природных сред Арктической зоны и разработка способов охраны и реабилитации окружающей среды с использованием биотехнологического потенциала микроорганизмов»

Библиографический список

1. Воронина Н.В., Евдокимова Г.А., Гершенкоп А.Ш. Развитие и функционирование микроорганизмов в цикле обогащения апатит-нефелиновых руд с использованием оборотного водоснабжения // Горный журнал. 2007. №12. С. 61-65.
2. Евдокимова Г.А., Мозгова Н.П. Микроорганизмы тундровых и лесных подзолов Кольского Севера. Апатиты: Изд. КНЦ РАН, 2001. 184 с.
3. Евдокимова Г.А., Иванова Л.А., Мязин В.А. Устройство для биологической очистки сточных карьерных вод // Патент на изобретение RU 2560631. Заявка № 2014122204/13 от 30.05.2014 г. Опубликовано 20.08.2015 г. Бюл. №23
4. Иванова Л.А., Корнейкова М.В., Мязин В.А., Фокина Н.В., Редькина В.В., Евдокимова Г.А. Модуль фитосистемы для биологической очистки промышленных сточных вод от минеральных загрязнителей // Патент на изобретение № 2773122. Заявка № 2021110150 от 10.06.2020 г. Опубликовано 30.05.2022 г.
5. Фокина Н.В., Янишевская Е.С., Евдокимова Г.А. Сезонная динамика численности и трофическое разнообразие микроорганизмов в процессе флотации сульфидных медно-никелевых руд на обогатительной фабрике Кольской ГМК // Проблемы недропользования. 2016. 2. С.118-122.
6. Ivanova L.A., Myazin V.A., Korneykova M.V., Fokina N.V., Redkina V.V., Evdokimova G.A. Development and optimization of biological treatment of quarry waters from mineral nitrogen in the Arctic. *Theoretical and Applied Ecology*. 2019. 1. p. 82-87.
7. Korneykova M.V., Myazin V.A., Fokina N.V., Chaporgina A.A. Bioremediation of soil of the Kola peninsula (Murmansk region) contaminated with diesel fuel // *Geography, Environment, Sustainability*. 2021. 14 (1).
8. Koyama A., Wallenstein M., Moore J. Soil bacterial community composition altered by increased nutrient availability in Arctic tundra soils // *Environmental Science, Medicine Frontiers in Microbiology*. 2014. 5. p. 1-16.
9. Myazin, V.A., Korneykova, M.V., Chaporgina, A.A., Fokina, N.V., Vasilyeva, G.K. The effectiveness of biostimulation, bioaugmentation and sorption-biological treatment of soil contaminated with petroleum products in the Russian Subarctic // *Microorganisms*. 2021. 9. 1722.

РАСЧЕТ ФАКТОРОВ ЭКОЛОГИЧНОСТИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ МИСКАНТУСА ГИГАНТСКОГО

Н.А. Шавыркина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), г. Бийск, Россия

Одним из основных требований к современным промышленным процессам, является требование минимизации вреда для окружающей среды. Переработка растительной биомассы считается одним из самых перспективных направлений получения промышленно значимых продуктов. Процессы биотрансформации растительного сырья относятся к наиболее экологичным процессам. В данной работе приведена схема биотрансформации биомассы мискантуса гигантского в биоэтанол, бактериальную наноцеллюлозу и молочную кислоту. Эта схема оценивалась с точки зрения получения максимальных выходов целевых продуктов и минимизации воздействия на окружающую среду. Можно однозначно отметить преимущество одностадийной обработки мискантуса гигантского разбавленным раствором азотной кислоты, этот метод позволяет повысить выход биоэтанола на 11-40 %, бактериальной наноцеллюлозы на 13-30 %, молочной кислоты на 7-28 %, по сравнению с другими способами предобработки. В этом случае факторы экологичности имеют наименьшие значения, причём наиболее экологичным является трансформация биомассы мискантуса гигантского в бактериальную наноцеллюлозу.

Ключевые слова: мискантус гигантский, щелочная делигнификация, азотная кислота, ферментативный гидролиз, биоэтанол, бактериальная наноцеллюлоза, молочная кислота, фактор экологичности.

CALCULATION OF ECOLOGICAL FACTORS OF BIOTECHNOLOGICAL TRANSFORMATION OF MISCANTHUS GIANTUS

N.A. Shavyrkina

*Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies of the Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Biysk, Russia*

Abstract

One of the main requirements for modern industrial processes is the requirement to minimize harm to the environment. Processing of plant biomass is considered one of the most promising areas for obtaining industrially significant products. Biotransformation processes of plant raw materials are among the most environmentally friendly processes. This paper presents a scheme for the biotransformation of giant miscanthus biomass into bioethanol, bacterial nanocellulose and lactic acid. This scheme was evaluated from the point of view of obtaining maximum yields of target products and minimizing the impact on the environment. It is possible to clearly note the advantage of one-stage processing of giant miscanthus with a dilute solution of nitric acid, this method allows to increase the yield of bioethanol by 11-40%, bacterial nanocellulose by 13-30%, lactic acid by 7-28%, compared with other methods of pre-treatment. In this case, environmental factors have the lowest values, and the most environmentally friendly is the transformation of giant miscanthus biomass into bacterial nanocellulose.

Key words: *Miscanthus giganteus*, alkaline delignification, nitric acid, enzymatic hydrolysis, bioethanol, bacterial nanocellulose, lactic acid, environmental factor.

Введение

Важнейшим преимуществом использования биомассы в технологических процессах является её экологичность. В процессе роста биомасса связывает углекислый газ и обеспечивает отрицательный углеродный баланс, а при её технологической переработке достигается критерий углеродной нейтральности, что крайне важно в современных условиях [1,5]. Наиболее эффективным источником биомассы являются энергетические растения, одним из самых значимых энергетических растений во всем мире признан мискантус. Мискантус в основном используется для производства тепла и электроэнергии, а также активно вытесняет древесину в технологиях получения бумаги и выделения натуральной целлюлозы [2,3,11]. Но потенциальный спектр его применений намного шире. В данной работе представлена схема биотехнологической трансформации биомассы мискантуса в промышленно ценные продукты: биоэтанол, бактериальную наноцеллюлозу и молочную кислоту. Приведена оценка этой схемы с точки зрения влияния способа предобработки биомассы на выход целевых продуктов и экологичность процессов биотрансформации.

Оборудование и материалы

В качестве сырья был использован мискантус гигантский российской селекции (сорт КАМИС), предоставленный ООО «Мастер Брэнд», г. Москва, Россия.

Предобработка сырья была проведена в лабораторных условиях при атмосферном давлении и температуре 90-96 °С с получением следующих продуктов:

1) продукт азотнокислой обработки (ПАО) получен обработкой сырья 4 %-ным раствором азотной кислоты в одну стадию;

2) продукт щелочной делигнификации (ПЩД) получен обработкой сырья раствором 4 %-ного гидроксида натрия в одну стадию;

3) техническая целлюлоза, азотнокислый способ (ЦАС) получен в две стадии: путём обработки ПАО 4 %-ным раствором гидроксида натрия;

4) техническая целлюлоза, модифицированный щелочной способ (ЦМЩС) получен в две стадии: путём обработки ПЩД 4 %-ным раствором азотной кислоты.

Далее проводили ферментативный гидролиз всех четырёх субстратов, полученные сахарные растворы подвергали сбраживанию с образованием трёх продуктов:

– биоэтанола с помощью *Saccharomyces cerevisiae* Y-3136 (ВКПМ), в условиях, описанных в работе [9]. Начальная концентрация субстрата 60 г/л, применена авторская технология совмещенного ферментативного гидролиза и спиртового брожения;

– бактериальной наноцеллюлозы с помощью *Medusomyces gisevii* Sa-12 (ВКПМ) в условиях, описанных в работе [10]. Начальная концентрация субстрата 30 г/л;

– молочной кислоты с помощью *Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus* (ООО «Барнаульская биофабрика») [8]. Начальная концентрация субстрата 90 г/л.

5) факторы экологичности рассчитывались как отношение суммарного количества образующихся отходов к сумме целевых продуктов [7]. Таким образом, чем ниже значение фактора экологичности, тем более экологичным является процесс.

Работа выполнена с использованием приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН.

Обсуждение результатов

На рис. 1 представлена схема переработки биомассы мискантуса с указанием выходов целевых продуктов и побочных продуктов (отходов), расчеты произведены на 1000 кг сухой биомассы мискантуса. Массы основных и побочных продуктов приведены в натуральном выражении, без пересчёта масс на абсолютно сухие вещества.



Рисунок 1. Схема биотехнологической трансформации биомассы мискантуса

Биотехнологическая трансформация биомассы мискантуса предполагает обязательную стадию предобработки для подготовки биомассы к последующему ферментативному гидролизу. В процессе предобработки происходит извлечение лигнина из биомассы и очень важна очередность обработки биомассы растворами азотной кислоты и щелочи: при использовании азотной кислоты (ПАО, ЦАС) происходит гумификация органических веществ мискантуса и образующийся раствор можно использовать в качестве лигногуминового удобрения; при первичном воздействии щелочи (ПЩД, ЦМЩС) образуется концентрированный щелочной раствор, содержащий извлеченные органические вещества, он может быть реализован для получения бетона повышенной прочности в строительстве [6], либо может быть использован для выделения лигнина и получения его производных [4].

Полученные данные свидетельствуют о том, что стадия предобработки оказывает значительное влияние на выход целевых продуктов: самой результативной оказалась одностадийная обработка азотной кислотой (ПАО), выход биоэтанола повышается на 11-40 %, бактериальной наноцеллюлозы на 13-30 %, молочной кислоты на 7-28 %, по сравнению с другими способами предобработки.

В табл. 1 приведены значения факторов экологичности для процессов биотрансформации биомассы мискантуса в промышленно значимые продукты. При этом, при получении каждого продукта учитывалась стадия предобработки с образованием целевого продукта (удобрения или концентрированного щелочного раствора) – его массу прибавляли к массе целевых продуктов биотрансформации, и побочных продуктов (промывных вод) – их массу складывали с массой побочных продуктов.

Таблица 1

Факторы экологичности для процессов биотрансформации биомассы мискантуса в промышленно значимые продукты

Продукт	Вид предобработки биомассы мискантуса			
	ПАО	ПЩД	ЦАС	ЦМЩС
Фактор экологичности				
Биоэтанол	11,0	11,0	18,6	18,6
Бактериальная наноцеллюлоза	8,3	8,6	11,0	11,7
Молочная кислота	10,6	10,7	18,6	18,7

При оценке экологичности процессов биотрансформации биомассы мискантуса, можно так же констатировать, что для минимизации воздействия на окружающую среду, необходимо предобрабатывать биомассу мискантуса гигантского через получение ПАО путем одностадийной обработки разбавленной азотной кислотой. В этом случае факторы экологичности имеют наименьшие значения, причём наиболее экологичным является трансформация биомассы мискантуса гигантского в бактериальную наноцеллюлозу.

Заключение

Оценивая процессы биотехнологической трансформации биомассы мискантуса гигантского в биоэтанол, бактериальную наноцеллюлозу и молочную кислоту с точки зрения количественных выходов и экологичности, можно однозначно отметить преимущество одностадийной обработки мискантуса гигантского разбавленным раствором азотной кислоты, этот метод позволяет повысить выход биоэтанола на 11-40 %, бактериальной наноцеллюлозы на 13-30 %, молочной кислоты на 7-28 %, по сравнению с другими способами предобработки. В этом случае факторы экологичности имеют наименьшие значения, причём наиболее экологичным является трансформация биомассы мискантуса гигантского в бактериальную наноцеллюлозу.

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

Библиографический список

1. Al Souki, K.S., Burdová, H., Trubač, J., Štojdl, J., Kuráň, P., Kříženecká, S., Machová, I., Kubát, K., Popelka, J., Malinská, H. A., Nebeská, D., Ust'ak, S., Honzík, R., Trögl, J. Enhanced carbon

sequestration in marginal land upon shift towards perennial C4 *Miscanthus* × *giganteus*: A case study in North-Western Czechia. *Agronomy*. **2021**, *11*, 293. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020293>

2. Barbash, V.A., Yashchenko, O.V., Vasylieva, O.A. Preparation and application of nanocellulose from *Miscanthus* × *giganteus* to improve the quality of paper for bags. *SN Appl. Sci.* **2020**, *2*, 727. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2529-2>

3. Boakye-Boaten, N.A., Kurkalova, L., Xiu, S., Shahbazi, A. Techno-economic analysis for the biochemical conversion of *Miscanthus* × *giganteus* into bioethanol. *Biomass and Bioenergy*. **2017**, *98*, 85-94. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.01.017>.

4. Brienza, F., Cannella, D., Montesdeoca, D., Cybulska, I., & Debecker, D. P. (2024). A guide to lignin valorization in biorefineries: traditional, recent, and forthcoming approaches to convert raw lignocellulose into valuable materials and chemicals. *RSC Sustainability*, *2*(1), 37-90. <https://doi.org/10.1039/D3SU00140G>

5. Dželetović, Ž., Andrejić, G. Z., Simić, A., Geren, H. Influence of rhizome mass on the crop establishment and dry matter yield of *Miscanthus* × *giganteus* over ten seasons. *Journal of Agricultural Sciences (Belgrade)*. **2019**, *64*(1), 21-35. <https://doi.org/10.2298/JAS1901021D>

6. Makul N. Modern sustainable cement and concrete composites: Review of current status, challenges and guidelines // *Sustainable Materials and Technologies/* 2020. 25. e00155. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2020.e00155>

7. Ovchinnikova E. V. et al. Bioprocessing of oat hulls to ethylene: Impact of dilute HNO₃-or NaOH-pretreatment on process efficiency and sustainability // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. – 2021. – Vol. 9. – №. 49. – P. 16588-16596. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c05112>

8. Shavyrkina NA, Skiba EA. Obtaining lactic acid from oat husks // *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021. *11* (1). 99–106. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-99-10621>

9. Skiba E.A., Ovchinnikova E.V., Budaeva V.V., Banzaraktsaeva S.P., Kovgan M.A., Chumachenko V. A., Mironova G.F., Kortusov A.N., Parmon V.N., Sakovich, G. V. *Miscanthus* bioprocessing using HNO₃-pretreatment to improve productivity and quality of bioethanol and downstream ethylene // *Industrial Crops and Products*. 2022. *177*. 114448. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114448>

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

11. Zhang, Y., Oates, L.G., Serate, J., Xie, D., Pohlmann, E., Bukhman, Y.V., Karlen, S.D., Young, M.K., Higbee, A., Eilert, D., Sanford, G.R., Piotrowski, J.S., Cavalier, D., Ralph, J., Coon, J.J., Sato, T.K., Ong, R.G. Diverse lignocellulosic feedstocks can achieve high field-scale ethanol yields while providing flexibility for the biorefinery and landscape-level environmental benefits. *GCB Bioenergy*. 2018, 1-16. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12533>

УДК 57.085.23

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ЭКСТРАКТОВ ПИХТЫ СИБИРСКОЙ (*ABIES SIBIRICA*), ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ ФЛЮИДНОЙ CO₂-ЭКСТРАКЦИИ

Е.Г. Шаповалова, А.Д. Бояринцева, А.А. Шейченко, М.О. Шкрובה, А.М. Захаркива
Томский государственный университет, Томск, Россия

Аннотация. Данная статья посвящена изучению биологических эффектов компонентов растительного сырья. Объектами исследования являются хвойные экстракты пихты сибирской (*Abies Sibirica*), выделенные из ее древесной зелени и хвои методом сверхкритической флюидной CO₂-экстракции. Проведены исследования антирадикальной активности посредством свободного радикала DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил), влияния образцов на секрецию провоспалительных цитокинов методом иммуноферментного анализа по параметрам TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, жизнеспособности мононуклеарных клеток с помощью резазурин-теста.

Ключевые слова: антирадикальная активность, жизнеспособность макрофагов, секреция провоспалительных цитокинов, *Abies Sibirica*.

STUDY OF BIOLOGICAL POTENTIAL OF SIBERIAN FIR EXTRACTS (*ABIES SIBIRICA*) OBTAINED BY SUPERCRITICAL FLUID CO₂ EXTRACTION

E.G. Shapovalova, A.D. Boyarintseva, A.A. Sheichenko, M.O. Shkrobova, A.M. Zakharkiva
Tomsk State University, Tomsk, Russia

Abstract. This article is devoted to the study of biological effects of plant components. The objects of the study are coniferous extracts of Siberian fir (*Abies Sibirica*), isolated from its wood greenery and needles by the method of supercritical fluid CO₂ extraction. The studies of antiradical activity by means of the free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), the effect of samples on the secretion of proinflammatory cytokines by the method of enzyme immunoassay for the parameters TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, the viability of mononuclear cells using the resazurin test were carried out.

Keywords: antiradical activity, macrophage viability, secretion of proinflammatory cytokines, *Abies Sibirica*.

Введение

Лекарственное растительное сырье как источник разнообразных биологически активных веществ широко известно и практически применимо как в народной, так и современной медицине. Интерес к разработкам новых препаратов на основе природного сырья растет с каждым днем, поскольку они имеют значительный потенциал биологического влияния на организм, в том числе устраняют или минимизируют негативные последствия процессов окисления, включая свободно-радикальное, снижают риски развития патологических процессов и угнетения организма и клеточных структур. Особое внимание уделяется хвойным породам, богатым фенольными и терпеновыми соединениями, жирными кислотами, эфирными маслами и витаминами, что обуславливает значительные фармакотерапевтические эффекты на организм.

Пихта сибирская (*Abies Sibirica*) – уникальный источник ценных природных соединений, среди которых особое значение имеют эфирные масла и тритерпеновые кислоты. Так, пихтовая лапка (охвоенные концы ветвей) содержит до 2,5% эфирного масла, состоящего из борнилацетата, борнеола, камфена, пинена и др. [1]. Экстракт из пихтовой лапки проявляет общеукрепляющее действие, нормализует показатели артериального давления, применяется при лечении заболеваний нервной системы, аллергиях, анемии, обладает бактерицидными свойствами. На сегодняшний день уже имеются сведения о влиянии тритерпеновых кислот на

организм. Установлено, что они обладают антиоксидантным действием, которое обусловлено их способностью косвенно влиять на антирадикальную защиту [2]. В работе Ovesna [4] рассмотрен их цитотоксический эффект на раковые клетки. В исследованиях Fulda, Kroemer [3] отмечено их негативное воздействие на фибробласты, меланоциты, кератиноциты, нейронные клетки, лимфоциты. Работы Saaby, Nielsen [6] свидетельствуют о способности тритерпеновых кислот ингибировать продукцию цитокинов TNF- α и IL-6. Однако во всех вышеперечисленных исследованиях были изучены биологические эффекты только тритерпеновых кислот. В то время как совокупное их воздействие с соединениями других классов биологически активных веществ не описано в литературе, как и влияние тритерпеновых кислот на выработку цитокинов IL-1 β и IL-10.

Целью данной работы стало исследование антирадикальной активности образцов хвойных экстрактов пихты сибирской, их влияние на секрецию провоспалительных цитокинов и жизнеспособность мононуклеарных клеток. Это позволит углубить знания, способствуя разработке новых более эффективных и безопасных лекарственных препаратов на основе сырья хвойных пород и развитию фармакоиммунологии.

Экспериментальная часть

Исследуемые образцы представляют собой хвойные экстракты пихты сибирской (*Abies Sibirica*), выделенные из ее древесной зелени и хвои методом сверхкритической флюидной CO₂-экстракции. В своем химическом составе образцы содержат как дитерпеновые и тритерпеновые кислоты, так и смоляные, легкие карбоновые кислоты, мыла, хлорофиллы, калиевые соли жирных кислот. Некоторые характеристики образцов, включая концентрации основных БАВ, приведены ниже в табл. 1.

Таблица 1

Характеристики исследуемых образцов пихты сибирской					
№ п/п	1	2	3	4	5
Влажность, %	73,20	33,50	48,30	77,20	29,50
Сухой остаток, %	26,80	66,50	51,70	22,80	71,50
pH	9,90	9,50	8,12	8,28	8,92
Содержание ТТК, %	44	12	67	< 1	64

Образцы 1 и 2 получали в разные временные периоды по технологии очистки целевых компонентов. Образцы 3 и 4 были получены из шрота по укороченной технологии очистки целевых компонентов. Образец 5 был изготовлен по технологии аналогичной образцам 1 и 2 путем выделения БАВ из масляно-эфирного комплекса углекислотной экстракции. Для исследований была приготовлена серия растворов образцов с концентрациями 800, 400, 200 и 100 мкг/мл путем последовательного разбавления.

Метод определения антирадикальной активности основан на восстановлении антиоксидантами свободного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ). Спектрофотометрически измеряли значение оптической плотности в процессе взаимодействия ДФПГ-радикала и антиоксидантов и наблюдали обесцвечивание пурпурно-синей окраски радикала. Анализ образцов проводили на приборе СФ-2000 в кювете толщиной слоя жидкости 10 мм при длине волны 517 нм. В качестве стандарта-антиоксиданта использовали аскорбиновую кислоту.

Для оценки жизнеспособности клеток моноциты выделяли из лейкотромбослоя человека методом двойной магнитной сепарации [5]. В качестве контроля применяли клетки, посеянные на пластике. Клетки инкубировали при температуре 37°C и 7,5% CO₂ в течение 6 дней. Оценку жизнеспособности осуществляли посредством резазурин-теста. Флуоресценцию измеряли на микроридере Tecan Infinite 200 Pro при длинах волн 590 нм и 560 нм.

Оценку влияния образцов на секрецию провоспалительных цитокинов первичными макрофагами человека проводили методом иммуноферментного анализа по следующим параметрам: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 (Вектор-БЕСТ, Россия). Оптическую плотность растворов измеряли на микропланшетном фотометре Tecan Infinite F50 при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 620 нм.

Обсуждение результатов

В результате исследования антирадикальной активности экстрактов пихты сибирской были получены следующие данные, приведенные в табл. 2 и на рис. 1.

Таблица 2

Антирадикальная активность исследуемых образцов и стандарта-антиоксиданта

С, мкг/мл	Антирадикальная активность, %					
	№ п/п					Аскорбиновая кислота
	1	2	3	4	5	
800	54,866	57,254	60,120	42,508	60,478	97,672
400	57,672	58,269	60,478	47,881	58,986	98,090
200	57,732	56,418	56,956	47,344	54,568	97,075
100	54,747	54,030	47,344	49,911	47,045	92,776

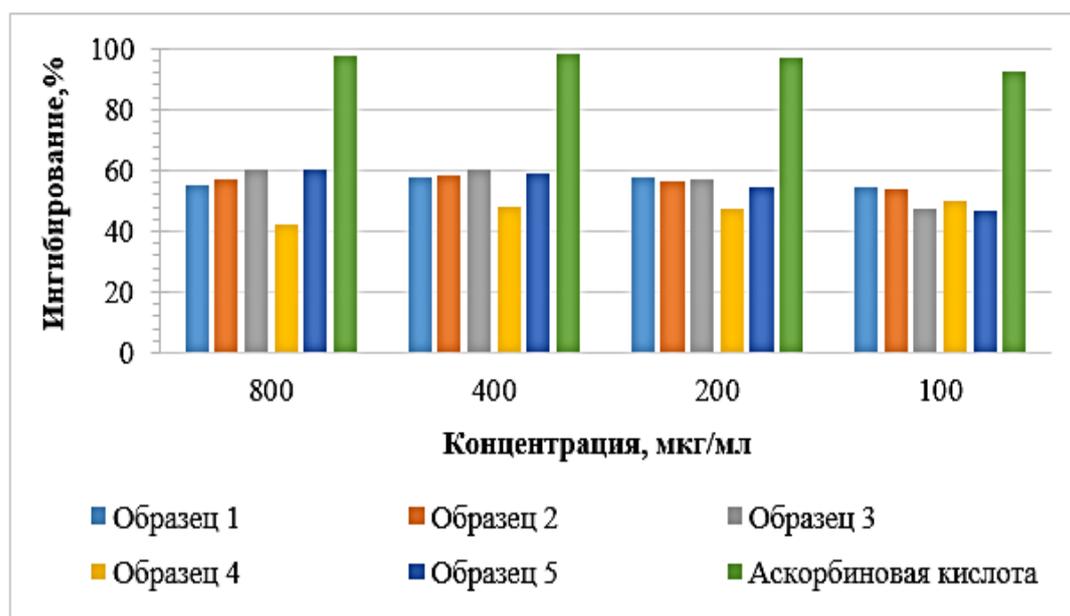


Рис. 1. Гистограмма антирадикальной активности образцов

Результаты демонстрируют тенденцию к возрастанию антирадикальной активности при увеличении концентрации образцов в растворе в среднем с 47,0% до 60,5%. Наибольшие значения показателя антирадикальной активности наблюдаются у образца 5 (60,5%) концентрацией 800 мкг/мл и образца 3 (60,5% и 60,1%) концентрацией 400 и 800 мкг/мл соответственно, наименьшие – образца 3 (47,3 %) концентрацией 100 мкг/мл, образца 4 (47,3 %) концентрацией 200 мкг/мл и образца 5 (47,0 %) концентрацией 100 мкг/мл. Высокие показатели образцов 3 и 5 при концентрации 800 мкг/мл предположительно связаны с относительно высоким содержанием тритерпеновых кислот (67% и 65% соответственно), согласно табл. 1, проявляющих антиоксидантные и антирадикальные свойства. Исследование жизнеспособности мононуклеарных клеток показало, что исследуемые образцы преимущественно подавляют жизнеспособность клеток иммунной системы через 6 дней их культивации (рис. 2).

Образец 4 обладает наименее выраженным негативным эффектом, показатель жизнеспособности по сравнению с положительным контролем составляет 78,75; 46,53 и 94,81% соответственно. У донора 3 образцы 1 и 2 имеют показатели жизнеспособности, превышающие 100%, что может быть обусловлено индивидуальной реакцией организма. Сопоставляя полученные результаты и содержание в образцах тритерпеновых кислот (табл. 1), можно предположить, что высокие концентрации тритерпеновых кислот обуславливают негативный эффект на жизнеспособность клеток.

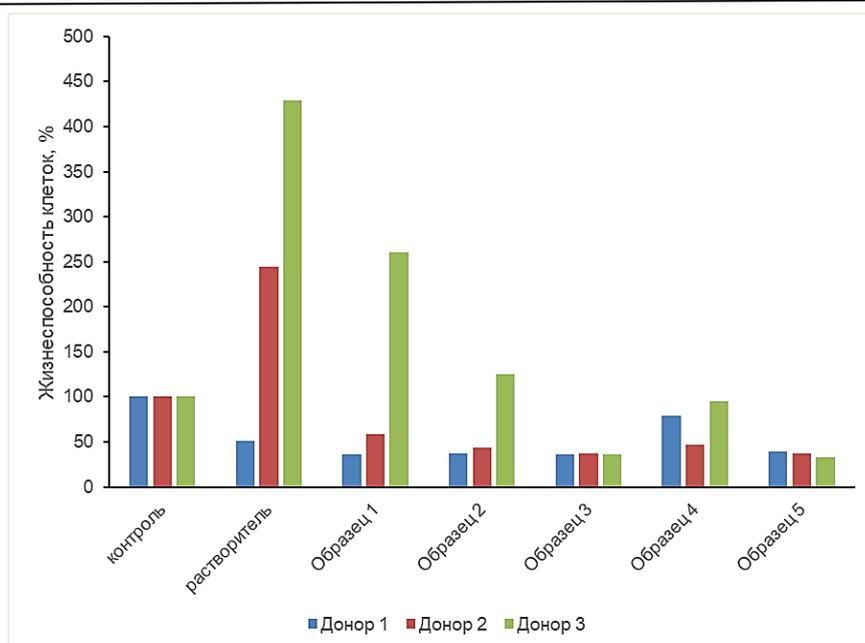
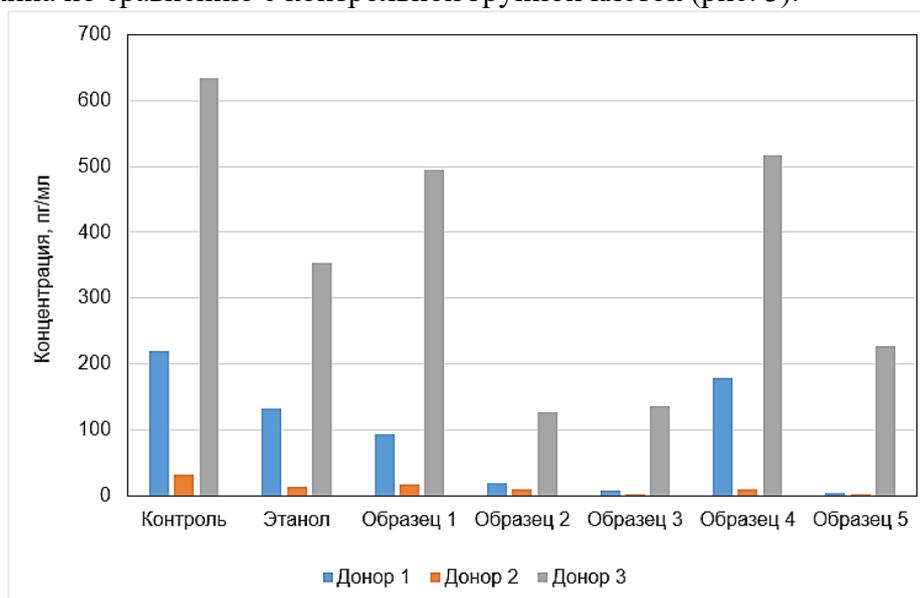


Рис. 2. Влияние образцов на жизнеспособность макрофагов

Показатели влияния образцов на секрецию провоспалительных цитокинов представлены на рисунках 3, 4, 5, 6. Определение концентрации TNF- α выявило, что добавление образцов, содержащих тритерпеновые кислоты, к культуре клеток существенно снижает выработку данного цитокина по сравнению с контрольной группой клеток (рис. 3).

Рис. 3. Влияние образцов на секрецию TNF- α макрофагами

Исследование по IL-1 β показало, что связь между выработкой макрофагами данного цитокина и составом среды не прослеживается в случае доноров 1 и 2 (рис. 4). В случае донора 3 обнаружено, что образцы 1, 2, 3 и 5 с относительно высоким содержанием тритерпеновых кислот по сравнению с образцом 4, подавляют выработку IL-1 β . Исследование по фактору IL-6 также установило, что образцы с наибольшим содержанием тритерпеновых кислот (3 и 5) снижают выработку данного цитокина у доноров 1 и 2 (рис. 5). Исследование по фактору IL-10 показало, что добавление образцов с повышенным содержанием тритерпеновых кислот также отрицательно влияет на выработку данного цитокина у доноров 1 и 3 (рис. 6). При наименьшей концентрации тритерпеновых кислот в образце (4) наблюдается относительно высокая выработка цитокина по сравнению с контрольной группой у доноров 1 и 3.

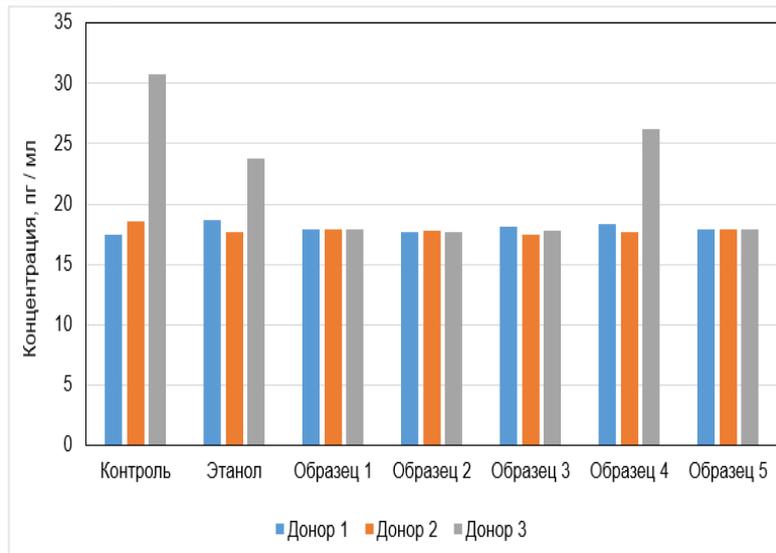


Рис. 4. Влияние образцов на секрецию IL-1β макрофагами

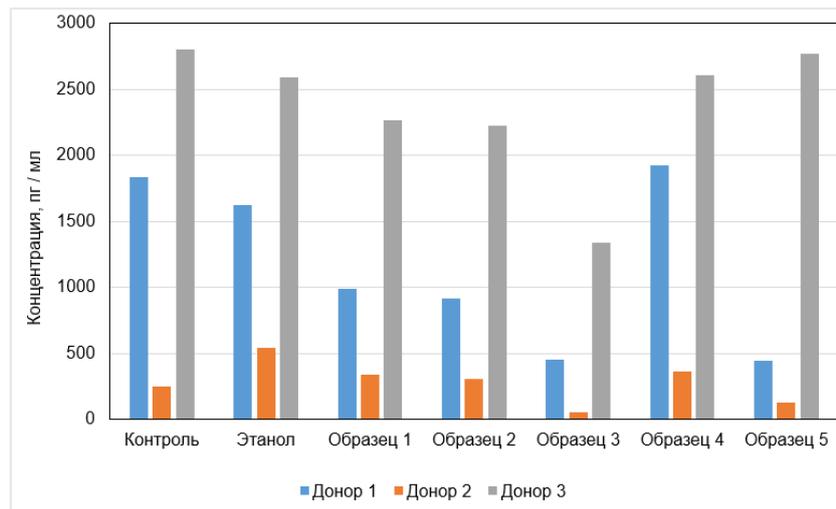


Рис. 5. Влияние образцов на секрецию IL-6 макрофагами

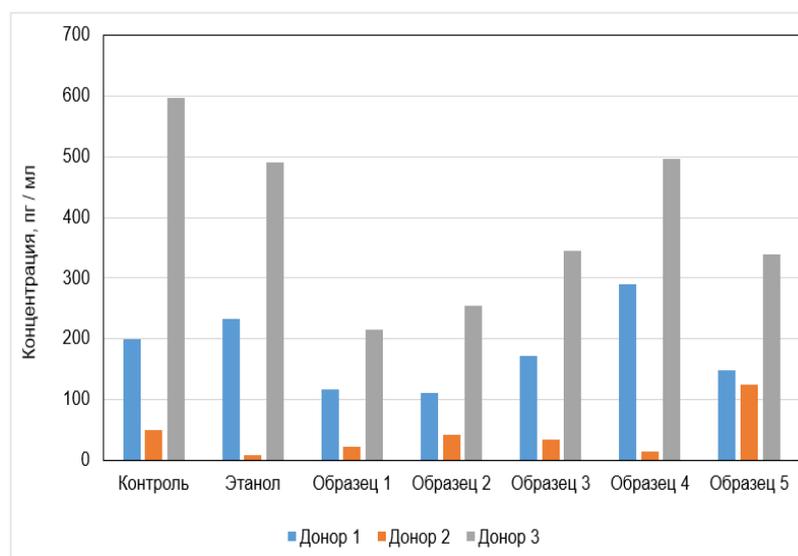


Рис. 6. Влияние образцов на секрецию IL-10 макрофагами

Заключение

Образцы хвойных экстрактов пихты сибирской обладают рядом биологических эффектов, таких как антирадикальная активность и противовоспалительный эффект. Так, экспериментально подтверждено, что экстракты проявляют антирадикальную активность в пределах от 47,0 до 60,5% относительно стандарта-антиоксиданта – аскорбиновой кислоты. Также прослеживается тенденция к возрастанию показателя антирадикальной активности с увеличением концентрации тритерпеновых кислот в образцах.

Оценка влияния экстрактов на жизнеспособность макрофагов установила прямую зависимость между низкой выживаемостью клеток и высоким содержанием тритерпеновых кислот. Лучшие показатели жизнеспособности (78,75; 46,53 и 94,81%) соответствуют содержанию тритерпеновых кислот менее 1%. Также экстракты с повышенной концентрацией тритерпеновых кислот демонстрируют противовоспалительный эффект, поскольку снижают выработку провоспалительных факторов TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10.

Между жизнеспособностью макрофагов и выработкой ими цитокинов обнаружена прямая связь: низкая жизнеспособность клеток соответствует низким показателям интенсивности выработки провоспалительных гуморальных факторов. Выработка цитокинов IL-6 и IL-1 β донор-специфичны, т.к. их секреция во многом не зависит от внешних воздействий.

Учитывая результаты экспериментальных исследований, можно говорить о том, что хвойные экстракты пихты сибирской с соответствующим уровнем содержания тритерпеновых кислот перспективны как противовоспалительные, противовирусные, иммуностимулирующие средства. Также могут быть эффективными при лечении инфекционных, аллергических, аутоиммунных заболеваний, т.к. оказывают непосредственное влияние на концентрацию цитокинов в межклеточной среде.

Благодарности. Результаты были получены в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки России, проект № FSWM-2024-0009

Библиографический список

1. Калинкина Г.И., Е.Н. Сальникова, В.Н. Тихонов Лекарственные растения, сырье и фитопрепараты: учебное пособие, часть I. – Томск: СибГМУ, 2004. – 111 с:
2. Карпова Е. М. Новые подходы к оценке фармакологической активности полипренолов и тритерпеновых кислот из хвои пихты сибирской : автореф. дис. ... канд. биол. наук / Е. М. Карпова. – Томск, 2009. – 23 с.
3. Fulda S., Kroemer G. Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers // *Drug discovery today*. – 2009. – Vol. 14. – № 17-18. – P. 885-890
4. Ovesna Z. [et al.] Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds Minireview // *Neoplasma*. – 2004. – Vol. 51. – № 5. – P. 327-333
5. Popova A., Kzhyshkowska J., Nurgazieva D. [et al.] Pro- and anti-inflammatory control of M-CSF-mediated macrophage differentiation // *Immunobiology*. – 2011. – Vol. 216, is. 1-2. – P. 164-172
6. Saaby L., Nielsen C. H. Triterpene Acids from Rose Hip Powder Inhibit Self-antigen-and LPS-induced Cytokine Production and CD4+ T-cell Proliferation in Human Mononuclear Cell Cultures // *Phytotherapy Research*. – 2012. – Vol. 26. – № 8. – P. 1142-1147

УДК 543.94

ПРЕДПОДГОТОВКА СОЛОМЫ ПШЕНИЦЫ В СРЕДЕ ГЛУБОКОГО ЭВТЕКТИЧЕСКОГО РАСТВОРИТЕЛЯ ДЛЯ ФЕРМЕНТОЛИЗА

С.С. Шапкина, С.Н. Евстафьев

*ФГБОУ ВО Иркутский национальный исследовательский технический университет,
г. Иркутск, Россия*

Работа посвящена изучению возможности повышения выхода сахаров при ферментативном гидролизе технической целлюлозы путём предварительной обработки соломы пшеницы в среде хлорид холина / щавелевая кислота. Обработка соломы выполнена в интервале температур 80-110 °С. Полученные фракции технической целлюлозы характеризуются повышенным содержанием целлюлозы. Показано, что предварительная обработка способствует повышению доступности полисахаридов сырья к последующему ферментализу. С увеличением температуры предподготовки выход сахаров возрастает, достигая максимума при ферментализе фракции, полученной при 100 °С – 28,8 % масс.

Ключевые слова: ферментализ, техническая целлюлоза, глубокий эвтектический растворитель, солома пшеницы.

Огромным потенциалом среди альтернативных источников сырья обладают отходы агропромышленного комплекса (солома, шелуха и т.д.) [1]. Бесспорным достоинством этого типа отходов является ежегодная воспроизводимость, отсутствие необходимости материальных вложений и выделения отдельных земель для выращивания. Переработка лигноцеллюлозных отходов позволяет получить ряд высокостоймых продуктов [2-4]. Одним из активно применяемых способов переработки растительных отходов является гидролиз. В промышленности, для повышения эффективности этого процесса, широкое применение получили кислотные катализаторы [5]. Однако, в последние годы множество исследований направлено на совершенствование способов ферментативного гидролиза различного сырья и отходов [6,7]. Помимо мягких условий, к преимуществам применения ферментов относят возможность селективно и специфично воздействовать на субстрат – полисахариды сырья. Полученный ферментализат по составу представляет собой смесь моносахаридов. Ферментативная конверсия также позволяет избежать протекания вторичных превращений полученных сахаров.

Основные компоненты растительной биомассы: полисахариды (целлюлоза и гемицеллюлозы) и лигнин. Последний отвечает за обеспечение жесткой структуры, препятствуя внешним воздействиям (механическим, химическим, биологическим и т.д.). Соответственно, задача предварительной обработки состоит в эффективном удалении лигнина, повышая тем самым доступность полисахаридов для направленного действия ферментов. Перспективным направлением в последние годы выступает применение «зеленых» технологий – экологически безопасных и биоразлагаемых растворителей. Глубокие эвтектические растворители (DES) показали высокую эффективность конверсии различных типов растительного сырья, высокие показатели степени делигнификации [8,9].

Цель настоящей работы - изучение влияния предварительной обработки соломы в среде глубокого эвтектического растворителя на выход сахаров при ферментативном гидролизе.

Объектом исследования являлась солома пшеницы. Компонентный состав, % на абсолютно сухую массу: целлюлоза 49,3; гемицеллюлоза 21,3; лигнин 18,7. Подготовка соломы включала стадии исчерпывающей экстракции спирто-толуольной смесью в аппарате Сокслета, измельчение до крупности 0,2 мм и высушивание. Для получения DES использованы хлорид

холина и щавелевая кислота в молярном соотношении 0,75:1. Обработку соломы в среде DES (гидромодуль 1:20) проводили в интервале температур 80–110 °С.

Из полученной смеси выделяли техническую целлюлозу (рис. 1), а также фракции гемицеллюлоз и лигнина. Для этого смесь твердых и жидких продуктов центрифугировали, твердый остаток обрабатывали 3%-ным раствором NaOH, после чего отфильтровывали и промывали дистиллированной водой (фракция технической целлюлозы). Фильтрат концентрировали и доводили до нейтрального значения pH 1 М раствором HCl, после добавления спирта выпал осадок гемицеллюлоз.

После центрифугирования жидкую часть доводили до pH = 2 и выдерживали при 70 °С в течение 30 мин. Образовавшийся осадок лигнина отделяли центрифугированием. Все фракции высушивали до постоянной массы. Компонентный состав исходной соломы и полученных фракций определяли по общепринятым методикам [10].

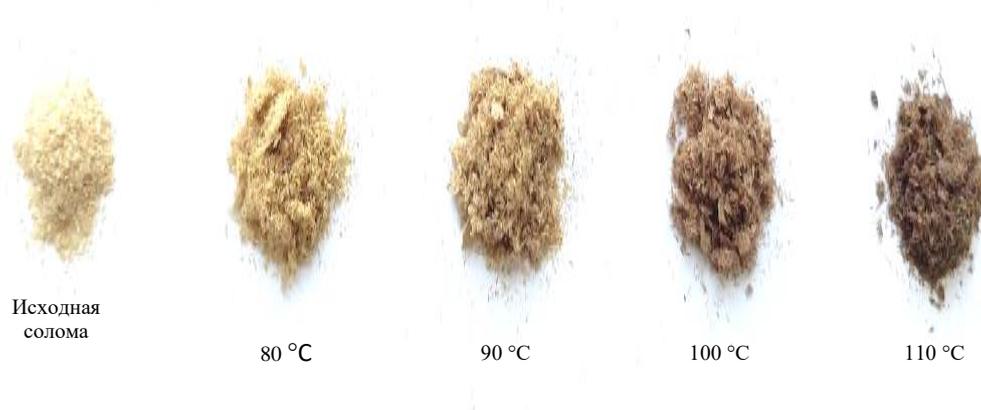


Рисунок 1. Исходная солома и фракции технической целлюлозы

Ферментативный гидролиз фракций технической целлюлозы осуществляли в следующих условиях: температура 50 °С, продолжительность 4 и 48 ч. Для эффективного разрушения полисахаридов исследуемого сырья применяли комплексный ферментный препарат «Целлолюкс-А» (ПО «Сиббиофарм»), обладающий целлюлазной, ксиланазной и β-глюканазной активностью. Концентрация ферментного препарата – 2,5 мг/см³, pH среды – 4,7-4,8, гидромодуль 1:50. Выход редуцирующих веществ определяли методом Дюбуа.

Согласно полученным данным, обработка в среде DES позволяет получить обогащенную целлюлозой фракцию технической целлюлозы. Содержание целлюлозы увеличивается в 1,6 раз уже при температуре 80 °С. Протекание процесса делигнификации, результатом которого является снижение содержания лигнина (в 1,9 раза при 80 °С, в 2,9 – при 100 °С), способствует повышению доступности полисахаридов сырья к действию ферментного препарата.

Выход редуцирующих веществ из исходной соломы при ферментализе в течение 4 ч составил 8,6 % масс, а из фракции технической целлюлозы, полученной при температуре 80 °С – 14,5 % масс. (рис. 2).

С повышением температуры обработки выход сахаров при ферментализе возрастает, при 100 °С достигая 28,8 % масс, что в 3,3 раза больше, чем из исходной соломы. При продолжительности ферментализа 48 ч выход редуцирующих веществ увеличился до 55,6 % масс, что почти в 5 раз превышает выход редуцирующих веществ из исходной соломы в тех же условиях.

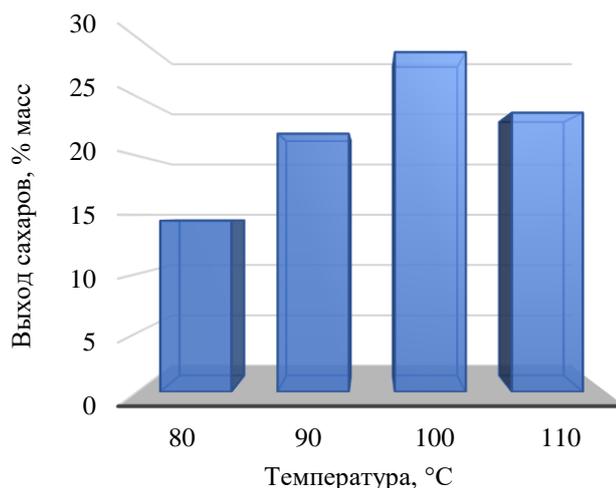


Рисунок 2. Выход редуцирующих веществ при обработке фракций технической целлюлозы

Библиографический список

1. Будаева В. В. Скиба Е.А., Гисматулина Ю.А. и др. Химическая и биотехнологическая переработка недревесного сырья в высокостоймые продукты // *Фундаментальные исследования и практические разработки в области технической химии.* – 2021. – С. 220–226. DOI: 10.5398/9785925703335_8
2. Болтовский, В. С. Ферментативный гидролиз растительного сырья: состояние и перспективы // *Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук.* – 2021. – Т. 57, № 4. – С. 502–512. DOI: 10.29235/1561-8331-2021-57-4-502-512
3. Veluchamy, C., Kalamdhad, A.S., Gilroyed, B.H. Advanced pretreatment strategies for bioenergy production from biomass and biowaste // *Handb. Environ. Mater. Manag.* – 2018. – С. 1–19. DOI: 10.1007/978-3-319-73645-7_45
4. Singh A., Prajapati P., Vyas S., Gaur V. K., Sindhu R., Binod P., Kumar V., Singhanian R. R., Awasthi M. K., Zhang Z., Varjani S. A Comprehensive Review of Feedstocks as Sustainable Substrates for Next-Generation Biofuels // *Bioenergy Research* 16, 2023. Pp. 105–122. DOI: 10.1007/s12155-022-10440-2
5. Болотникова О. И. Кислотный и ферментативный гидролиз непищевых источников растительной биомассы: перспективы промышленной реализации / О. И. Болотникова, Н. П. Михайлова, А. И. Гинак // *Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета).* – 2017. – № 39. – С. 89–95. DOI: 10.15217/issn1998984-9.2017.88
6. Сергеев Л. А., Логвинова А.С., Болтовский В.С. Подготовка соломы зерновых культур к биотехнологической переработке // *Труды БГТУ.* – 2020. – 2. – № 1. – С. 173–182.
7. Байбакова О.В. Химико-ферментативная конверсия в биоэтанол отходов злаковых культур // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.* – 2016. – Т. 6. – № 2. – С. 51–56. DOI: 10.21285/2227-2925-2016-6-2-51-56
8. Hou XD, Feng GJ, Ye M, et. al. Significantly enhanced enzymatic hydrolysis of rice straw via a high-performance two-stage deep eutectic solvents synergistic pretreatment // *Bioresour Technol.* – 2017. – P. 139–146. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.04.027
9. Maibam PD, Goyal A. Approach to an efficient pretreatment method for rice straw by deep eutectic solvent for high saccharification efficiency // *Bioresour Technol.* – 2022. – P. 127057. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127057
10. Оболенская А.В. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы / – М.: – 1968. – 512 с.

**ПРИРОДООХРАННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ
БОЛЬШОГО АЛТАЯ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ ТЕРРИТОРИЙ**

УДК 576.5:57.085.23

**ПУТИ К ПОЛУЧЕНИЮ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ КЛОНОВ ПЛЮСОВЫХ
ДЕРЕВЬЕВ *PINUS SYLVESTRIS* L.*****Р.В. Игнатенко, М.А. Ершова, О.В. Чирва, Н.А. Галибина****Институт леса — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», Петрозаводск, Россия*

Проведено изучение растений-доноров эксплантов *Pinus sylvestris* с Петрозаводской лесосеменной плантации, способных к инициации соматического эмбриогенеза, а также оценка формирования эмбрионных клеточных линий на питательных средах MSG, с разным содержанием и источниками фитогормонов. Инициация соматического эмбриогенеза была отмечена у эксплантов отобранных с 2 из 9 исследуемых клонов плюсовых деревьев. Установлено, что эмбрионные массы клеток образовывались с низкой частотой на всех исследуемых субстратах. Начальные этапы вызревания соматических зародышей регистрировали после семидневного выдерживания масс клеток на среде без гормонов, а затем на субстрате с АБК. По окончании эксперимента растения-регенеранты *Pinus sylvestris* получить не удалось.

Ключевые слова: соматический эмбриогенез, культура *in vitro*, фитогормоны, зародыши, сосна обыкновенная, лесосеменная плантация, Карелия.

Одним из перспективных направлений в области биотехнологического размножения хвойных растений является применение метода соматического эмбриогенеза [4; 15]. Данная технология позволяет получить большое количество растений с селекционно-значимыми признаками. Особенно это актуально для хвойных видов, которые тяжело поддаются клонированию с использованием традиционных методов селекции [3]. Так, например, к ним относится широко распространённое на территории Евразии растение – сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.). Технология соматического эмбриогенеза для *P. sylvestris* была впервые описана финскими исследователями в 1996 г. [10], на сегодняшний день протоколы получения растений-регенерантов модифицированы [8] и успешно применяются на практике. Однако в России получение клонов *P. sylvestris* с использованием данного метода в проанализированной нами литературе описано не было, хотя при помощи соматического эмбриогенеза в нашей стране были получены растения-регенеранты для *Pinus pumila* (Pall.) Regel [13], *Larix sibirica* Ledeb. [14] и *Picea abies* (L.) H. Karst. [9].

Ранее нами были проведены исследования, направленные на подбор условий культивирования [1], а также поиск маркеров для оценки растений-доноров эксплантов *P. sylvestris* [6; 7], что способствовало получению эмбрионной культуры [2]. Целью данного исследования являлся подбор растений-доноров эксплантов *P. sylvestris* для инициации соматического эмбриогенеза, а также оценка формирования эмбрионных клеточных линий на разных субстратах и их дальнейшего развития.

Сбор незрелых шишек *P. sylvestris* проводили на Петрозаводской лесосеменной плантации I порядка 05 и 12 июля 2023 г. Сумма эффективных температур (при базовой температуре +5°C) в эти дни составляла 500 и 564 °C, соответственно. Отбор растительного материала производили 5 июля с клонов плюсовых деревьев 516-7, 835-2, 864-2, 876-1, 962-4, 1025-3, 1026-3, 1147-3, 1191-2; 12 июля с клонов 516-7, 864-2, 876-1, 962-4, 1025-3, 1026-3. Шишки до момента введения в культуру хранили в холодильнике при температуре +4°C не более одного месяца.

Незрелые шишки выдерживали в 15% мыльном растворе в течение 10 минут, затем

поверхность шишек очищали щёткой и промывали под проточной водой. В стерильных условиях шишки помещали в 96% этанол с добавлением нескольких капель ТВИН 20 и выдерживали в растворе 10 минут. После однократной промывки стерильной дистиллированной водой шишки вскрывали стерильными инструментами и извлекали семена. Собранные семена погружали в 5% раствор гипохлорита натрия на 10 минут, и 15% перекись водорода на 5 минут с трехкратной промывкой стерильной дистиллированной водой после каждого стерилизующего агента. Обработанные семена в асептических условиях бокса микробиологической безопасности очищали от покровных чешуй и мегагаметофиты, содержащие незрелые зиготические зародыши, горизонтально помещали на поверхность питательной среды по 4 шт. в банку [1].

В качестве субстрата использовали питательные среды на основе MSG [12], которые отличались разным содержанием фитогормонов (табл. 1). В культуру *in vitro* было введено 1860 эксплантов, собранных с 9 клонов плюсовых деревьев *P. sylvestris*.

Таблица 1

Содержание компонентов в питательных средах MSG

Компоненты	Инициации			Пролиферац ии	Предсозрева ния	Созревания	Созревания по Malabadi
	1	2	3				
2.4-Д, μM	13.6	18	–	9.1	–	–	–
6-БАП, μM	2.2	9	9	2.2	–	–	–
НУК, μM	–	–	2.7				
АБК, μM	–	–	–	–	–	60	80
ПЭГ 6000, г/л	–	–	–	–	–	46	–
Уголь, г/л	–	–	–	–	1	–	–
Сахароза, г/л	10	10	10	10	20	20	–
Мальтоза, г/л	–	–	–	–	–	–	60
Агар, г/л	6	6	6	6	6	6	21.6

Спустя месяц культивирования часть эксплантов и массы клеток перенесли на среду пролиферации (табл. 1). Для созревания соматических зародышей эмбрионную ткань после 7 месяцев пролиферации помещали (1) на одну неделю на субстрат без гормонов (предсозревания), а затем на среду созревания или (2) предварительно высушивали на фильтровальной бумаге в течении 24 часов, а затем культивировали на питательной среде созревания, модифицированной Malabadi [5; 11]. Экспланты на питательных средах культивировали в термостате в темноте при температуре $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

В результате исследования было установлено, что основная часть зиготических зародышей *P. sylvestris* в момент сбора шишек (05 и 12 июля) находилась на стадии развития – кливажной полиэмбрионии. Спустя 3-4 недели нахождения шишек в холодильнике при температуре $+4^\circ\text{C}$ большинство зародышей развились до стадии глобулярного лидирующего зародыша или глобулярного зародыша. В первые две недели культивирования контаминации подверглись 472 экспланта (25% от общего числа эксплантов). Инфекция в большинстве случаев развивалась из мегагаметофитов *P. sylvestris*. Эти данные не учитывались при дальнейшем анализе.

Экструзия зародыша была зарегистрирована у эксплантов, собранных с деревьев 1025-3, 864-2, 876-1, в среднем на 20 ± 2 сутки эксперимента. Массы клеток формировались у эксплантов с клонов плюсовых деревьев 962-4 (1 шт.) и 864-2 (3 шт.). Данные культуры клеток являлись эмбрионными, поскольку в них образовывались соматические зародыши (рис. 1).

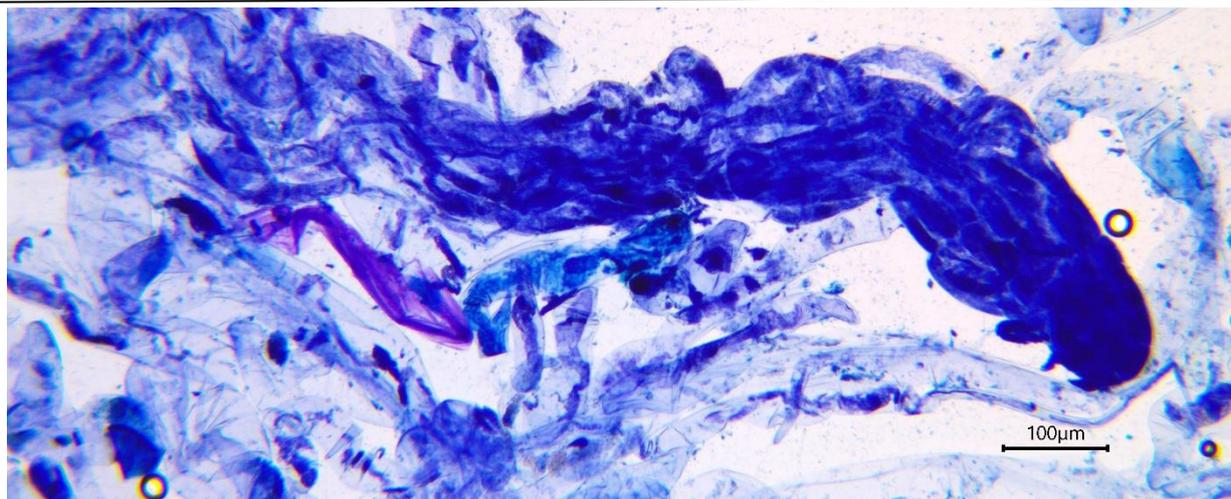


Рисунок 1. Глобулярный соматический зародыш *Pinus sylvestris*, окрашенный растворами сафранина и метиленового синего

Экструзия зародыша наблюдалась на всех средах инициации у 0.4-1.3% эксплантов, введенных в культуру *in vitro* (табл. 2). Доля эксплантов, образовавших эмбрионально-суспензорные массы на 16-38 сутки исследования, варьировала от 0.2 до 0.4% в зависимости от субстрата. После двух месяцев культивирования сохранились 2 клеточные линии, полученные от мегагаметофитов дерева 864-2.

Таблица 2

Частота образования экструзий и эмбрионных масс клеток *Pinus sylvestris* в культуре *in vitro*

Частота образования, %	Варианты среды инициации MSG		
	1	2	3
Экструзии	1.1	1.3	0.4
Эмбрионные массы клеток	0.3	0.2	0.4

Предварительно подсушенные в чашке Петри на фильтровальной бумаге эмбрионально-суспензорные массы, помещали на среду MSG, модифицированную по Малабади, однако на данном типе субстрата клеточные линии погибали. В тоже время при недельном культивировании на среде предсозревания наблюдали подсушивание культур, а при перемещении клеточных линий на субстрат, содержащий 60 μ M АБК, регистрировали начальные этапы созревания соматических зародышей (рис. 2). Спустя месяц культивирования дальнейшего развития зародышей не наблюдали. На среде пролиферации на 9-10 месяц культивирования клеточные линии прекращали свой рост и погибали.

Таким образом, в результате проведенных исследований было получено 4 эмбрионные культуры (0.3%) от эксплантов, собранных с двух клонов плюсовых деревьев *P. sylvestris* (864-2, 962-4), что составляет 22% от общего числа изученных генотипов растений-доноров в 2023 г. При этом формирование эмбрионально-суспензорных масс из мегагаметофитов, содержащих зародыши, клона 864-2 происходило второй год подряд [2]. Известно, что использование ранее экспериментально отобранных деревьев-доноров эксплантов способствует повышению частоты инициации соматического эмбриогенеза [10; 12]. Так, исследователи из Финляндии на протяжении последних 30 лет используют растительный материал для введения в культуру *in vitro* с плантации Финского научно-исследовательского института в Пункахарью [5; 8; 10; 12]. При этом производится контролируемое опыление наиболее успешных по инициации в культуре *in vitro* генотипов *P. sylvestris*.

В нашем исследовании инициация соматического эмбриогенеза происходила на питательных средах MSG с разными источниками и содержанием фитогормонов. Выдерживание культуры клеток на среде предсозревания, а затем перенесение ее на субстрат созревания способствовало дальнейшему развитию соматических зародышей. Однако получить растения-регенеранты не удалось. Возможно, повышение содержания АБК и источников углеводов в

питательной среде, как описано в работе Narju с соавторами [8], будет оказывать благоприятное влияние на процесс созревания соматических зародышей.



Рисунок 2. Вызревание соматических зародышей *Pinus sylvestris* в культуре *in vitro*

Важно отметить, что в рамках проведенного исследования были установлены генотипы деревьев-доноров *P. sylvestris* на Петрозаводской лесосеменной плантации экспланты с которых способны к инициации соматического эмбриогенеза. А также сделан следующий шаг – начальные этапы вызревания соматических зародышей на субстрате с АБК – на пути к получению растений-регенерантов клонов плюсовых деревьев *P. sylvestris* с территории Карелии.

Благодарности. Работа выполнена за счет средств федерального бюджета по государственному заданию Карельского научного центра Российской академии наук (Институт леса КарНЦ РАН).

Библиографический список

1. Ершова М.А., Игнатенко Р.В., Новичонок Е.В., Чирва О.В., Галибина Н.А. Оптимизация условий стерилизации и культивирования эксплантов *Pinus sylvestris* (Pinaceae) // Растительные ресурсы. 2022. Т. 58, № 4. С. 431–446. <https://doi.org/10.31857/S0033994622040057>
2. Игнатенко Р.В., Галибина Н.А., Ершова М.А., Чирва О.В., Тихомирова С.И., Померанец А.К. Особенности соматического эмбриогенеза *Pinus sylvestris* и *Picea abies* // X Съезд общества физиологов растений России «Биология растений в эпоху глобальных изменений климата»: Всероссийская научная конференция с международным участием: тезисы докладов, Уфа, 18–23 сентября 2023 года. Уфа: Уфимский Федеральный исследовательский центр РАН. 2023. С. 161.
3. Раевский Б.В., Игнатенко Р.В., Новичонок Е.В., Прокопюк В.М., Куклина К.К. Современное состояние селекции и семеноводства хвойных пород // Известия вузов. Лесной журнал. 2022. № 6. С. 9–37. <https://doi.org/10.37482/0536-1036-2022-6-9-37>
4. Шуклина А.С., Третьякова И.Н. Соматический эмбриогенез видов рода *Pinus* в культуре *in vitro* // Успехи современной биологии. 2019. Т. 139, № 2. С. 184–195. <https://doi.org/10.1134/S004213241902008X>
5. Aronen T., Pehkonen T., Ryyänänen L. Enhancement of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Pinus sylvestris* // Scandinavian Journal of Forest Research. 2009. Vol. 24, № 5. P. 372–383. <https://doi.org/10.1080/02827580903228862>
6. Chirva O.V., Ignatenko R.V., Ershova M.A. *Pinus sylvestris* L. mature seeds megagametophytes cultured *in vitro*. Influence of the genotype and the growth regulators

- content in nutrient medium on the initiation of callus formation // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2023. Vol. 152, № 2. P. 299–308. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02404-3>
7. Galibina N.A., Ershova M.A., Ignatenko R.V., Nikerova K.M., Sofronova I.N., Borodina M.N. Cytogenetic and biochemical characteristics of callus *Pinus sylvestris* L. // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2023. Vol. 70, № 1. P. 10. <http://doi.org.10.1134/S1021443722602348>
 8. Harju A., Heiska S., Julkunen-Tiitto R., Venäläinen M., Aronen T. Somatic embryogenesis of *Pinus sylvestris* L. from parent genotypes with high- and low stilbene content in their heartwood // *Forests*. 2022. Vol. 13, № 4. P. 557. <https://doi.org/10.3390/f13040557>
 9. Ignatenko R.V., Chirva O.V., Ershova M.A., Galibina N.A., Teslyuk I.A. Assessing the ability of *Picea abies* (L.) H. Karst. plus tree clones from the middle taiga subzone of Karelia to somatic embryogenesis // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2024. Vol. 71, № 25. P. 25. <https://doi.org/10.1134/S1021443724604531>
 10. Keinonen-Mettälä K., Jalonen P., Euroala P., von Arnold S., von Weissenberg K. Somatic embryogenesis of *Pinus sylvestris* // *Scandinavian Journal of Forest Research*. 1996. Vol. 11, № 1-4. P. 242–250. <https://doi.org/10.1080/02827589609382933>
 11. Malabadi R.B., van Staden J. Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula* // *Tree Physiology*. 2005. Vol. 25, №. 1. P. 11–16. <https://doi.org/10.1093/treephys/25.1.11>
 12. Niskanen A.M., Lu J., Seitz S., Keinonen K., von Weissenberg K., Pappinen A. Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*) // *Tree Physiology*. 2004. Vol. 24, № 11. P. 1259–1265. <https://doi.org/10.1093/treephys/24.11.1259>
 13. Tret'yakova, I.N., Shuvaev D.N. Somatic embryogenesis in *Pinus pumila* and productivity of embryogenic lines during long-term cultivation *in vitro* // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2015. Vol. 46, № 5. P. 276–285. <https://doi.org/10.1134/S1062360415050070>
 14. Tret'yakova I.N., Park M.E. Collectible cell lines of *Larix sibirica* obtained by somatic embryogenesis and their ability to regenerate // *Forests*. 2023. Vol. 14, № 9. P. 1920. <https://doi.org/10.3390/f14091920>
 15. Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J., Filonova L. Developmental pathways of somatic embryogenesis // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2002. Vol. 69, № 3. P. 233–249. <https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>

УДК 676.157

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВТОРИЧНЫХ ВОЛОКОН ЛУБЯНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭКОЛОГИЧНОЙ БУМАЖНОЙ УПАКОВКИ

А.А. Карелина, Ю.Д. Алашкевич, В.А. Кожухов, К.А. Хохлов

*Сибирский государственный университет науки и технологий им. М.Ф. Решетнева,
Красноярск, Россия*

Растущая сфера применения лубяных культур неизбежно влечет за собой и увеличение числа отходов. В связи с этой тенденцией становится актуальным вопрос их переработки. Одной из сфер применения может стать целлюлозно-бумажная промышленность. Для реализации потенциала недревесного сырья целесообразно применять размол массы высокой концентрации. **Ключевые слова:** размол, ножевая гарнитура, волокнистая масса высокой концентрации, недревесное сырье, техническая конопля, лен, целлюлозно-бумажное производство, сельскохозяйственные отходы.

Начиная с 2010 года, в России наблюдается повышение интереса к возделыванию и переработке лубяных культур, расширяются сферы применения волокна, семян, костры. Согласно анализу данных об объемах заготовки льна и конопли наибольший прирост посевных площадей за период 2010-2022 наблюдался у технической конопли, почти в 16 раз. Это связано со снятием запрета на её выращивание. По состоянию на 2022 год лен возделывается в 57 субъектах РФ, а конопля в 31 субъекте. Это обуславливает большое количество отходов, которые необходимо эффективно перерабатывать [1, 4].

Лубяные волокна (техническая конопля и лен) обладают такими особенностями как высокое содержание целлюлозы и большая исходная прочность. Поэтому их целесообразно применять в качестве альтернативного источника сырья в ЦБП (таблица 1) [2, 8, 9].

Таблица 1

Характеристика лубяных волокон

Вид сырья	Содержание целлюлозы, %	Урожайность, т/га	Прочность на разрыв, МПа
Техническая конопля	60-77	12	814
Лен	75-82	2-2,5	745

Вместе с тем недревесные волокна обладают рядом других преимуществ, среди которых: короткий вегетационный период и как следствие ежегодная возобновляемость, высокие годовые урожаи, более низкое содержание лигнина по сравнению с древесиной, более легкая отбелка [6, 10].

Размол является одной из важнейших операций в производстве бумаги и картона. Он представляет собой процесс механической переработки растительных волокон в водной среде и осуществляется с помощью механического и гидродинамического воздействия. Назначением размола является придание волокнистому материалу определенных размеров волокнам с целью обеспечения требуемой структуры бумаги и придание определенной степени гидратации, от которой зависит сила сцепления волокон между собой [8]. Поэтому очень важно постоянно внедрять новые технологии и совершенствовать этот процесс. Одним из путей совершенствования является применение размола массы высокой концентрации. Плюсами такой обработки является: более низкое энергопотребление в сравнении с размолотом массы низкой концентрации, незначительное укорочение волокон, рост удельной поверхности волокон, увеличение внутреннего фибриллирования, повышение показателей прочности [7]. Принимая во внимание то, что волокнистый полуфабрикат из лубяных культур является длиноволокнистым, необходимо интенсифицировать процесс размола посредством внедрения новых конструкций размалывающего оборудования.

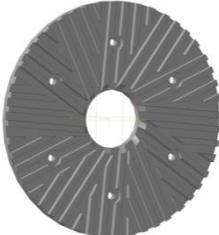
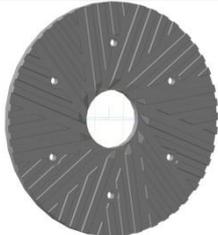
В связи с этим коллективом кафедры МАПТ СибГУ им. М.Ф. Решетнева была разработана ножевая дисковая гарнитура с окружной формой ножей, предназначенная специально для обработки длинноволокнистого полуфабриката высокой концентрации [5].

Использование гарнитуры с окружной формой ножей позволяет улучшить качество волокнистой массы из недревесного сырья путем преимущественного фибриллирования волокон, а не их укорочения. Это осуществимо благодаря развитию больших касательных усилий на кромках окружных ножей, чем на кромках прямых ножей традиционных гарнитур.

Кроме того, особенностью размола массы высокой концентрации считается и то, что в зоне размола образуется волокнистая прослойка значительной толщины, которая также способствует внешнему фибриллированию волокон за счет многократного их скручивания и истирания. В табл. 2 приведены сравнительные значения показателя разрывной длины бумажных отливок, изготовленных из технической конопли.

Таблица 2

Сравнение значений показателя разрывной длины в зависимости от использования различных конструкций гарнитур

Физико-механический показатель	Гарнитура с окружной формой ножей	Традиционная гарнитура 20°	Традиционная гарнитура 35°
			
Разрывная длина, м	3136	2417	2993

Такой физико-механический показатель как разрывная длина выбран основным для определения качества бумажных отливок согласно ГОСТ 8273-75. Этот стандарт устанавливает значение разрывной длины равное 2200 м марок Д (из небеленой целлюлозы, полуцеллюлозы и древесной массы) и Е (из макулатуры, небеленой целлюлозы и волокнистых отходов целлюлозно-бумажного производства) при производстве оберточной бумаги. Количественные значения, полученные при испытании бумажных отливок, изготовленных после размола с использованием различных конструкций гарнитур, наглядно доказывают преимущество обработки волокнистой массы окружной гарнитурой [3].

Применение гарнитуры авторского исполнения при обработке льняного полуфабриката также позволяет достичь удовлетворительного качества бумажных отливок (Табл. 3).

Таблица 3

Сравнение значений показателя разрывной длины в зависимости от использования различных видов лубяных волокон

Показатель	Разрывная длина, м	ГОСТ 8273-75
Вид сырья		
Техническая конопля	3136	2200 (для марок Д, Е)
Лен	2433	

В показателях прочности бумажных отливок из технической конопли и льна наблюдается некоторая разница, что связано с разницей в исходной прочности лубяных волокон. Принято считать, что волокна конопли прочнее льняных, хотя и имеют схожую химическую и морфологическую структуру [11].

Необходимо отметить тот факт, что волокнистая масса из лубяных волокон подвергалась размолу без предварительной химической обработки. Высокая исходная прочность волокна и значительное содержание целлюлозы позволяет достичь конкурентноспособных показателей

бумажной продукции в условиях отсутствия химической обработки, сохранив при этом экологическую составляющую процесса переработки сельскохозяйственных отходов.

Отходы лубяных культур, которые в настоящее время практически не перерабатываются, имеют большой потенциал. Их природные характеристики, такие как высокая прочность и большое содержание целлюлозы, дают возможность использовать их в качестве альтернативного источника сырья для ЦБП. Для того чтобы сохранить превосходное качество материала, необходимо вести разработку нового размалывающего оборудования и искать пути совершенствования процесса размола. Именно к решению этих вопросов относится исследование размола массы высокой концентрации из недревесного сырья в производстве бумажной продукции.

Библиографический список

1. Басова, Н. В. Анализ производства лубяных культур в России за период импортозамещения / Н. В. Басова, Э. В. Новиков // Технические культуры. Научный сельскохозяйственный журнал. – 2023. – Т. 3, № 2(8). – С. 54-63. – DOI 10.54016/SVITOK.2023.67.29.007. – EDN TZKPVN.
2. Богданова О.Ф., Березовский Ю.В. Современные технологии переработки составляющих льна для производства продукции различного назначения // Материалы и технологии. 2018. No2(2). С. 9–13. DOI: 10.24411/2617-149X-2018-12001.
3. ГОСТ 8273-75. Бумага оберточная. Технические условия: межгосударственный стандарт : дата введения 01.01.76. – Изд. официальное. – Москва : ИПК Издательство стандартов , 1975 – 8 с.
4. Новиков, Э. В. Лубяные культуры в России и за рубежом: состояние, проблемы и перспективы их переработки / Э. В. Новиков, Н. В. Басова, А. В. Безбабченко // Технические культуры. Научный сельскохозяйственный журнал. – 2021. – № 1(1). – С. 30-40. – DOI 10.54016/SVITOK.2021.1.1.005. – EDN XYEJW.
5. Патент № 2798559 С1 Российская Федерация, МПК D21D 1/30. Размалывающая гарнитура : № 2022135058 : заявл. 29.12.2022 : опубл. 23.06.2023 / Ю. Д. Алашкевич, В. И. Ковалев, В. А. Кожухов, А. А. Карелина; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика М.Ф. Решетнёва". – EDN YZPXZ.
6. Сусоева И.В., Вахнина Т.Н., Свиридов А.В. Химический состав и способ утилизации отходов производства хлопковых и льняных волокон // Химия растительного сырья. 2017. No3. С. 211–220. DOI:10.14258/jcprm.2017031492.
7. Ушаков А.В. Размол волокнистых полуфабрикатов высокой концентрации в целлюлозно-бумажном производстве: дис. ... канд. тех. наук: 05.21.03. – СибГУ им. М.Ф. Решетнева, Красноярск, 2022 – 173 с.
8. Фляте Д.М. Технология бумаги. Учебник для вузов. – М.: Лесн. пром-ть, 1988 – 440 с.
9. Petroudy S.R. Physical and mechanical properties of natural fibers // Advanced High Strength Natural Fibre Compo-sites in Construction. 2017. Pp. 59–83. DOI: 10.1016/B978-0-08-100411-1.00003-0.
10. Sadrmanesh V., Chen Y. Bast fibres: structure, processing, properties, and applications // International Materials Re-views. 2018. Vol. 64. Pp. 381–406. DOI: 10.1080/09506608.2018.1501171.
11. Wiener, J., Kovačič, V., & Dejlová, P. (2003). Differences between Flax and Hemp. *AUTEX Research Journal*, 3, 58 - 63.

УДК 581.5

ФИТОИНДИКАЦИОННАЯ ОЦЕНКА ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ГОРОДА БАРНАУЛА

И.А. Кондратьева, Ю.В. Микша, Г.Г. Соколова
Алтайский государственный университет

PHYTOINDICATION ASSESSMENT OF TECHNOGENIC POLLUTION OF THE CITY OF BARNAUL

I.A. Kondratyeva, Yu.V. Miksha, G.G. Sokolova
Altai State University

В статье приводятся результаты изучения содержания фотосинтетических пигментов (хлорофиллов и каротиноидов) в листьях клевера ползучего и клевера лугового в условиях техногенного загрязнения г. Барнаула. По мере возрастания техногенной нагрузки происходит закономерное снижение содержания хлорофилла у обоих видов клевера (в основном за счет хлорофилла *a*), а содержание каротиноидов достоверно увеличивается.

Ключевые слова: фотосинтетические пигменты, техногенное загрязнение, *Trifolium pratense* L., *Trifolium repens* L.

The article presents the results of a study of the content of photosynthetic pigments (chlorophylls and carotenoids) in the leaves of creeping clover and meadow clover under conditions of technogenic pollution in the city of Barnaul. As the technogenic load increases, there is a natural decrease in the chlorophyll content in both types of clover (mainly due to chlorophyll *a*), and the content of carotenoids significantly increases.

Keywords: photosynthetic pigments, man-made pollution, *Trifolium pratense* L., *Trifolium repens* L.

Введение. Растения, произрастающие в загрязненной городской среде, могут служить индикаторами степени загрязненности урбоэкосистем. Изучение состояния пигментной системы листьев актуально в целях установления нормирования и прогнозирования антропогенных нагрузок. Изменения количественного и качественного состава пигментов в условиях техногенного загрязнения являются индикаторами физиологического состояния растений, а также степени их адаптации в условиях стресса (Бухарина и др., 2013).

Под воздействием большинства газообразных токсикантов и тяжелых металлов содержание пигментов падает (Удовенко, 1995; Хвастунов, 1999). Большинство этих веществ после поглощения их клетками локализуются в хлоропластах, вызывая угнетение или даже полное прекращение фотосинтеза, свободное фотодинамическое окисление и разрушение клеточных структур (Бухарина и др., 2009). Изменение содержания пигментов является показателем потенциальной фотосинтетической способности растений и характеризует степень депрессии фотосинтеза. Суммарное содержание пигментов в листьях растений, произрастающих в местах наиболее интенсивного загрязнения, ниже по сравнению с растениями, произрастающими вдали от дорог и промышленных предприятий (Максимова и др., 2007).

В Барнауле источниками загрязнения воздушного бассейна являются в основном ТЭЦ и автомобильный транспорт. Травянистые дикорастущие растения могут служить биоиндикаторами качества окружающей среды в городских экосистемах.

Цель работы: изучить содержание фотосинтетических пигментов в листьях травянистых растений клевера лугового *Trifolium pratense* L. и клевера ползучего *Trifolium repens* L. в условиях г. Барнаула.

Материалы и методы исследования. Исследования содержания фотосинтетических пигментов в травянистых растениях проводились в летний период времени 2022–2023 гг. в г.

Барнаул. Для анализа содержания фотосинтетических пигментов нами были использованы 2 вида клевера – *Trifolium pratense* L и *Trifolium repens* L. Для анализа содержания фотосинтетических пигментов были собраны надземные части растений *Trifolium pratense* L. и *Trifolium repens* L. в различных местообитаниях г. Барнаула: берега р. Обь и р. Барнаулки; парки и скверы; автодороги; ТЭЦ-2. В качестве контроля использовался клевер, собранный на территории Южно-Сибирского ботанического сада АлтГУ. Для определения содержания фотосинтезирующих пигментов выбирали одновозрастные растения из разных местообитаний, находящиеся в стадии цветения.

Биохимический анализ содержания фотосинтетических пигментов в растениях проводили спектрофотометрическим методом на спектрофотометре марки SHIMADZU UV-1800 в лаборатории кафедры экологии, биохимии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Алтайского государственного университета». Концентрации пигментов в листьях рассчитывалась в два этапа по формулам с учётом положения максимумов поглощения пигментов и поправочных коэффициентов на наличие других пигментов и компонентов, рассеивающих свет (Рогожин, 2013). Все данные обработаны статистически с использованием программы MS Excel 2007.

Результаты исследования.

Клевер луговой. Анализ содержания хлорофиллов в листьях клевера лугового выявил следующие закономерности. На контроле содержание хлорофилла *a* составило 86 мг/100 г воздушно-сухого веса. По сравнению с контролем содержание хлорофилла *a* достоверно изменялось в сторону уменьшения в ряду местообитаний: берега р. Оби и р. Барнаулки → парки и скверы → ТЭЦ-2 → автодороги. Наименьшее содержание хлорофилла *a* выявлено в листьях клевера лугового, растущего вдоль автодорог и около ТЭЦ-2 (на 14% и 12% соответственно). Содержание хлорофилла *a* в листьях клевера лугового, растущего в парках и скверах, отличалось по сравнению с контролем на 6% (табл. 1).

Таблица 1

Содержание хлорофиллов в листьях *Trifolium pratense* L.

Места сбора	Хл. <i>a</i> , мг/100 г воздушно- сухого веса	Хл. <i>b</i> , мг/100 г воздушно- сухого веса	Сумма хлорофиллов, мг/100 г воздушно- сухого веса	Соотношение пигментов	Содержание каротиноидов, мг/100 г воздушно- сухого веса
Контроль	86,39±0,29	52,92±0,31	139,31±0,41	1,7 : 1,0	39,90±0,36
Берега р. Оби и р. Барнаулки	82,90±2,08	43,76±2,21	132,91±2,08	1,8 : 1,0	33,85±0,81
Парки/скверы	81,99±3,89	50,93±1,84	126,67±4,29	1,7 : 1,0	37,30±1,78
ТЭЦ-2	76,32±0,45	49,29±0,27	125,61±0,21	1,5 : 1,0	43,84±0,34
Автодороги	74,13±0,85	42,19±0,92	116,33±0,16	1,6 : 1,0	31,56±1,29

Примечание: жирным выделены значения, достоверные при $p \leq 0,05$

Содержание хлорофилла *b* в листьях клевера лугового на контроле составило 52 мг/100 г воздушно-сухого веса. Достоверное уменьшение по сравнению с контролем наблюдалось в ряду ТЭЦ-2 → Берега р. Оби и р. Барнаулки → автодороги (на 7%, 18% и 20% соответственно). Достоверных изменений содержания хлорофилла *b* в листьях клевера лугового, произрастающего в парках и скверах не выявлено (табл. 1).

Анализ общего содержания хлорофиллов в листьях клевера лугового свидетельствует о достоверном снижении по сравнению с контролем в ряду: парки и скверы → берега р. Оби и р. Барнаулки → ТЭЦ-2 → автодороги. По сравнению с контролем снижение суммарного содержания хлорофиллов вдоль автодорог достигало 20% (табл. 1).

Анализ соотношения пигментов в листьях клевера лугового, растущего в условиях техногенного загрязнения г. Барнаула, выявил максимальное снижение их соотношения вдоль автодорог. По сравнению с контролем также наблюдается уменьшение этого параметра у подорожника большого, растущего в других точках сбора.

На контроле содержание каротиноидов в листьях клевера лугового составило 39 мг/100 г воздушно–сухого веса. Достоверное увеличение каротиноидов по сравнению с контролем обнаружено в листьях клевера лугового, произрастающего около ТЭЦ–2 (на 9%). Достоверное снижение каротиноидов отмечается вдоль берега р.Оби и р. Барнаулки и автодорог (на 15% и 19% соответственно). В парках и скверах достоверного изменения содержания каротиноидов не выявлено (табл. 1).

Клевер ползучий. Анализ содержания хлорофиллов в листьях клевера ползучего выявил следующие закономерности. На контроле содержание хлорофилла *a* составило 79 мг/100 г воздушно–сухого веса, По сравнению с контролем содержание хлорофилла *a* в листьях клевера ползучего достоверно изменялось в сторону уменьшения в ряду местообитаний: берега р. Оби и р. Барнаулки → автодороги → ТЭЦ–2. Достоверного изменения содержания хлорофилла *a* в листьях клевера ползучего, растущего в парках и скверах не выявлено. Наименьшее содержание хлорофилла *a* выявлено в листьях клевера ползучего, растущего около ТЭЦ–2 и вдоль автодорог (на 10% и 17% соответственно). Содержание хлорофилла *a* в листьях клевера ползучего, растущего вдоль берега р.Оби и р. Барнаулки отличалось по сравнению с контролем на 9% (табл. 2).

Таблица 2

Содержание хлорофиллов в листьях *Trifolium repens* L.

Места сбора	Хл. <i>a</i> , мг/100 г воздушно– сухого веса	Хл. <i>b</i> , мг/100 г воздушно– сухого веса	Сумма хлорофиллов, мг/100 г воздушно– сухого веса	Соотношение пигментов	Содержание каротиноидов, мг/100 г воздушно– сухого веса
Контроль	79,72±0,37	49,68±0,24	129,40±0,61	1,7: 1,0	33,18±0,25
Парки/скверы	80,42±1,40	48,56±1,65	128,98±3,06	1,7: 1,0	34,64±0,32
Берега р. Оби и р. Барнаулки	74,92±2,18	38,72±0,98	113,64±1,19	1,9: 1,0	32,99±1,08
Автодороги	72,15±2,51	44,24±0,92	116,39±1,31	1,6 : 1,0	32,76±1,44
ТЭЦ–2	69,70±0,48	45,81±0,21	116,51±0,32	1,5 : 1,0	30,98±0,32

Примечание: **69,7±0,48** – значение достоверно при $p \leq 0,05$

Содержание хлорофилла *b* в листьях клевера ползучего на контроле составило 49 мг/100 г воздушно–сухого веса. Достоверное уменьшение содержания хлорофилла *b* для клевера ползучего отмечено в ряду местообитаний: ТЭЦ–2 → автодороги → берега р. Оби и р. Барнаулки (на 8%, 11% и 22% соответственно). Достоверных изменений содержания хлорофилла *b* в листьях клевера ползучего, растущего в парках и скверах, не выявлено. (табл. 2).

При анализе общего содержания хлорофиллов в листьях клевера ползучего отмечено достоверное его уменьшение в ряду местообитаний: автодороги → ТЭЦ–2 → берега р. Оби и р. Барнаулки (на 10%, 10% и 12% соответственно). Достоверных изменений содержания хлорофиллов в листьях клевера ползучего, растущего в парках и скверах, выявлено не было.

Анализ соотношения пигментов в листьях клевера ползучего показал уменьшение данного параметра при увеличении техногенного загрязнения (табл. 2).

В листьях клевера ползучего содержание каротиноидов на контроле составило 33 мг/100 г воздушно–сухого веса. Достоверное снижение каротиноидов в листьях клевера ползучего выявлено вдоль автодорог (на 7%); достоверное увеличение содержания каротиноидов в листьях клевера ползучего отмечалось возле ТЭЦ–2 (на 4%). У клевера, растущего вдоль берега р. Оби и р. Барнаулки, а также в парках и скверах, достоверных изменений содержания каротиноидов в листьях клевера ползучего выявлено не было (табл. 2).

Таким образом, содержание хлорофиллов в листьях клеверов обоих видов достоверно снижается по сравнению с контролем за счет уменьшения концентрации как хлорофилла *a*, так и хлорофилла *b*.

Содержание каротиноидов в листьях клеверов обоих видов по сравнению с контролем достоверно увеличивалось по мере возрастания техногенной нагрузки на 4–9%.

Основным из фотосинтетических пигментов растений является хлорофилл *a*. Он образует реакционные центры, участвующие в световой фазе фотосинтеза. Уменьшение содержания хлорофилла *a* приводит к увеличению доли хлорофилла *b*. Это защищает ткани от окисления кислородом на свету. Данный процесс можно рассматривать как адаптивную реакцию ассимиляционного аппарата растений (Николаевский, 1979).

Каротиноиды являются вспомогательными пигментами и, главным образом, защищают хлорофиллы от негативного воздействия, поэтому происходит их увеличение в техногенно-загрязненных средах. Увеличение концентрации каротиноидов под влиянием загрязнения может быть связано с их фоторецепторной и антиоксидантной функциями и может рассматриваться в качестве адаптационного механизма пигментного комплекса к техногенным воздействиям, что отмечается и другими исследователями (Майдебура, 2006; Бухарина и др., 2013).

В норме соотношение хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов, в соответствии с их функциями, находится в следующей закономерности: хлорофилла *a* более 50%, хлорофилла *b* – около 30% и каротиноидов – менее 20% (Максимова и др., 2007). Именно такое соотношение является оптимальным, поскольку основную работу в составе светособирающего (антенного) комплекса выполняет именно хлорофилл *a*. Хлорофилл *b* и каротиноиды выполняют функцию дополнительных и защитных пигментов. Таким образом, обеспечивается наиболее эффективная работа фотосинтетического аппарата. Результаты наших исследований выявили изменение соотношения пигментов, что свидетельствует об их адаптации к условиям техногенного загрязнения.

Выводы:

1. Содержание хлорофиллов в листьях клеверов обоих видов достоверно снижается по сравнению с контролем за счет уменьшения концентрации как хлорофилла *a*, так и хлорофилла *b*, на 9–20% в ряду местообитаний: парки и скверы → берега р. Оби и р. Барнаулки → ТЭЦ-2 → автодороги.
2. Содержание каротиноидов достоверно увеличивается по сравнению с контролем в листьях клеверов, растущих около ТЭЦ-2 и автодорог, на 4–9%.
3. Соотношение пигментов достоверно уменьшается у обоих видов клеверов при увеличении загрязнения воздушной среды.

Библиографический список

1. Бухарина И.Л., Кузьмин П.А., Гибадулина И.И. Анализ содержания фотосинтетических пигментов в листьях древесных растений в условиях городской среды (на примере г. Набережные Челны) // Вестник Удмуртского университета. Серия «Биология. Науки о Земле». – 2013. – № 1. – С. 20–25.
2. Майдебура И.С. Влияние загрязнения воздушного бассейна города Калининграда на анатомо–морфологические и биохимические показатели древесных растений: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Калининград, 2006. – 22 с.
3. Максимова Е.В., Косицина А.А., Макурина О.Н. Влияние антропогенных факторов химической природы на некоторые эколого–биохимические характеристики растений // Вестник СамГУ. – 2007. – № 8 (58). – С. 146–152.
4. Николаевский В.С. Биологические основы газоустойчивости растений. – Новосибирск: Наука, 1979. – 213 с.
5. Рогожин В.В. Практикум по биохимии. – СПб.: Лань, 2013. – 544 с.
6. Удовенко Г.В. Устойчивость растений к абиотическим стрессам // Физиологические основы селекции растений. – СПб.: ВИР, 1995. – С. 293–352.
7. Хвастунов А.И. Экологические проблемы малых и средних промышленных городов: оценка антропогенного воздействия. – Йошкар–Ола: МарГТУ, 1999. – 248 с.

УДК 579.695; 546.85; 502.55; 661.63

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ПОЛЛЮТАНТОВ

А.З. Миндубаев¹, Э.В. Бабынин²¹Казанский национальный исследовательский технологический университет (КНИТУ КХТИ), г. Казань. E-mail: mindubaev-az@yandex.ru²Татарский ФИЦ КазНЦ РАН. E-mail: edward.b67@mail.ru

Впервые в мире осуществлена биологическая детоксикация элементного – белого и красного – фосфора. Получены культуры плесневых грибов, превращающие вещество первого класса опасности белый фосфор в безвредный фосфат. В перспективе результаты исследований могут стать основой эффективных методов предотвращения и ликвидации загрязнений токсичными соединениями фосфора.

Ключевые слова: биодegradация, токсичные соединения фосфора, *Aspergillus niger*

Уже пятнадцать лет, с 2009 года нашим коллективом ведется работа по исследованию биодegradации - в первую очередь, фосфорсодержащих соединений. Впервые в мире осуществлена биологическая детоксикация элементного – белого и красного – фосфора. Получены культуры плесневых грибов, превращающие вещество первого класса опасности белый фосфор в безвредный фосфат. Это первый пример включения белого фосфора в биосферный круговорот элемента фосфора. В перспективе результаты исследований могут стать основой эффективных методов предотвращения и ликвидации загрязнений токсичными соединениями фосфора.

Десять лет назад, в октябре 2014 года нами выделена экстремотолерантная культура гриба черного аспергилла, превращающая токсичные соединения фосфора в фосфат, который может служить подкормкой для растений [1]. Мы впервые в мире наблюдали биодegradацию аллотропных модификаций элементного фосфора, белого, и красного (рис. 1).

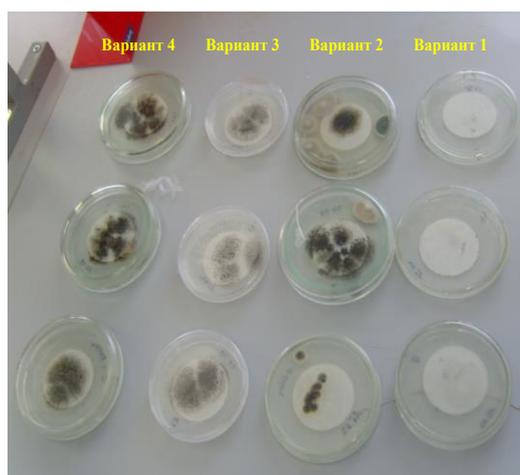


Рисунок 1. Посев *A. niger* AM1, устойчивых к белому фосфору. Варианты: 1 – среда без источников фосфора; 2 – с фосфатом; 3 – с белым фосфором (0.2%); 4 – с 0.2% P₄ и фосфатом.

На 12 сутки после посева *A. niger* AM1 в четыре варианта среды, наблюдалась следующая картина. В средах без источников фосфора рост практически не наблюдается (вариант 1). В средах с фосфатом аспергилл хорошо растет и спороносит (вариант 2). В средах с 0.2% белого фосфора колонии аспергилла имеют бледно-серый цвет (пониженная фертильность) (вариант 3). Снимок на цифровой фотоаппарат Samsung, 9 03 2016 г.

При воздействии белого фосфора наблюдается резкое изменение морфологии и протеома

исследуемых грибов, позволяющее им более эффективно защищаться от токсического воздействия, существовать в загрязненной среде и превращать токсичные загрязнители в компоненты фосфорных удобрений.

Происхождение штамма *Aspergillus niger*, выделенного из емкости с кусковым белым фосфором, воспроизведена с построением филогенетического дерева по базе *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Роль контролей выполняют внешние группы - штаммы других видов: аспергилл атласный *A. bombycis* и аспергилл дымящийся *A. fumigatus*. Штаммы из одного кластера, состоящие в близком родстве друг с другом, должны быть сходны по характеристикам. Филогенетический анализ позволяет приблизительно оценивать потенциальную токсичность, патогенность и аллергенность штаммов, а также ряд параметров, интересных для биотехнологов. В наибольшем родстве со штаммом AM1 состоят штаммы черного аспергилла FP1 и NJDL-12 из Китая, способные к переводу нерастворимых в воде фосфатных минералов в биологически доступную форму.

Таким образом, AM1 относится к кластеру штаммов, распространенному в Южной Азии и адаптированному к существованию в условиях нехватки биодоступного фосфора. Китай производит свыше 70% белого фосфора в мире, поэтому вещество (а с ним и споры микроорганизмов) могли быть импортированы в Россию из этой страны.

Для того, чтобы подтвердить родство с известными солюбилизаторами фосфатов, мы исследовали способность *Aspergillus niger* AM1 метаболизировать ортофосфат кальция $Ca_3(PO_4)_2$ – наиболее распространенную форму фосфора в природе, но при этом малодоступную для живых организмов из-за практической нерастворимости в воде. Оказалось, что штамм потребляет нерастворимый фосфат так же легко, как растворимые фосфаты, входящие в состав культуральных сред. То есть, действительно является солюбилизатором фосфата, как следует из теоретических результатов анализа базы NCBI, представленных в работе [1].

Интересно, что в декабре 2016 года мы получили дочерний штамм гриба *A. niger* AM2, еще более адаптированный к росту в среде с белым фосфором. Утолщенная клеточная стенка и увеличенные митохондрии у него наблюдаются и в контроле, в отсутствие этого токсичного вещества [2].

Мы впервые в мире обнаружили у белого фосфора генотоксическое, ДНК повреждающее свойство. Причем на нескольких объектах: прокариотическом организме - бактерии *Salmonella typhimurium* и эукариотическом – растении *Allium cepa*. Наши исследования показали, что белый фосфор является сильным мутагеном и даже в низкой концентрации 0.008% вызывает резкое увеличение частоты генных и геномных перестроек. То есть, является еще более опасным для окружающей среды и людей, чем считалось до сих пор [3].

Для фосфорных соединений велики перспективы биodeградации по причине того, что опасность фосфатов для окружающей среды существенно ниже, чем восстановленных соединений фосфора. Элемент фосфор в виде простых веществ и восстановленных соединений является опаснейшим загрязнителем окружающей среды, поскольку эти вещества сильно ядовиты, а некоторые, к тому же, огнеопасны. Однако живые клетки всегда накапливают окисленную форму фосфора – фосфат, в составе самых разнообразных органических и неорганических молекул. Если доля фосфора в земной коре составляет 0.12%, то в биомассе живых организмов концентрация этого элемента составляет уже 3%, т.е. в 25 раз выше! Для фосфорорганических соединений биodeградация уже применяется [4]. Но для элементного (белого и красного) фосфора она стала известна только из наших работ.

Начаты исследования активности лектинов *A. niger* AM1 и AM2. Показано, что у обоих штаммов, несмотря на их близкое родство, активность лектинов заметно различается [5]. Исследована гемагглютинирующая активность лектинов, их влияние на клетки одноклеточной водоросли хлореллы. Планируется исследование влияния лектинов на бактерии, грибы, а в более отдаленной перспективе - культуры раковых клеток.

В настоящее время продолжается исследование биodeградации при помощи исследуемых штаммов грибов пестицидов, содержащих фосфор, а также другие элементы, например, бор. Также, показана биodeградация лигнинсульфоната - отхода целлюлозно-бумажной промышленности [6].

В нашем ООО ИнТехТокс ведутся прикладные научные исследования по созданию биопрепаратов, способных очищать почвы и сточные воды от фосфорсодержащих загрязнителей. В настоящее время мы исследуем биodeградацию при помощи АМ1 и АМ2 веществ, не содержащих фосфор – нефтей и нефтепродуктов [7], древесины и продуктов ее переработки. Также, планируем изучать переработку полимерных материалов данными штаммами, извлечение редких элементов из минералов.

Впоследствии мы предполагаем внедрить технологию на шламонакопителях ПАО Новочебоксарский Химпром, ВОАО Волгоградский Химпром, Камтэкс Химпром г. Пермь (Россия), ООО Химпром Технология (г. Дзержинск), Леонидовском химическом арсенале (Пензенская область).

Нашей разработкой уже заинтересовались партнеры из Самарского Политеха (СамГТУ), планирующие ликвидацию очагов загрязнения желтым фосфором территории бывшего ОАО "Фосфор" в рамках Стратегии социально-экономического развития Самарской области до 2030 года.

Библиографический список

1. Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Bedeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Akosah Y.A. Biological Degradation of Yellow (White) Phosphorus, a Compound of First Class Hazard // Russian Journal of Inorganic Chemistry. 2021. Volume 66. № 8. P. 1239-1244. DOI: 10.1134/S0036023621080155
2. Mindubaev A.Z., Kuznetsova S.V., Evtyugin V.G., Daminova A.G., Grigoryeva T.V., Romanova Y.D., Romanova V.A., Babaev V.M., Buzyurova D.N., Babynin E.V., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G. Effect of White Phosphorus on the Survival, Cellular Morphology, and Proteome of *Aspergillus niger* // Applied Biochemistry and Microbiology. 2020. Vol.56. No.2. P.194-201. DOI: 10.1134/S0003683820020118
3. Mindubaev A., Babynin E., Minzanova S., Badeeva E., Akosah Y. White phosphorus genotoxicity. Bio web of conference. 2021. Vol.31. No.00018. P.1-3. DOI: 10.1051/bioconf/20213100018
4. Singh B.K., Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds /-// *FEMS Microbiology Reviews*. 2006. Vol. 30. № 3. P. 428-471. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x
5. Миндубаев А.З., Клементьев С.В., Кобелев А.В., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Бабынин Э.В., Антех Д.Д. Активность лектинов *Aspergillus niger* АМ1 и АМ2 // Бутлеровские сообщения. - 2022. – Т.72. - №12. – С. 117-129. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/22-72-12-117
6. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Тимофеева С.С., Камалов Р.Ф., Антех Д.Д. Биodeградация лигнинсульфоната при помощи *Aspergillus niger* АМ1 // Бутлеровские сообщения. - 2023. – Т.73. - №2. – С.83-91. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/23-73-2-83
8. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г. Способ детоксикации нефти с применением штамма *Aspergillus niger* АМ1ВКМ F-4815D // Патент РФ № 2791735 от 13.03.2023. Бюлл. изобр. № 8.

УДК 502.7+911.2

ЛАНДШАФТНЫЙ ПОДХОД К РАЗВИТИЮ СЕТИ ПРИРОДООХРАННЫХ ТЕРРИТОРИЙ В АЛТАЙСКОМ КРАЕ

И.Н. Ротанова, Е.В. Селезнева, Т.В. Муранова
Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

В статье предложено применение ландшафтного подхода к развитию схемы особо охраняемых природных территорий Алтайского края. Выполнен анализ типичных и уникальных ландшафтов региона и представленность их в функционирующей схеме природоохранных территорий края.

Ключевые слова: особо охраняемая природная территория, ландшафт, типичные ландшафты, уникальные ландшафты, ландшафтная карта.

LANDSCAPE APPROACH TO THE DEVELOPMENT OF A NETWORK OF PROTECTED AREAS IN THE ALTAI KRAI

I.N. Rotanova, E.V. Selezneva, T.V. Muranova
Altai State University, Barnaul, Russia

The article proposes the application of a landscape approach to the development of the scheme of specially protected natural territories of the Altai Territory. The analysis of typical and unique landscapes of the region and their representation in the functioning scheme of nature protection territories of the region is carried out.

Keywords: specially protected natural area, landscape, typical landscapes, unique landscapes, landscape map.

С целью развития существующей схемы особо охраняемых природных территорий (ООПТ) в Алтайском крае в систему ООПТ и реализации Закона Алтайского края № 40-ЗС от 09.06.2023 «О внесении изменений в закон Алтайского края «Об особо охраняемых природных территориях Алтайского края»» предлагается применение ландшафтного подхода к обоснованию новых ООПТ, в частности, учитывая введенную Законом № 40-ЗС от 09.06.2023 г. новую категорию «охраняемые природные комплексы», т.е. основываясь на ландшафтном устройстве территории.

Ландшафтное обоснование для развития схемы ООПТ Алтайского края включает качественный анализ природных комплексов по критериям типичности и уникальности в регионе и применение одного из природоохранных принципов – представленности в физико-географическом районе [1; 3; 4].

Основными единицами для природоохранной организации территории приняты ландшафты категории местности, выделяемые по определенной морфологической структуре, обладающие характерным местоположением, сочетаниями форм рельефа, растительных группировок и почвенных разностей.

В исследовании в качестве базовой структуры природной организации территории взяты физико-географическое районирование и Ландшафтная карта Алтайского края в масштабе 1: 500 000 [2].

Для отражения биоразнообразия региона и его сохранности в каждом физико-географическом районе (ФГР) целесообразно наличие ООПТ, включающей природные комплексы, наиболее характерные для ФГР – типичные ландшафты. Под типичными ландшафтами рассматриваются доминирующие по площади природные комплексы категории местности, выделяемые по генезису, геолого-геоморфологическому компоненту в сочетании с характерными типами растительности и почв. Фактически они являются «районообразующими», т.е. несут базовые признаки, по которым выделяется ФГР. В площади ФГР типичные местности

преобладают, тем самым формируя общий природный фон территории, направление происходящих процессов и ее эволюционное развитие.

Уникальными являются природные комплексы, которые характеризуются индивидуальностью, неповторимостью в пределах ФГР, единственные, мелкоплощадные, своеобразные по происхождению, местоположению, функционированию и т.д.

К типичным на территории Алтайского края отнесены 17 местностей. Они выделены в каждой физико-географической провинции. К группе типичных отнесены зональные степные и лесостепные природные комплексы. К степным относятся, например, комплексы озерно-аллювиальной равнины с сухими и засушливыми степями на темно-каштановых, каштановых почвах и черноземах южных. Примером типичных лесостепных местностей являются комплексы холмисто-увалистых расчлененных поверхностей со злаково-разнотравными луговыми степями и остепненными лугами на черноземах выщелоченных и оподзоленных в сочетании с березовыми и осиново-березовыми остепненными лесами и колками на серых и темно-серых лесных почвах. Они самые распространенные в крае, подвергаются значительному антропогенному воздействию, однако не включены ни в одну из существующих ООПТ.

К типичным отнесен также ряд азональных природных комплексов. Например, высокие древние террасы реки Оби с луговыми степями и лугами на выщелоченных черноземах в сочетании с березовыми колками на серых лесных почвах. К уникальным отнесены 6 местностей.

Из 216 типов местностей Ландшафтной карты [2] в границы функционирующих ООПТ в Алтайском крае попадают 7 типичных и 2 уникальных типа местности. Это говорит о том, что при организации ООПТ в регионе особенности ландшафтной дифференциации территории не учитывались.

Для оптимального представления геосистем, репрезентативно отражающих природные особенности края, следует включить в схему ООПТ региона типичные и уникальные местности, не имеющие природоохранного статуса. При условии включения в схему развития ООПТ Алтайского края перечисленных в таблице природных комплексов в дополнение к уже обеспеченным охраной в границах ООПТ типичным и уникальным местностям, можно говорить об относительном соответствии представленных в ООПТ геокомплексов природным особенностям региона (таблица). Охранный режим и ограничение хозяйственной деятельности позволит приостановить дальнейшую деградацию растительности и обеспечит последующее восстановление ландшафтов.

Таблица

Рекомендации по природоохранному обеспечению типичных и уникальных местностей в системе ООПТ (нумерация ландшафтов согласно [2])

Местности	Состояние, использование и ресурс охраны местностей	Существующие и рекомендуемые природоохранные территории
Типичные местности		
4. Озерно-аллювиальные равнины плоские и слабоволнистые с типчаково-ковыльными сухими степями на темно-каштановых и каштановых почвах.	Степень антропогенного воздействия и измененности местностей высокие. Более 75% – пашня, около 2% – сенокосы, 14% – пастбища. Имеется небольшой резерв для охраны.	Не охраняются в существующих ООПТ. Необходимо включение местностей в планируемый озерно-степной заповедник «Кулундинский».

5. Склоны озерных котловин пологие, местами слабо выраженные, с полынно-типчачковыми сухими степями на каштановых почвах.	Степень антропогенного воздействия и измененности местностей высокие. Более 80% – пашня, около 5% – сенокосы, около 1% – пастбища. Имеется незначительный резерв для охраны.	Не охраняются в существующих ООПТ. Необходимо включение наиболее сохранившихся фрагментов местностей в ООПТ, например, категории «охраняемые природные комплексы».
12. Плоская озерно-займищная дельтовая равнина с разнотравно-ковыльными степями в комплексе с полынно-типчачковыми сообществами на черноземах южных солонцеватых с тростниковыми займищами на солодах луговых, болотно-торфянисто-глеевых почвах и солончаках болотных.	Степень антропогенного воздействия и измененности местностей высокие. Под пашней 62%, под сенокосами 8%, под пастбищами более 20%. Имеется незначительный резерв для охраны.	Охраняются в заказнике «Пеликаный». Необходимо расширение границ заказника и включение наиболее сохранившихся фрагментов природных комплексов.
23. Пологие слабо расчлененные склоны плато с типчачково-ковыльными и полынно-типчачково-ковыльными степями на темно-каштановых и каштановых почвах.	Степень антропогенного воздействия и измененности местностей высокие. 84% – пашня, 1% – сенокосы, 10,5% – пастбища. Имеется незначительный резерв для охраны.	Не охраняются в существующих ООПТ. Необходимо включение наиболее сохранившихся фрагментов природных комплексов в функционирующие ООПТ.
32. Плоские пологоволнистые водораздельные поверхности плато с разнотравно-типчачково-ковыльными степями на черноземах южных.	Степень измененности местностей высокая, степень антропогенной нагрузки – средняя. Под пашней используется 86,2%, под пастбищами – 3,8%. Имеется резерв для охраны.	Охраняются в заказнике «Егорьевский». Имеющейся охраны недостаточно. Необходимо расширение границ заказника и включение наиболее сохранившихся фрагментов местностей.
71. Пологоувалистые предгорные равнины с богаторазнотравно-красноковыльными степями на черноземах обыкновенных, местами выщелоченных.	Степень измененности местностей высокая, степень антропогенного воздействия – средняя. 90% – пашня, 3% – сенокосы, 5% – пастбища. Имеется незначительный резерв для охраны.	Не охраняются в существующих ООПТ. Необходимо обеспечение режимом охраны категории заказника.
121. Высокие (древние) речные террасы плоские, пологонаклонные, местами расчлененные долинно-балочными системами со злаково-разнотравными и разнотравно-злаковыми луговыми степями и лугами на выщелоченных черноземах в сочетании с березовыми колками на серых лесных почвах.	Степень измененности местностей и антропогенного воздействия высокая. 55% – пашня, 3% – сенокосы, 6,5% – пастбища, 32% – лесопользование. Имеется небольшой резерв для охраны.	Не охраняются в существующих ООПТ. Необходимо включение наиболее сохранившихся фрагментов природных комплексов в заказники «Лебединый», «Соколовский», и «Бобровский».

131. Холмисто-увалистые расчлененные поверхности со злаково-разнотравными луговыми степями и остепненными лугами на черноземах выщелоченных и оподзоленных в сочетании с березовыми и осиново-березовыми остепненными лесами и колками на серых, темно-серых лесных почвах.	Степень измененности местностей и антропогенного воздействия высокая. 64% – пашня, 6% – сенокосы, 8% – пастбища, 21% – лесопользование. Резерв для охраны незначительный.	Не охраняются в существующих ООПТ. Необходимо обеспечение режимом охраны категории заказника или «охраняемые природные комплексы».
140. Глубоко-расчлененные крутосклонные поверхности с высокотравными субальпийскими и крупнотравными альпийскими лугами на черноземно-луговых, субальпийских и альпийских почвах.	Степень измененности местностей и антропогенного воздействия низкая. 22% – сенокосы, 19% – пастбища, 24% – лесопользование. Имеется значительный резерв для охраны.	Не охраняются в существующих ООПТ. Необходимо обеспечение режимом охраны категории заказника или «охраняемые природные комплексы».
159. Холмисто-увалистые слаборасчлененные низкогорья с редкими выходами коренных пород, с разнотравно-злаковыми и петрофитно-разнотравно-овсецово-ковыльными луговыми степями на черноземах выщелоченных и типичных с зарослями кустарников и осиново-березовыми закустаренными перелесками на горнолесных черноземовидных и скелетных почвах.	Степень измененности местностей высокая, антропогенного воздействия средняя. 44% – пашня, 16,5% – сенокосы, 20% – пастбища, 8% – лесопользование. Имеется небольшой резерв для охраны.	Не охраняются в существующих ООПТ. Необходимо обеспечение режимом охраны категории заказника или «охраняемые природные комплексы».
201. Плоскоувалистые слаборасчлененные поверхности с разнотравно-злаковыми остепненными лугами на черноземах выщелоченных в сочетании с редкими березовыми, иногда с примесью осины, колками на темно-серых лесных почвах (300-400 м).	Степень измененности местностей высокая, антропогенное воздействие среднее. Около 60% – пашня, 13% – сенокосы, 10% – пастбища, 23% – лесопользование. Резерва для охраны нет.	Не охраняются в существующих ООПТ. Необходимо включение наиболее сохранившихся фрагментов природных комплексов в «Ненинский» заказник.
205. Увалистые расчлененные и холмисто-увалистые поверхности с осиново-березовыми высокотравными лесами в сочетании со злаково-разнотравными лугами на темно-серых лесных почвах (240-300 м).	Степень измененности местностей высокая, антропогенного воздействия – средняя. Более 40% – пашня, 7% – сенокосы, 13% – пастбища, 35% – лесопользование. Имеется незначительный резерв для охраны.	Не охраняются в существующих ООПТ. Необходимо обеспечение режимом охраны категории заказника или «охраняемые природные комплексы».
Уникальные		

13. Склоны ложбин древнего стока пологие, слабо расчлененные с богаторазнотравно-ковыльными и разнотравно-типчаково-ковыльными степями на черноземах южных, нередко солонцеватых.	Степень измененности местностей и антропогенного воздействия высокая. 80% – пашня, 20% – пастбища. Резерва для охраны нет.	Не охраняются в существующих ООПТ. Необходимо обеспечение режимом охраны категории заказника или «охраняемые природные комплексы».
25. Днища ложбин древнего стока бугристо-грядовые с остепненными сосновыми борами на песчаных слабозрелых почвах в сочетании с разнотравно-злаковыми лугами на лугово-каштановых почвах.	Степень измененности местностей и антропогенного воздействия средняя умеренная. Около 10% – сенокосы, более 90% – пастбищами. Резерва для	Не охраняются в существующих ООПТ. Необходимо обеспечение режимом охраны категории заказника или «охраняемые природные комплексы».
66. Скалистые террасированные долины с разнотравно-злаковыми и осоково-злаковыми заболоченными лугами в сочетании с древесно-кустарниковыми зарослями на луговых и лугово-болотных аллювиальных почвах.	Степень измененности местностей средняя умеренная. 0,5% – сенокосы, 45% – пастбища. Имеется значительный резерв для охраны.	Не охраняются в существующих ООПТ. Необходимо обеспечение режимом охраны категории заказника или «охраняемые природные комплексы».
207. Террасированные долины с разнотравно-злаковыми и осоково-злаковыми лугами на луговых и болотно-луговых почвах.	Степень измененности местностей высокая, антропогенного воздействия – средняя умеренная. 22% – сенокосы, 22% – пастбища, 25% – лесопользование. Имеется значительный резерв для охраны.	Не охраняются в существующих ООПТ. Необходимо обеспечение режимом охраны категории заказника или «охраняемые природные комплексы».

Обоснование создания системы ООПТ на основе ландшафтного подхода с использованием принципов типичности и уникальности природных комплексов позволяет преобразовать Схему ООПТ Алтайского края в природоохранную сеть, а затем и в систему, позволяя дать полное представление о физико-географических особенностях, биологическом и ландшафтном разнообразии региона. Создание системы ООПТ с применением ландшафтного подхода создает предпосылки для успешного поддержания и сохранения ландшафтного разнообразия региона и географической оболочки в целом.

Библиографический список

1. Андреева И.В. Организация системы особо охраняемых природных территорий на основе ландшафтного подхода (на примере Алтайского края): диссертация на соискание ученой степени кандидата географических наук. – Барнаул, 2004. – 175 с.
2. Ландшафтная карта Алтайского края / Ю.М. Цимбалей, Ю.И. Винокуров и др. / Институт водных и экологических проблем СО РАН, 2016 г.
3. Ротанова И.Н., Андреева И.В. Эколого-ландшафтное обоснование системы особо охраняемых природных территорий Алтайского края / Отв. ред. Ю.М. Цимбалей; Рос.акад. наук, Сиб. отд-ние, Ин-т водных и экологических проблем. – Новосибирск: Издательство СО РАН, 2010. – 159 с.
4. Штильмарк Ф.Р., Александров А.С., Иващенко Б.П. Развитие сети заповедников и опыт их проектирования в РФ // Бюллетень МОИП. Отд. Биол. – 1990. – Т. 95, вып. 6. – С. 111-123.

УДК 579.6, 504.062

ПОТЕНЦИАЛ ЖИРОСОДЕРЖАЩИХ УГЛЕРОДНЫХ СУБСТРАТОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ БИОСИНТЕЗА "ЗЕЛЕННЫХ" ПЛАСТИКОВ

К.Ю. Сапожникова, Н.О. Жила, Т.Г. Волова

Институт Биофизики – обособленное подразделение ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, Россия

Жиры различного животного происхождения были изучены в качестве единственного углеродного субстрата для синтеза ПГА природным штаммом *Cupriavidus necator* B-10646. Исследованные жировые субстраты различались по качественному и количественному жирнокислотному составу и были представлены от 7 до 23 жирными кислотами при доминировании пальмитиновой, стеариновой и олеиновой кислот и коэффициентами насыщенности 0,2-1,7. Все исследованные С-субстраты поддерживали рост продуцента и синтез ПГА: концентрация бактериальной биомассы и внутриклеточное содержание полимера составляли 1,5-6,5 г/л и 51-70 % соответственно. Синтезированные ПГА представляли собой трехкомпонентные сополимеры с преобладанием мономеров 3-гидроксibuтирата (94,9-96,6 мол. %) и минорными включениями 3-гидроксивалерата (3,0-4,6 мол. %) и 3-гидроксигексаноата (0,4-0,6 мол. %).

Ключевые слова: полигидроксиалканоаты, ПГА, разрушаемые полимеры, животные жиры, жирные кислоты.

Введение. Синтетические пластиковые материалы, получаемые из продуктов нефтепереработки, ввиду простоты их массового производства и низкой себестоимости, получили широкое распространение и стали неотъемлемой частью жизни человека. Наряду с этим, пластики стали одной из основополагающих причин глобальной экологической проблемы, поскольку бесконтрольное потребление и неэффективные способы утилизации пластиковых изделий в связи с неспособностью к естественному разложению привели к их повсеместному накоплению и угрозе экологическому благополучию биосферы [1]. В связи с этим крайне востребован поиск альтернативных материалов, способных заменить традиционные синтетические полимеры без вреда природным экосистемам. Поиск и разработка экологически чистых продуктов, таких как биопластики – это эффективный способ преодоления экологического кризиса, вызванного неразлагающимися пластмассами.

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – это класс биополимеров, характеризующийся биосовместимостью и способностью к естественной биодеградации, обладающих высокой степенью полимеризации и схожими физико-химическими свойствами с синтетическими пластиками [3]. ПГА синтезируются различными микроорганизмами при несбалансированных условиях роста из широкого спектра субстратов, включая возобновляемые ресурсы и побочные продукты различных производств [10]. На сегодняшний день ПГА являются конкурентноспособной альтернативой традиционным пластикам, поскольку процесс их синтеза полностью биотехнологический, а спектр применения охватывает различные сферы жизнедеятельности человека – от расходных материалов до медицинской сферы. Тем не менее, высокая себестоимость производства этих материалов все еще является ограничивающим фактором на пути успешной коммерциализации: затраты на источник углерода (сахара) могут составлять до 40-45 % от стоимости ПГА [6]. Таким образом, существует потребность в научных исследованиях, направленных на снижение затрат на синтез и получение этих биополимеров.

Одним из способов преодоления проблемы является привлечение экономически доступного углеродного сырья. Весьма перспективным представляется использование жиросодержащих С-субстратов для синтеза ПГА, поскольку теоретические выходы полимера могут составлять до 0,7-0,8 г ПГА/г субстрата ввиду высокой доли углерода на моль вещества [2]. Такое сырье представляет собой сложные и многокомпонентные субстраты, где основной составляющей являются триацилглицериды, которые под действием микробных

липолитических ферментов расщепляются последовательно на диацилглицериды, моноацилглицериды, глицерин и свободные жирные кислоты, где последние выступают в качестве непосредственного источника углерода и метаболизируются [5].

Отмечается растущая тенденция к более эффективному использованию низкоценового сырья для синтеза ПГА – отходов различных производств, в частности жиросодержащих (отходы производства растительных масел, убоя скота, рыбоперерабатывающей и пищевой отрасли). Отсутствие рациональной технологии переработки жировых отходов является серьезной проблемой в пищевой промышленности, поскольку, по различным оценкам, количество генерируемого отработанного жира ежегодно может достигать 30 млн тонн [9]. Привлечение отходов в качестве сырья для синтеза целевых продуктов обеспечивает повышение эффективности промышленных производств, так как способствует комплексному и более полному использованию сырьевых ресурсов. Однако, на первоначальных этапах необходимо определить пригодность такого сырья для роста продуцентов и синтеза ПГА. Ввиду этого целью настоящей работы является определение потенциала жиросодержащих С-субстратов животного происхождения для продуктивного синтеза полигидроксиалканоатов высокоэффективным природным штаммом *Cupriavidus necator* В-10646.

Материалы и методы. Культивирование штамма *C. necator* В-10646, проводили с использованием минеральной солевой среды Шлегеля в колбах объемом 0,5 л в шейкерах-инкубаторах «Incubator Shaker Innova®» (США) [12]. В качестве С-субстратов выступали жиры животного происхождения (бараний, свиной, барсучий, гусиный (получены от местных хозяйств) и рыбий («Тульская фармфабрика», Россия), вносимые в питательную среду в концентрации 15 г/л. Концентрацию клеток (урожай биомассы бактерий) оценивали весовым методом. Внутриклеточное содержание ПГА и их мономерный состав определяли с применением газовой хроматографии; процедуру проводили на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 7890A/5975С (США) после предварительного получения метиловых эфиров жирных кислот [4]. Экстракцию ПГА из клеточной биомассы осуществляли в две стадии: обезжировали биомассу этиловым спиртом и экстрагировали полимер метиленом хлористым, раствор полимера фильтровали и осаждали гексаном.

Результаты и обсуждение. Пять типов жиров животного происхождения впервые исследованы в качестве единственного источника углерода для роста штамма бактерий *C. necator* В-10646 и синтеза ПГА. Большинство животных жиров, за исключением, например, рыбьего жира, представляют собой полутвердые или твердые вещества, что обусловлено высоким содержанием насыщенных жирных кислот в их составе и выступает осложняющим фактором при культивировании продуцентов в жидких питательных средах. Ввиду указанного обстоятельства были рассмотрены жиры различной консистенции: твердой – бараний и свиной жиры, полутвердой – гусиный и барсучий, жидкой – рыбий жиры. Поскольку основным субстратом для роста бактерий выступают жирные кислоты в составе триацилглицеридов, жирнокислотный профиль исследованных жиров был определен (Табл. 1). Исследованные жиры отличались по качественному и количественному составу. В твердых и полутвердых животных жирах доминирующими кислотами были пальмитиновая, стеариновая и мононенасыщенная олеиновая кислота, содержание которых варьировало в пределах 20,1-30,1, 10,6-39,0 % и 31,7-51,0 % соответственно. Бараний жир был представлен 15-ю, свиной жир – 7-ю, барсучий – 23-мя, а гусиный – 9-ю различными жирными кислотами. Рыбий жир, жидкий по своей консистенции, характеризовался 15-ю жирными кислотами, среди которых наибольшая доля приходилась на линолевую кислоту (33,5 %), в меньшем количестве были представлены пальмитиновая и стеариновая кислоты – 10,7 и 15,4 % соответственно; также в составе были идентифицированы жирные кислоты, содержащие до 6 двойных связей в углеродной цепи, содержание которых достигало 1,3-8,4 %. Среди исследованных типов животных жиров наибольшим коэффициентом насыщенности обладали твердые жиры (1,5-1,7), несколько ниже этот показатель был для полутвердых жиров (0,7-0,9), минимальное значение показано для жидкого рыбьего жира – 0,2.

Таблица 1.

Жирнокислотный состав животных жиров различного происхождения

Жирные кислоты	Животный жир				
	Бараний	Свиной	Барсучий	Гусиный	Рыбий
C12:0 (лауриновая)	-	-	1,916	-	-
C14:0 (миристиновая)	3,296	-	6,385	0,890	3,664
C16:1 (пальмитолеиновая)	1,832	-	8,452	4,679	5,292
C16:0 (пальмитиновая)	24,685	23,828	20,103	30,122	10,699
C16:4 (гексадекатетраеновая)	-	-	-	-	1,294
C17:0 (гептадекановая)	1,708	0,254	1,005	-	-
C18:1 ω 9 (олеиновая)	35,810	36,328	35,686	51,018	15,391
C18:1 ω 7 (вакценовая)	-	-	-	1,733	-
C18:0 (стеариновая)	26,272	38,973	13,728	10,613	-
C18:2 (линолевая)	-	0,182	-	0,759	33,513
C18:3 (линоленовая)	1,629	-	1,788	-	-
C18:4 (октадекатетраеновая)	-	-	-	-	2,450
C20:1 (гондоиновая)	-	-	0,415	-	7,161
C20:5 (тимнодоновая)	-	-	1,316	-	8,384
C20:4 (арахидоновая)	-	-	2,856	-	0,359
C22:1 (эруковая)	-	-	-	-	7,171
C20:6 (эйкозагексаеновая)	-	-	-	-	3,497
Другие*	4,678	0,435	6,350	0,186	1,125
Насыщенные / ненасыщенные ЖК	1,490	1,698	0,895	0,719	0,173
Полиненасыщенные ЖК	1,629	0,182	7,017	0,759	49,933
Длинноцепочечные ЖК	63,710	75,483	56,846	64,123	78,615

* Жирные кислоты, содержание которых менее 1 % (C8:0, C10:0, C13:0, C14:1, C15:0, C16:2, C17:1, C20:2, C20:3, C22:0, C24:1, изо- и антеизо-ЖК).

Результаты предварительной оценки способности бактерий *S. necator* В-10646 к росту на исследуемых типах животных жиров и синтезу ПГА показаны на рис. 1. Наиболее высокие выходы биомассы бактерий были получены при использовании в качестве С-субстрата рыбьего жира – до 6,5 г/л; несколько ниже – при использовании бараньего, барсучьего и гусиного жиров: концентрация клеток в культуре была близкой и составила 2,6-3,3 г/л. Самые низкие значения были отмечены при использовании свиного жира (до 1,5 г/л). Для всех исследованных жиров, за исключением свиного жира, поскольку в этом случае были получены низкие выходы бактериальной биомассы, было определено внутриклеточное содержание ПГА (рис.1). При использовании гусиного жира содержание ПГА к концу культивирования составило 51±2 %, в то время как для остальных жиров этот показатель был выше – в пределах 60-70 %. Полученный полимер был экстрагирован и его мономерный состав был определен: во всех случаях был синтезирован трехкомпонентный сополимер поли(3-гидроксibuтират-*co*-3-гидроксивалерат-*co*-3-гидроксигексаноат): доминирующим мономером был 3-гидроксibuтират (от 94,9 до 96,6 мол.%), содержание мономеров 3-гидроксивалерата составило 3,0-4,6 мол.% при близком содержании среднецепочечного мономера 3-гидроксигексаноата, 0,4-0,6 мол.%.

Наиболее высокие показатели продуктивности процесса роста бактерий и синтеза ПГА, были получены при использовании рыбьего жира: экономические коэффициенты по биомассе (Y_X) и ПГА ($Y_{ПГА}$) составили 0,71 и 0,46 г/г соответственно, продуктивность по биомассе (P_X) и ПГА ($P_{ПГА}$) составила 0,090 и 0,058 г/л*ч соответственно (Табл. 2). Полнота использования субстрата для твердых и полутвердых образцов жира была невысокой – в пределах 36-39 %, в то время как рыбий жир был утилизирован более эффективно, на 61,3 %.

Таблица 2.

Производственные показатели культуры бактерий *C. necator* В-10646 при росте на животных жирах различного происхождения

Жир	Y _X , г/г	Y _{ПГА} , г/г	П _X , г/л*ч	П _{ПГА} , г/л*ч	Полнота использования жира, %
Бараний	0,59	0,38	0,046	0,029	37,3
Барсучий	0,54	0,37	0,044	0,031	39,3
Гусиный	0,48	0,24	0,036	0,018	36,1
Рыбий	0,71	0,46	0,090	0,058	61,3

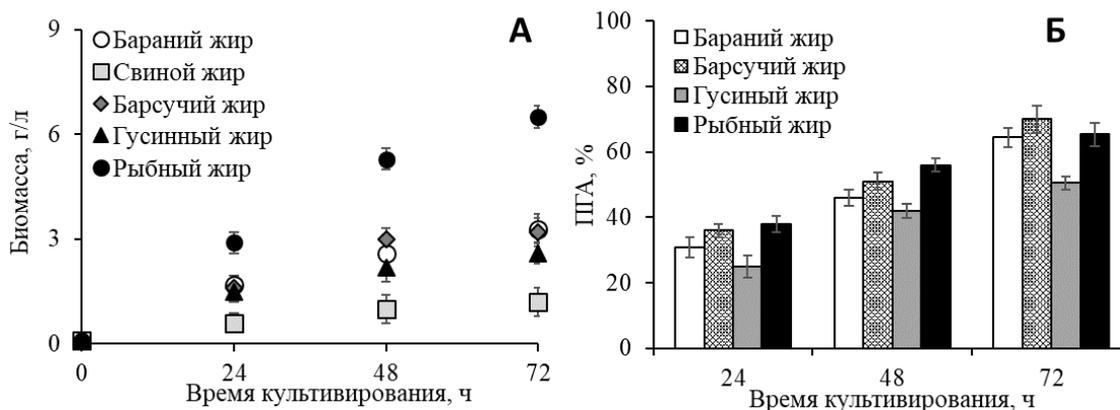


Рисунок 1. Выходы биомассы бактерий *C. necator* В-10646 (А) и внутриклеточное содержание ПГА (Б) при использовании жиров животного происхождения в качестве единственного источника углерода.

Полученные результаты сопоставимы с данными, опубликованными в литературе. Использование свиного жира в качестве источника углерода для роста близкородственного штамма *C. necator* DSM545 обеспечило синтез 11-23 % ПГА внутриклеточно [7]; более высоких выходов ПГА (до 60 %) удалось достичь при культивировании рекомбинантного штамма *R. eutropha* Re2058/pCB113 на жирно-белковой эмульсии свиного происхождения при выходах биомассы до 1,5 г/л, а при масштабировании процесса (6,7-л ферментер) выходы биомассы и содержание ПГА составили 52 г/л и 58 % соответственно [8]. Другой исследовательской группой оценена возможность привлечения в качестве С-субстрата для роста штамма *R. eutropha* H16 жиров, полученных из домашней птицы, а также смесей говяжьего, свиного и бараньего жиров: получено до 4,5 г/л биомассы и до 56-75 % ПГА [11].

Одними из ограничивающих факторов использования животных жиров являются высокая температура плавления (35-55 °С) и гидрофобность, что осложняет их доступность как субстрата для микроорганизмов, поскольку процесс культивирования, как правило, протекает в жидких средах при температуре не выше 30 °С. Кроме этого, эта группа сырьевых ресурсов может быть востребована в качестве компонента сельскохозяйственных кормов, что не позволяет рассматривать ее как непосредственный источник углерода для биотехнологического синтеза ПГА. Обнадешивающие результаты получены при использовании рыбьего жира, который, помимо высоких производственных показателей является жидким по своей консистенции, что повышает его биодоступность в микробных ферментациях по сравнению с твердыми жирами. Также этот тип жира показал широкое разнообразие жирных кислот, что, вероятно, также способствует более высоким производственным показателям. Тем не менее, применение чистого рыбьего жира как субстрата для микробных ферментаций нерационально, поскольку он является важным источником полиненасыщенных жирных кислот и используется как биологическая добавка к пище человека. В связи с этим, полученные результаты весьма перспективны, поскольку обосновывают возможность применения жиросодержащих отходов рыбоперерабатывающей промышленности – дешевого и невостребованного в других сферах жизнедеятельности человека сырья.

Заключение. В результате сравнительного анализа применения жиров животного происхождения в качестве углеродного субстрата для роста штамма *C. necator* В-10646 и синтеза ПГА установлено, что наиболее эффективными с точки зрения производственных показателей культуры бактерий и полноты утилизации ростового субстрата является жир рыбного происхождения, обеспечивающий высокие выходы биомассы продуцента и ПГА, что позволяет перейти к рассмотрению группы дешевых жиросодержащих отходов пищевых производств в качестве углеродных субстратов для синтеза биоразрушаемых ПГА.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (Проект № 23-64-10007).

Библиографический список

1. Abrha H., Cabrera J. et al. Bio-based plastics production, impact and end of life: A literature review and content analysis // Sustainability. – 2022. – Vol. 14. – №. 8. – P. 4855.
2. Akiyama M., Tsuge T. et al. Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation // Polym Degrad Stab. – 2003. – Vol. 80. – №. 1. – P. 183-194.
3. Anderson A.J., Dawes E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates // Microbiol Rev. – 1990. – Vol. 54. – №. 4. – P. 450-472.
4. Braunegg G., Sonnleitner B.Y. et al. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass // Eur J Appl Microbiol Biotechnol. – 1978. – Vol. 6. – P. 29-37.
5. Brigham C.J., Budde C.F. et al. Elucidation of β -oxidation pathways in *Ralstonia eutropha* H16 by examination of global gene expression // J Bacteriol. – 2010. – Vol. 192. – №. 20. – P. 5454-5464.
6. da Cruz Pradella J.G. Economics and industrial aspects of PHA production // The Handbook of Polyhydroxyalkanoates. – 2020. – P. 389-404.
7. Favaro L., Basaglia M. et al. Bacterial production of PHAs from lipid-rich by-products // Applied Food Biotechnology. – 2019. – Vol. 6. – №. 1. – P. 45-52.
8. Gutschmann B., Simões M.M. et al. Continuous feeding strategy for polyhydroxyalkanoate production from solid waste animal fat at laboratory-and pilot-scale // Microbial Biotechnol. – 2023. – Vol. 16. – №. 2. – P. 295-306.
9. Maddikeri G.L., Pandit A.B. et al. Intensification approaches for biodiesel synthesis from waste cooking oil: a review // Ind Eng Chem Res. – 2012. – Vol. 51. – №. 45. – P. 14610-14628.
10. Obruca S., Sedlacek P. et al. Novel unexpected functions of PHA granules // Appl Microbiol Biotechnol. – 2020. – Vol. 104. – №. 11. – P. 4795-4810.
11. Riedel S.L., Jahns S. et al. Polyhydroxyalkanoates production with *Ralstonia eutropha* from low quality waste animal fats // J Biotechnol. – 2015. – Vol. 214. – P. 119-127.
12. Zhila N.O., Sapozhnikova K.Y. et al. Synthesis and properties of polyhydroxyalkanoates on waste fish oil from the production of canned sprats // Processes. – 2023. – Vol. 11. – № 7. – P. 2113.

УДК 631.95

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОТХОДОВ В РАЗЛИЧНЫХ ОТРАСЛЯХ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Н.Г. Чистова¹, В.Н. Матыгулина², Е.В. Гончаров²

¹ Красноярский институт железнодорожного транспорта – филиал Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Иркутский государственный университет путей сообщения», Красноярск, Россия

² Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика М. Ф. Решетнева, Красноярск, Россия

В статье рассматривается проблема утилизации сельскохозяйственных отходов и предлагаются различные решения по их использованию. Анализируются существующие методы переработки отходов, обсуждаются вопросы экологической безопасности и экономической эффективности использования сельскохозяйственных отходов.

Ключевые слова: растительные отходы, утилизация, однолетние растения, переработка, композиционные материалы.

THE USE OF PLANT WASTE IN VARIOUS INDUSTRIES

N.G. Chistova¹, V.N. Matygulina², E.V. Goncharov²

¹ Krasnoyarsk Rail Transport Institute, a branch of Irkutsk State Transport University, Krasnoyarsk, Russian Federation

² Reshetnev Siberian State University of Science and Technology, Krasnoyarsk, Russian Federation

The article examines the problem of recycling agricultural waste and proposes various solutions for its use. Existing methods of waste processing are analyzed, issues of environmental safety and economic efficiency of using agricultural waste are discussed.

Keywords: plant waste, recycling, annual plants, recycling, composite materials.

По данным Министерства сельского хозяйства России в отечественном агропромышленном комплексе (АПК) ежегодно генерируется более 770 млн. т отходов. Предприятиями перерабатывающего подкомплекса АПК ежегодно в атмосферу выбрасывается в среднем около 300 тыс. т загрязняющих веществ, из них твердые отходы составляют 109 тыс. т (36,5 %), газообразные и жидкие — 190 тыс. т (63,5 %). Среди выбросов наибольший удельный вес занимают выбросы азотной кислоты (8,4 %), аммиака (8,5 %), фтористых соединений (5-6 %), сажи (3,2 %) [1].

Загрязнения, поступающие в почву, по источникам образования делятся на промышленные и сельскохозяйственные. Основные промышленные отходы — это транспортные, шламы, мочно-транспортные осадки, фильтрационный осадок, активный ил, отходы при фильтрации, упаковке и зачистке. К сельскохозяйственным отходам относятся органические отходы растениеводства, животноводства и перерабатывающей промышленности подкомплекса АПК.

Растительные отходы — это остатки растительного происхождения, образующиеся в процессе производства, обработки, использования или утилизации растений, растительных продуктов и материалов. Они включают в себя, например, стебли, листья, корни, кору, скорлупу, шелуху, опилки, стружку, солому, бумажные и картонные отходы, а также остатки от обрезки деревьев и кустарников. Растительные отходы могут использоваться в качестве сырья для различных целей, включая производство энергии, удобрений, компоста, изоляционных материалов и биоразлагаемых пластиков.

Такие отходы являются значительным источником органического материала, который может быть переработан и использован в дальнейшем в различных целях.

При выращивании и уборке урожая, переработке, хранении и подготовке к продаже продуктов сельского хозяйства также образуется огромное количество отходов. Большая часть отходов — это полевые отходы (около 50 %) и около 30 % — отходы обработки.

По разным источникам, общее количество сельскохозяйственных отходов достигает 630-650 млн. т. Это солома и ботва с полей, листья и ветки плодовых деревьев, шелуха от переработки готовой продукции и многое другое. Лишь малую долю этих отходов используют на корм скоту либо оставляют в полях для удобрения. Большинство видов растительного мусора сжигают или хранят на свалках до их естественного разложения.

Наибольшая часть от общего количества отходов АПК приходится на отрасль животноводства (56%), второе место занимают отходы растениеводства (35,6%), на долю перерабатывающих отраслей приходится 4,7% отходов.

Проблема рециклинга отходов является острой экологической проблемой современности, так как, образуясь в огромных количествах, отходы при их размещении в окружающей среде являются источником ее загрязнения, ухудшают санитарно-эпидемиологические и эстетические качества природы [2]. Постоянно растущие площади полигонов и несанкционированных свалок заставляют задуматься о возможности внедрения отходов в производственный процесс.

Стратегия обращения с сельскохозяйственными отходами должна базироваться на экологических и социальных принципах, быть экономически целесообразной, учитывать особенности каждого конкретного региона, основываться на комплексном взаимодействии всех заинтересованных сторон, поддерживаться нормативно-правовой базой [3]. Отходы, образуемые в отраслях сельскохозяйственного производства, являются ценным сырьем и могут быть использованы в качестве вторичного ресурса. Рециклинг отходов позволит вовлечь полезные компоненты в круговорот и тем самым сбалансировать производственный процесс. Отходы сельскохозяйственного производства в соответствии с Федеральным классификационным каталогом отходов (ФККО) делят на три группы: отходы растениеводства, отходы животноводства и отходы от прочих работ и услуг. Первые две группы отходов являются специфичными для растениеводства и животноводства и заслуживают внимания как вторичное сырье. Отходы растениеводства преимущественно представлены растительными остатками, в виде соломы, мякины, семян и иных компонентов сельскохозяйственных растений (таблица 1).

Таблица 1

Отходы растениеводства

Деятельность, связанная с образованием отхода	Наименование отхода	Класс опасности по ФККО
Предпосевная подготовка семян	Семена зерновых и иных культур не протравленные с истекшим сроком годности	5
	Семена зерновых и иных культур протравленные с истекшим сроком годности	2
	Семена ярового рапса	4
Уборка урожая	Мякина, солома, стебли растений, зерновые отходы от сортировки, растительные остатки при выращивании цветов, тепличные субстраты	5

Компонентный состав растительных остатков представляет собой органоминеральную смесь. По химическому составу — это отходы, содержащие белок, богатые клетчаткой, целлюлозами, декстринами, крахмалом, олигосахаридами. По агрегатному состоянию они отнесены к твердым отходам. По технологической стадии получения являются отходами

первичной переработки сырья (например, сортировки зерна). По материалоемкости они являются многотоннажным сырьем, полностью используемым в производстве.

Основными направлениями возможного использования отходов растениеводства являются:

- производство кормов;
- подстилка сельскохозяйственным животным;
- в качестве удобрений;
- получение искусственной почвы из лигноцеллюлозных отходов;
- биоэнергетика;
- производство биоразлагаемой упаковки.

Солома может быть переработана любым из предложенных методов. Такие компоненты, как корни растений, оболочка зерна, некондиционное зерно, листья и др. можно использовать в биоэнергетике.

Сельское хозяйство, производя ежегодно в большом количестве зерновые, технические и другие культуры, располагает огромными ресурсами побочных продуктов в виде отходов: солома злаковых культур (пшеничная, ржаная, рисовая), стебли кукурузы, технические культуры (хлопчатник, подсолнечник, клещевина, рапс, хмель, табак, картофель), виноградная лоза, льнопеньковые и хлопковые отходы (закостренное короткое волокно, льняная и конопляная костра). В них содержится богатый набор ценных компонентов: от 35 до 85% целлюлозы, от 1 до 22% лигнина, от 18 до 27% пентозанов.

Таким образом, растительные отходы представляют собой ценный ресурс, который можно использовать для производства различных продуктов. В данный момент разрабатываются различные направления использования растительных отходов.

Так, автор [4] предлагает получение ванилина из различных растительных отходов сельскохозяйственного производства. Сфера применения ванилина в различных отраслях промышленности очень широка, его аромат считается самым популярным и широко применяемым ароматом в производстве напитков и продуктов питания. Также ванилин используется в парфюмерии, медицине, в производстве фармпрепаратов и других химических соединений. Наличие чрезвычайно реакционноспособных функциональных групп в ванилине обеспечивает возможность получения обширного ряда производных, обладающих биологически-активными свойствами: антисептическими, бактерицидными, фунгицидными, антиоксидантными. Были исследованы методы выделения лигнина из растительного сырья и разработаны методики выделения ванилина из лигнина. Проблема селективного окисления лигнина до ароматических альдегидов еще далека от решения и имеет множественные варианты реализации, определяемые субъективными факторами осуществления окислительного процесса. Промышленную реализацию нашел способ окисления лигнина в щелочной среде. Аналогичные способы имеют место в процессах переработки древесины (кислородно-щелочной, кислородно-содовой варки целлюлозы, кислородно-щелочной отбелики целлюлозы и др.) в целлюлозно-бумажной промышленности. Однако эти процессы ставят основной целью максимальный выход целлюлозы, т.е. максимальную делигнификацию древесины.

Вопросы селективного окисления лигнина до ванилина в этих процессах вообще не рассматривались, поскольку лигнин максимально окислен. Проблема селективного окисления лигнина до альдегидов и максимального получения целлюлозы может быть успешно решена подбором соответствующих катализаторов окисления, более мягких окислителей и условий проведения процесса. На выход ванилина влияет также происхождение лигнина. Так, экономически целесообразно производство ванилина только из лигносульфонатов древесины хвойных пород, так как в случае древесины лиственных пород и травянистых растений образуется значительное количество других ароматических оксиальдегидов, которые довольно трудно разделить.

В табл. 2 представлен химический состав некоторых видов отходов переработки сельскохозяйственных культур.

Таблица 2

Химический состав растительных тканей (% от абсолютного сухого вещества)

Материал	Влага	Зола	Сырой протеин	Смола и воск	Пентозаны	Целлюлоза	Лигнин
Солома ячменная	12,0	5,56	3,20	1,40	21,45	32,92	23
Солома гречневая	12,0	5,40	5,57	7,57	9,28	24,16	21,7
Стебли топинамбура	12,0	3,63	0,58	2,02	18,68	26,01	18,5
Стебли крапивы	12,0	4,14	2,61	10,12	15,34	43,14	17,10
Костра конопли	4,59	1,60	1,70	9,96	27,87	37,00	18,80
Подсолнечная шелуха	3,14	10,33	6,66	-	23,79	31,70	20,07
Хлопковая шелуха	0,98	2,13	9,33	-	24,02	36,04	32,17
Льняная костра	12,0	1,11	0,00	0,84	15,80	34,18	15,8
Просяная шелуха	3,14	10,33	6,66	-	23,79	31,70	20,1
Солома пшеничная	3,89	5,51	6,17	1,49	18,98	34,82	22
Сосновые шишки	3,02	4,2	7	10	16	35	30
Очесы хлопкопрядильного производства	3,01	4	5	5	18	35	15
Кукурузная кочерыжка	12	1,8	2,11	1,37	31,5	37,6	17,0

Кроме того, в настоящее время разрабатываются различные направления использования растительных волокон и отходов их производства. Jinchun Zhu [5] предлагает использовать натуральные волокна (например, лен, конопля и т.д.) вместо синтетических волокон (углерод и стекло и т.д.) для оборудования транспортных средств. В своей работе он исследовал свойства композиционных материалов из волокон льна со связующим на основе эпоксидных смол с биодобавками, такими как танин, которые могут использоваться в транспортных средствах. Автор отмечает, что части транспортных средств (двери, панели, стойки шасси и т.д.), полученные из нефтепродуктов, проблематичны в утилизации. Поэтому и вырос интерес к новому возобновляемому сырью. Стоимость изготовления, механические свойства и экологическая безопасность являются преимуществами для использования биокomпозиций [6].

Ведутся также разработки в области промышленного производства композиционных материалов из биокomпозиций на основе льна и полипропилена, а также кенафа и полипропилена для выполнения частей транспортных средств [7]. Однако исследователи в основном занимались переработкой отходов стеблей однолетников [8]. Следует отметить, что безвозвратные пылевидные лигноцеллюлозные отходы производства волокон не использовались в качестве сырья для производства продукции.

В другом исследовании рассматриваются отходы растительного сырья, которые могут быть использованы для производства композиционных материалов [9]. Аналогом разрабатываемого материала являются древесноволокнистые плиты (ДВП) мокрого способа производства. Процесс производства плит из древесного волокна, получаемого методом размола древесной щепы в дефибраторах и рафинерах, является материально- и энергоемким. В лаборатории кафедры машин и аппаратов промышленных производств СибГУ имени М.Ф. Решетнева проводятся многочисленные исследования по размолу однолетних растений с целью получения различных композиционных материалов.

Учитывая вышесказанное, а также то, что основная масса отходов растительного производства практически не находит применения и выбрасывается, загрязняя окружающую среду, очень актуальным становится создание оптимальной технологии переработки отходов с использованием ценных компонентов в полезные для народного хозяйства продукты.

Библиографический список

1. Голубев И.Г., Шванская И.А., Коноваленко Л.Ю., Лопатников М.В. Рециклинг отходов в АПК: справочник. — М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2011 – 296 с.
2. Раскатов В.А., Фокин А.Д., Титова В.И. и др. Технологии обращения с отходами. М.: Изд-во РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева, 2010. 112 с.
3. Векленко В.И. Исследование потенциальных возможностей использования сельскохозяйственных отходов в народнохозяйственном комплексе Курской области. // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2015. №7. С.20-21.
4. Рацук М.Е. Получение ванилина из растительных отходов // Вестник Херсонского национального технического университета. 2015. №1 (52).
5. Jinchun Zhu. Recent development of flax fibres and their reinforced composites based on different polymeric matrices materials. - 2013. - №6. Pp. 5171-5198.
6. Peroni I. Natural fibres and composites: research development and production // International Journal of Materials and Product Technology. - 2009. -Vol. 36. - № 1-4. Pp. 396-416.
7. Khalil H. P. S. A. Natural fiber rein for cedpoly (vinylchloride) composites: A review / Khalil H. P. S. A., Tehrani M. A., Davoudpour Y., Bhat A. H., Jawaaid M. and Hassan A. // Journal of Reinforced Plastics and Composites. - 2013. -Vol. 32. - № 5. Pp. 330-356.
9. Dobircau. Wheat flour thermoplastic matrix reinforced by waste cotton fibre // Agro-green-Composites. - 2009. - Part A 40. -Pp. 329-334.
10. Сусоева И.В. Исследование интенсивности образования пылевидных отходов текстильных предприятий, используемых для производства строительных лигноцеллюлозных композиционных материалов / Сусоева И.В., Вахнина Т.Н., Ибрагимов А.М. // Технология текстильной промышленности. -2016. - № 2 (362). - С. 219 – 222.

СОДЕРЖАНИЕ

БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА	
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЖЕЛАТИНА И КСАНТАНОВОЙ КАМЕДИ КАК ГЕЛЕБРАЗОВАТЕЛЕЙ Адодина А.А., Величкович Н.С.	4
СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИОННОГО ФОНДА КЛОНОВ ВИДОВ РОДА CRATAEGUS L. Александрова Ю.В., Лебедева О.П., Бабич Н.А.	7
БИОВАЛОРИЗАЦИЯ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ В КСАНТАНОВУЮ КАМЕДЬ Баратова Д.А., Юргенсон А.К., Глухарева Т.В.	11
РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕЗИНФЕКЦИИ ЭКСПЛАНТОВ, КАК ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ЭТАПА МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ФИАЛКИ ОБЫКНОВЕННОЙ Бондарева Н.И., Маглакелидзе Д.Г.	15
ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ СТИМУЛЯТОРОВ НА УКОРЕНЕНИЕ ЧЕРЕНКОВ ТОПОЛЯ «ПИРАМИДАЛЬНО- ОСОКОРЕВЫЙ КАМЫШИНСКИЙ» Брындина Л.В., Репникова Л.А., Корчагина А.Ю., Живитченко Д.И.	18
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ МХА POLYTRICHUM COMMUNE: ЭКСТРАКЦИОННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА Будаев Н.А., Фалёва А.В., Ульяновский Н.В., Фалёв Д.И., Онучина А.А., Косяков Д.С.	22
СТРУКТУРНАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ, КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ ЭФИРНОГО МАСЛА ФОРМ NYSSOPUS OFFICINALIS IN VITRO И EX SITU Булавин И.В., Мирошниченко Н.Н., Саплев Н.М., Феськов С.А., Солдатов Д.К., Конобеев В.Д., Калмыкова Д.И., Иванова Н.Н.	26
СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МАТРИЦЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ Волков А.Г.	31
НОВЫЙ СПОСОБ АЭРАЦИИ В ГАЗОЖИДКОСТНОМ БИОРЕАКТОРЕ Войнов Н.А., Земцов Д.А., Кожухова Н.Ю.	34
ФЕРМЕНТИРОВАННАЯ ФИТОКОМПОЗИЦИЯ ИЗ БИОМАССЫ РАСТЕНИЙ ПЕРМСКОГО КРАЯ Волкова Л.В., Вигуляр В.П., Волков Р.Г.	39
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ОБРАБОТКИ НА ВЫХОД МАСЛА ЦИТРУСОВЫХ Гавриленко Г.А., Курочкина Е.В., Протопопов А.В.	43
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ СЕЛЕКТИВНОГО ДАВЛЕНИЯ ГЛЮФОСИНАТОМ АММОНИЯ Галимова А.А., Рахматуллина И.Ф., Ибрагимова З.А., Кулуев Б.Р.	47
РИЗОСФЕРНЫЕ ЭНЕТРОБАКТЕРИИ АРИДНЫХ ЭКОСИСТЕМ КАК ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ Гальперина А.Р., Сопрунова О.Б., Бареева А.Ш.	50
БАКТЕРИАЛЬНАЯ АССОЦИАЦИЯ АКТИНОМИЦЕТОВ – АКТИВНЫЙ БИОАККУМУЛЯТОР ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ Голышева А.А., Литвиненко Л.В., Ившина И.Б.	53
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КИСЛОТНЫХ КАТАЛИЗАТОРОВ НА ДИНАМИКУ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В ПРОЦЕССЕ ГИДРОЛИЗА ДРЕВЕСНОЙ МАССЫ ХВОЙНЫХ ПОРОД Гребенкина Т.М.	59
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПОЧВЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ Дегтярева И.А., Валидов Ш.З.	63
ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ECHINOPS SPHAEROCERPHALUS В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БУРОЙ ГНИЛИ RALSTONIA SOLANACEARUM В УСЛОВИЯХ IN VIVO Доморацкая Д.А., Киракосян Р.Н., Словарева О.Ю.	68

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ СВОЙСТВ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ ДИЭТАНОЛАМИНА С ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ РАСТИТЕЛЬНОГО МАСЛА Дорофеева А.А., Протопопов А.В.	71
ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ ШТАММОВ <i>BACILLUS</i> SPP. И <i>LACTOBACILLUS</i> SPP. Дудник Д.Е., Иркитова А.Н., Малкова А.В., Кожевникова Е.Н.	76
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ШТАММОВ <i>BACILLUS TOYONENSIS</i> B-13249 И <i>B. PUMILUS</i> B-13250, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ОСНОВЕ ПРОБИОТИКА ДЛЯ АКВАКУЛЬТУРЫ Евдокимов И.Ю., Иркитова А.Н.	80
БИОКОМПОЗИТНЫЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ БИОРАЗЛАГАЕМОЙ МАТРИЦЫ ИЗ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА И ВОЛОКНА ДРЕВЕСИНЫ Ипатова Н.Д., Демиденко А.Д.	85
ХРАНИМОСПОСОБНОСТЬ ЗЕРНОВОГО ХЛЕБА ИЗ ПОЛБЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ ЗАКВАСОК Камартдинова Д.Р., Китаевская С.В., Решетник О.А.	90
ПРОДУКЦИЯ ИНДОЛИЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ ЭНДОФИТНЫМ ШТАММОМ <i>BACILLUS WIEDMANNII</i> EJ1 Карамова Н.С., Туама А.А., Сабирова З.Р., Залилова Ю.М., Сташевски З.	94
ПРОГНОЗИРОВАНИЕ <i>IN SILICO</i> ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОМЫШЛЕННЫХ БАКТЕРИЙ <i>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</i>, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ БИОСИНТЕЗА КСАНТАНА Киреева А.М., Барашков А.Е., Николаев И.А., Жилинская Н.Т.	98
ИНТЕГРАЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС <i>BETA VULGARIS</i> L. Колесникова Е.О., Донских Е.И., Бердников Р.В.	103
ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ <i>ALKV</i> И <i>ММОАА</i> В КЛЕТКАХ <i>RHODOCOCCLUS</i> SPP. В ПРИСУТСТВИИ <i>n</i>-АЛКАНОВ <i>C3-C16</i> Комарова Л.П., Криворучко А.В., Ившина И.Б.	108
СОДЕРЖАНИЕ ЭКСТРАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЭКСТРАКТЕ РОЗ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РАЗЛИЧНЫХ ЭКСТРАГЕНТОВ Конюхова О.М., Губина М.С., Горева А.В.	113
БИОТЕСТИРОВАНИЕ В ОЦЕНКЕ ГУМИНОВЫХ ПРЕПАРАТОВ Кошкина Л.Ю., Кузнецова А.А., Снадина Н.А.	116
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ЦИТРАТОВ КРАХМАЛА НА ИХ РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА Курочкина Е.В., Гавриленко Г.А., Протопопов А.В.	120
РАЗРАБОТКА УНИВЕРСАЛЬНОГО БИОПРЕПАРАТА-ИНСЕКТИЦИДА ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ КОНСОРЦИУМА ШТАММОВ <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> Левитская К.Д., Франк Ю.А., Ивасенко Д.А.	123
НАКОПЛЕНИЕ БЕЛКА В БИОМАССЕ <i>NANNOCHLORIS</i> SP. <i>NAUMANN</i> IPPAS C-1509 В УСЛОВИЯХ НАПРАВЛЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ Левчук О.Р., Базарнова Ю.Г.	128
ИЗВЛЕЧЕНИЕ ИОНОВ НИКЕЛЯ ИЗ МЕТАЛЛОПОРФИРИНА АКТИНОМИЦЕТАМИ РОДА <i>RHODOCOCCLUS</i> Макарова М.В., Куюкина М.С., Ившина И.Б.	134
ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРА АНТИФУНГАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ БАЦИЛЛЯРНОГО КОНСОРЦИУМА ИЗ НОВОГО ОПЫТНОГО БИОПРЕПАРАТА Малкова А.В.	139
БИОТРАНСФОРМАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ МОНОТЕРПЕНОИДОВ АКТИНОМИЦЕТАМИ РОДА <i>RHODOCOCCLUS</i> Мальцева П.Ю., Плотницкая Н.А., Чудинова А.А., Ильина И.В., Салахутдинов Н.Ф., Ившина И.Б.	144

БОБЫ КОНСКИЕ (VICIA FABA L.) И ИХ АНТИПИТАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА Мамедова С.М., Попов В.С.	148
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ МИНЕРАЛЬНЫЕ И ОРГАНО-МИНЕРАЛЬНЫЕ УДОБРЕНИЯ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ Меркушева М.Г., Болонева Л.Н.	151
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН ПЛАЗМОЙ БАРЬЕРНОГО РАЗРЯДА В ВОЗДУШНОЙ СРЕДЕ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ИХ КАЧЕСТВА И ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ ОСИМУМ BASILICUM Минич А.С., Минич И.Б., Кудряшов С.В., Рябов А.Ю., Очередько А.Н.	155
ИССЛЕДОВАНИЕ КОНСОРЦИУМА ДИАТОМОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ АРКТИЧЕСКИХ РЕГИОНОВ ДЛЯ ОБОГАЩЕНИЯ КОРМОВЫХ ДОБАВОК АКВАКУЛЬТУР Невская Т.В., Поважный В.В., Смятская Ю.А., Андрианова У.Д.	160
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЯ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ Обрезкова Т.А., Шавыркина Н.А.	164
АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ DAEDALEOPSIS TRICOLOR KS11, СОДЕРЖАНИЕ В НЕЙ ФЛАВОНОИДОВ, ПРОСТЫХ ФЕНОЛОВ Прозорова И.Ш., Сысоева М.А., Сысоева Е.В., Красильников Р.О.	169
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО МЕТОДА РУЛАНДА ДЛЯ РАСЧЕТА СТЕПЕНИ КРИСТАЛЛИЧНОСТИ ОБРАЗЦОВ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ Прусский А.И., Котельникова Н.Е.	173
ИЗУЧЕНИЕ ЭЛЕКТРОГЕННОСТИ ИЗОЛЯТА RHODOCOCCUSELECTRODIPHILUS С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА Ревякина К.В., Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Быков А.Г., Хохлова Г.В., Вайнштейн М.Б., Решетиллов А.Н.	178
БИОТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МНОЖЕСТВЕННЫХ ЭФФЕКТОВ ДЕЙСТВИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА UGT1A1GLU ИЗ КУКУРУЗЫ ZEA MAYS L. ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР И АКТИВНОГО СИНТЕЗА АНТИГЕННЫХ БЕЛКОВ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ВАКЦИН ПРОТИВ ОПАСНЫХ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ Рекославская Н.И., Третьякова А.В., Чемезова А.А., Нурминская Ю.В., Чемезов А.В.	182
ПОЛУЧЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ В АППАРАТЕ РОТОРНОГО ТИПА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛАХ Рогова Е.А., Алашкевич Ю.Д., Кожухов В.А., Киселев Е.Г.	187
РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ХЛОРОФИЛЛОВ ИЗ КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ ЛИСТЬЕВ Русаева Н.С., Молохова Е.И.	192
БИОТЕХНОЛОГИЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОСТПИРОГЕННЫХ ПОЧВ Салеев Р.Р., Кошкина Л.Ю., Кузнецова А.А.	195
БИОТРАНСФОРМАЦИЯ КУРИНОГО ПОМЁТА СМЕШАНЫМИ КУЛЬТУРАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ Семёнова К.Г., Максимова Ю.Г.	201
БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФИТОБИОТИКОВ НА ПРИМЕРЕ ЗЕЛЕННЫХ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ Сидорова Н.А., Савушкин А.И.	207
ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА ЦИТРУСОВЫХ КУЛЬТУР, ВЫРАЩИВАЕМЫХ МЕТОДОМ IN VITRO НА РАЗНЫХ ВИДАХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, НА ПРИМЕРЕ СОРТОВ С. UNSHIU «MIAGAWA», С. LIMON «SANBOKAN», С. FORTUNELLA CRASSIFOLIA «MEIWA» Скворцов В.Е., Шубина Ю.Э.	212
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ПЛОДОВО-ЯГОДНОГО СЫРЬЯ Соколова Е.Н.	217

КАЛЛУСНЫЕ КУЛЬТУРЫ ЗЕРНОВЫХ НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ В СЕЛЕКЦИОННОЙ РАБОТЕ КРАСНИИСХ Ступко В.Ю., Луговцова С.Ю., Нешумаева Н.А., Герасимов С.А., Сидоров А.В.	221
ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ САХАРОЗЫ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ЕЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ СВОЙСТВ Супоня С.А., Батвинова А.А., Протопопов А.В.	226
РАЗВИТИЕ ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНЫХ ИННОВАЦИОННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ КАК ПРИОРИТЕТНОЕ НАПРАВЛЕНИЕ РАЗВИТИЯ ЭКОНОМИКИ И СОЦИАЛЬНОЙ СФЕРЫ РЕГИОНА Сысоев И.С.	231
ИЗУЧЕНИЕ ПРОДУКЦИИ БИОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ШТАММАМИ PSEUDOMONAS PROTEGENS A-СМС-05 И GORDONIA PARAFFINIVORANS A-СМС-11 ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ Сысоева А.Н., Герасимчук А.Л., Паталаха А.Е., Ивасенко Д.А.	236
СОДЕРЖАНИЕ ГОРМОНОВ В ЭМБРИОГЕННОЙ КУЛЬТУРЕ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ Третьякова И.Н., Пак М.Э., Помыткин Н.С.	241
БАКТЕРИАЛЬНАЯ КОНВЕРСИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНИТЕЛЯ МЕЛОКСИКАМА Тян С.М.	242
ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЯСЕНЯ ОБЫКНОВЕННОГО (FRAXINUS EXCELSIOR) IN VITRO Усачева Р.В.	248
ВЛИЯНИЕ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ VISCHERIA PUNCTATA И SCENEDESMUS SP. НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ГОРОХА ПОСЕВНОГО Фунтикова А.В., Кузнецова Т.А.	253
ПРОМЫШЛЕННОЕ ВЫРАЩИВАНИЕ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ОТСЕЛЕКТИРОВАННЫХ ТОПОЛЕЙ В УСЛОВИЯХ ЦЧР Царев В.А., Сергеев А.А., Царев А.П., Царева Р.П., Милигула Е.Н.	258
ВЫРАЩИВАНИЕ СЕЛЕКЦИОННОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ГИБРИДОВ БЕЛЫХ ТОПОЛЕЙ НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ IN VITRO Шабанова Е.А., Панова Е.Ю.	263
ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ ЗАМЕЩЕНИЯ КРАХМАЛА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ЯБЛОЧНОЙ КИСЛОТОЙ, НА РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РАСТВОРА Штепенко Д.Е., Протопопов А.В.	266
ВЛИЯНИЕ НАНОКОМПОЗИТОВ ХИТОЗАН-СЕРЕБРО НА ЗАЩИТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ SOLANUM TUBEROSUM Яруллина Л.Г., Заикина Е.А., Бурханова Г.Ф., Черепанова Е.А., Сорокань А.В., Цветков В.О., Марданшин И.С., Фаткуллин И.Я., Калацкая Ж.Н., Гилевская К.С.	271
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТЕНИЙ	
АССОЦИАЦИЯ МЕЖДУ ДЛИНАМИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ И ПРОЯВЛЕНИЕМ ЦЕННЫХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ У ДИКОЙ СОИ Бондаренко О.Н., Галиченко А.П., Блинова А.А.	276
ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОТИПОВ ГИБРИДНЫХ ФОРМ РОДОДЕНДРОНОВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ IN VIVO И IN VITRO. Васильева О.Г., Криницына А.А., Чурикова О.А.	281
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФОРМ МУРАВЬЕВ Власова А.А., Липатова О.Е., Моргунова М.М., Шелковникова В.Н., Дмитриева М.Е., Тельнова Т.Ю., Мартынова Е.И., Малыгина Е.В., Имидоева Н.А., Белыйшенко А.Ю., Шашкина С.С., Вавилина Т.Н., Баталова А.А., Листопад А.С., Аксёнов-Грибанов Д.В.	284

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПОЧВЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ Дегтярева И.А., Ш.З. Валидов Ш.З.	287
ПРОТЕОМНЫЙ И ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ПОДХОДЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОВ "УСТОЙЧИВОСТИ" У ГОРОХА Егорова А.М.	292
РАЗРАБОТКА ПРИНЦИПОВ ОТБОРА ЗАСУХОУСТОЙЧИВЫХ ГИБРИДОВ, ФОРМ И КЛОНОВ ТОПОЛЕЙ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO Жолобова О.О., Могилевская И.В., Терещенко Т.В., Пугачёва А.М., Солонкин А.В.	297
НА ПУТИ К ПОЛУЧЕНИЮ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ КЛОНОВ ПЛЮСОВЫХ ДЕРЕВЬЕВ PINUS SYLVESTRIS L. Игнатенко Р.В., Ершова М.А., Чирва О.В., Галибина Н.А.	301
ОЦЕНКА ПОВЕРХНОСТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ САПОНИНСОДЕРЖАЩИХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ Коновалова И.А., Запольских Е.С.	306
СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПЫЛЬЦЫ IN-VITRO У ВИДОВ И СОРТОВ КЛАРКИИ (CLARKIA PURSH) Королева Е.В., Фотев Ю.В.	310
МИКРОЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ РАСТЕНИЙ КАК ЭЛЕМЕНТ ВИДОСПЕЦИФИЧНОГО ГОМЕОСТАЗА Круглов Д.С.	315
ИНДУКЦИЯ КАЛЛУСОГЕНЕЗА У ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР CUCUMIS SATIVUS L. И BETA VULGARIS L. Лапкасов М.Е., Кузнецова Т.А., Ухатова Ю.В.	318
ИЗУЧЕНИЕ И СОХРАНЕНИЕ РЕДКИХ И ЦЕННЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ МЕТОДАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ Малаева Е.В.	323
ДЛИТЕЛЬНОЕ СОХРАНЕНИЕ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO OSMUNDA REGALIS L. И ОЦЕНКА ЕЁ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ SCOT-МАРКЕРОВ Маляровская В.И., Шхалахова Р.М.	328
ФАКТОРЫ ЭФФЕКТИВНОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА ГЕНОТИПОВ РОДА BRASSICA В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР IN VITRO Минейкина А.И.	333
ОПТИМИЗАЦИЯ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА, ИНТЕНСИВНОСТИ ОСВЕЩЕНИЯ И ДЛИТЕЛЬНОСТИ ФОТОПЕРИОДА ДЛЯ ТЕХНОЛОГИИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ГИБРИДОВ ТОПОЛЕЙ Могилевская И.В., Жолобова О.О., Терещенко Т.В., Пугачёва А.М., Солонкин А.В.	337
ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ SOLANUM CHILENSE В УСЛОВИЯХ IN VITRO ПРИ РАЗЛИЧНОМ СВЕТОДИОДНОМ ОСВЕЩЕНИИ Никонович Т. В., Усенко М. И., Баева И. Е.	341
ИЗУЧЕНИЕ ГИБРИДОВ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-МАРКЕРОВ УСТОЙЧИВОСТИ К СЕПТОРИОЗУ Новоселова Н.В., Харина А.В.	347
ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЕ РАСТЕНИЙ СЛЕДУЮЩЕГО ПОКОЛЕНИЯ Родионов А.В., Пунина Е.О., Шнеер В.С., Сухов А.С., Домашкина В.В.	351
МЕТОДЫ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ЛИПИДНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ. ТЕСТИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ Сизова Н.В.	355
ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНЫХ И СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР МАЧКА ЖЕЛТОГО КАК ИСТОЧНИКА ГЛАУЦИНА Тухбатуллина Р.Г., Мотыгуллина Л.И.	360
ВЫРАЩИВАНИЕ СЕЛЕКЦИОННОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ГИБРИДОВ БЕЛЫХ ТОПОЛЕЙ НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ IN VITRO Шабанова Е.А., Панова Е.Ю.	364

ВЛИЯНИЕ НАНОКОМПОЗИТОВ ХИТОЗАН-СЕРЕБРО НА ЗАЩИТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ SOLANUM TUBEROSUM Яруллина Л.Г., Заикина Е.А., Бурханова Г.Ф., Черепанова Е.А., Сорокань А.В., Цветков В.О., Марданшин И.С., Фаткуллин И.Я., Калацкая Ж.Н., Гилевская К.С.	367
БИОРЕФАЙНИНГ И БИОКОНВЕРСИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ	
ПРИМЕНЕНИЕ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА СОЕВОГО МОЛОКА В БИОТЕХНОЛОГИИ КСАНТАНОВОЙ КАМЕДИ Асасе Р.В., Середович Д.А., Пирогов М.В., Глухарева Т.В.	371
ВЛИЯНИЕ БИОУГЛЯ, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ СМЕСИ ДРЕВЕСНЫХ ОПИЛОК И ОСАДКА СТОЧНЫХ ВОД, НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ Бакланова О.В., Брындина Л.В.	376
БИОВАЛОРИЗАЦИЯ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ В КСАНТАНОВУЮ КАМЕДЬ Баратова Д.А., Юргенсон А.К., Глухарева Т.В.	379
ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОФИКСАЦИИ УГЛЕРОДА РАЗЛИЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ Белик Е.С., Соловьёва А.С., Мактиева С.М., Рудакова Л.В.	382
ОБРАБОТКА ОЗОНОМ КАК МЕТОД ПОВЫШЕНИЯ РЕАКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ СОЛОМЫ ПШЕНИЦЫ В ПРОЦЕССАХ БИОКОНВЕРСИИ В МОНОСАХАРИДЫ Бенько Е.М., Мамлеева Н.А., Харланов А.Н.	386
ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЯБЛОК МЕЛКОПЛОДНЫХ СОРТОВ АЛТАЙСКОГО КРАЯ Болдинов Д.И., Аверьянова Е.В., Стасюк М.А.	391
ПЕРЕРАБОТКА ЛЬНА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ Болтовский В.С., Флейшер В.Л., Андриюхова М.В.	396
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ СОКА ИЗ ЯГОД SORBUS AUCUPARIA Веремей Е.Е., Фролова Н.А.	399
КОМПЛЕКС ОЛИГОМЕРНЫХ ПРОАНТОЦИАНИДИНОВ ЛУБА КОРЫ БЕРЕЗЫ BETULA PENDULA ROTH: ВЫДЕЛЕНИЕ И СОСТАВ Гарынцева Н.В., Левданский А.В., Левданский В.А.	403
ИССЛЕДОВАНИЕ КОСМЕТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ МАСЛА ГОРЬКОЙ ПОЛЫНИ Гасанова А.Б., Алиева К.Т.	408
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ МИСКАНТУСА СОРТА КАМИС В ВЫСОКОЦЕННУЮ БАКТЕРИАЛЬНУЮ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗУ Гладышева Е.К., Кащеева Е.И.	413
ИДЕАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ ЕЕ ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ Горбатова П.А., Шавыркина Н.А.	418
ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ ИЗ ПРОДУКТА ЩЕЛОЧНОЙ ДЕЛИГНИФИКАЦИИ МИСКАНТУСА ГИГАНТСКОГО Зенкова А.А.	423
СОВМЕСТНЫЙ ПИРОЛИЗ РАСТИТЕЛЬНОЙ БИОМАССЫ И ПЛАСТИКОВЫХ ОТХОДОВ Исламова С.И., Слобожанинова М.В., Караева Ю.В.	428
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ КЛАСТЕР. ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ И РАЗВИТИЯ. Истомин И.И.	433
ОЦЕНКА ВЫХОДА БИОГАЗА ПРИ АНАЭРОБНОЙ КОНВЕРСИИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ Караева Ю.В., Олейникова Е.Е., Слобожанинова М.В.	436
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВТОРИЧНЫХ ВОЛОКОН ЛУБЯНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭКОЛОГИЧНОЙ БУМАЖНОЙ УПАКОВКИ Карелина А.А., Алашкевич Ю.Д., Кожухов В.А., Хохлов К.А.	440

БИОКОНВЕРСИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ СУБСТРАТОВ ГРИБОМ HERICIUM ERINACEUS Князева П.В., Смирнов М.А., Мамаева О.О., Исаева Е.В., Федоров В.С.	443
ОЦЕНКА ПОВЕРХНОСТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ САПОНИНСОДЕРЖАЩИХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ Коновалова И.А., Запольских Е.С.	447
КОНСТРУКЦИОННО-ОТДЕЛОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОТХОДОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ Коньшин В.В., Афаньков А.Н., Гущина Е.Н., Серских И.А., Ефанов М.В.	451
ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ИЗ ВОЗОБНОВЛЯЕМОГО И ПРОМЫШЛЕННОГО СЫРЬЯ Котельникова Н.Е.	454
ARE THE PAPER WASTE DEBRIS VERY HARMFUL TO HUMANITY? A SHORT REVIEW Kotelnikova N.E.	459
РОСТРЕГУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА КАРБОКСИМЕТИЛИРОВАННОЙ НЕПИЩЕВОЙ БИОМАССЫ ШИШЕК СОСНЫ СИБИРСКОЙ Кушнир Е.Ю., Семина Е.А., Базарнова Н.Г., Лисих Д.В.	463
ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ БИОДЕГРАДАЦИИ СМЕШАННОГО ОПАДА В ЗОНЕ ЕСТЕСТВЕННОГО УВЛАЖНЕНИЯ НА РЕЗУЛЬТАТЫ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ Ленивцев П.И., Смирнова А.И., Дягилева А.Б.	467
БЕЗНОЖЕВОЙ РАЗМОЛ ВОЛОКНИСТОГО ПОЛУФАБРИКАТА ИЗ ОДНОЛЕТНИХ РАСТЕНИЙ В ЦЕЛЛЮЛОЗНО-БУМАЖНОМ ПРОИЗВОДСТВЕ Литвинова М.М., Марченко Р.А., Алашкевич Ю.Д.	472
БИОКОНВЕРСИЯ КОРЫ ХВОЙНЫХ ГРИБАМИ РОДА TRICHODERMA Мамаева О.О., Исаева Е.В., Федоров В.С.	477
ИЗУЧЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛА ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ В ПРОДУКТАХ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА: МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ И СВОЙСТВА ПЕКТИНА Одилова Р.М., Нуруллина Е.Н., Броднева А.В.	481
ЭКСТРАКЦИЯ С,О-ГЛИКОЗИЛФЛАВОНОВ ИЗ ЗЕЛЕННЫХ ОТХОДОВ CUCUMIS SATIVUS ГЛУБОКИМИ ЭВТЕКТИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ Оленников Д.Н., Кашенко Н.И., Маркова К.В.	485
КОМПЛЕКСНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ ШРОТА ПОДСОЛНЕЧНИКА С ПОЛУЧЕНИЕМ БЕЛКОВОГО КОНЦЕНТРАТА И СОРБЦИОННОГО МАТЕРИАЛА Павлова А.А., Смятская Ю.А.	490
К ВОПРОСУ О КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКЕ ДРЕВЕСНЫХ ОТХОДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ РЕЦИКЛИНГА Петрова А.А., Алашкевич Ю.Д., Воронин И.А.	495
МЕТОДЫ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ЛИПИДНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ. ТЕСТИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ. Сизова Н.В.	499
ТРАНСФОРМАЦИЯ МИСКАНТУСА ГИГАНТСКОГО В ПРОДУКТЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА: РАСЧЕТ МАТЕРИАЛЬНЫХ ПОТОКОВ Скиба Е.А.	504
ПОЛУЧЕНИЕ ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ КРАХМАЛА И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ Таганбекова З.К., Мещанинова А.А., Маркин В.И.	509
МАССОПЕРЕНОС В ПРОЦЕССАХ ОКИСЛЕНИЯ НАТИВНЫХ ЛИГНИНОВ В ВАНИЛИН КИСЛОРОДОМ Тарабанько В.Е., Кайгородов К.Л., Смирнова М.А.	513
ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВ ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПЕРЕРАБОТКИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ Тараскин К.А., Барнашова Е.К., Вертикова Е.А., Симагин А.Д.	518
ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ОБРАБОТКА ЛЬНЯНОЙ КОСТРЫ В ПРОЦЕССЕ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЭТАНОЛА: ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ Уткина А.В., Ожимкова Е.В.	523

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ TEUCRIUM CHAMAEDRYS L. И TEUCRIUM SCORDIUM L. Феськова Е.В., Леонтьев В.Н.	528
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ BIOTEХНОЛОГИЙ ДЛЯ ОЧИСТКИ И ВОССТАНОВЛЕНИЯ НАРУШЕННЫХ ТЕРРИТОРИЙ КОЛЬСКОГО ПОЛУОСТРОВА Фокина Н.В., Сошина А.С., Мязин В.А., Чапоргина А.А., Латюк Е.С.	532
РАСЧЕТ ФАКТОРОВ ЭКОЛОГИЧНОСТИ BIOTEХНОЛОГИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ МИСКАНТУСА ГИГАНТСКОГО Шавыркина Н.А.	537
ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ЭКСТРАКТОВ ПИХТЫ СИБИРСКОЙ (ABIES SIBIRICA), ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ ФЛЮИДНОЙ СО₂-ЭКСТРАКЦИИ Шаповалова Е.Г., Бояринцева А.Д., Шейченко А.А., Шкробова М.О., Захаркива А.М.	542
ПРЕДПОДГОТОВКА СОЛОМЫ ПШЕНИЦЫ В СРЕДЕ ГЛУБОКОГО ЭВТЕКТИЧЕСКОГО РАСТВОРИТЕЛЯ ДЛЯ ФЕРМЕНТОЛИЗА Шашкина С.С., Евстафьев С.Н.	548
ПРИРОДООХРАННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ БОЛЬШОГО АЛТАЯ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ ТЕРРИТОРИЙ	
ПУТИ К ПОЛУЧЕНИЮ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ КЛОНОВ ПЛЮСОВЫХ ДЕРЕВЬЕВ PINUS SYLVESTRIS L. Игнатенко Р.В., Ершова М.А., Чирва О.В., Галибина Н.А.	551
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВТОРИЧНЫХ ВОЛОКОН ЛУБЯНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭКОЛОГИЧНОЙ БУМАЖНОЙ УПАКОВКИ Карелина А.А., Алашкевич Ю.Д., Кожухов В.А., Хохлов К.А.	556
ФИТОИНДИКАЦИОННАЯ ОЦЕНКА ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ГОРОДА БАРНАУЛА Кондратьева И.А., Микша Ю.В., Соколова Г.Г.	559
ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ПОЛЛЮТАНТОВ Миндубаев А.З., Бабынин Э.В.	563
ЛАНДШАФТНЫЙ ПОДХОД К РАЗВИТИЮ СЕТИ ПРИРОДООХРАННЫХ ТЕРРИТОРИЙ В АЛТАЙСКОМ КРАЕ Ротанова И.Н., Селезнева Е.В., Муранова Т.В.	566
ПОТЕНЦИАЛ ЖИРОСОДЕРЖАЩИХ УГЛЕРОДНЫХ СУБСТРАТОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ БИОСИНТЕЗА "ЗЕЛЕННЫХ" ПЛАСТИКОВ Сапожникова К.Ю., Жила Н.О., Волова Т.Г.	571
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОТХОДОВ В РАЗЛИЧНЫХ ОТРАСЛЯХ ПРОМЫШЛЕННОСТИ Чистова Н.Г., Матыгулина В.Н., Гончаров Е.В.	576

