

УДК 577.127

**А. В. Чичварин<sup>1</sup>, Т. И. Игуменова<sup>2</sup>, Н. Р. Прокопчук<sup>3</sup>, К. В. Вишнеvский<sup>3</sup>**<sup>1</sup>Старооскольский технологический институт (филиал «МИСиС»)<sup>2</sup>Воронежский государственный университет инженерных технологий<sup>3</sup>Белорусский государственный технологический университет**СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АДДУКТА СМЕСИ ФУЛЛЕРЕНОВ И ИНДОЛИЛМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ**

В работе рассматривается возможность синтеза новых регуляторов роста на основе углеродных фуллеренов и 2-индол-3-масляной кислоты и исследование влияния полученных аддуктов на растительные клетки (на примере семян пшеницы сорта «Харьковская 39») и клетки грибов (*Kuehneromyces mutabilis* (опенок летний), *Lentinula edodes* (шиитакe), *Ganoderma lucidum* (лакированный трутовик), *Flammulina velutipes* (опенок зимний)). Получаемые продукты, являясь в целом электронейтральными, представляют собой цвиттер-ионы, обладающие неограниченной растворимостью в воде и этиловом спирте, что облегчает их использование в микродозировках для регуляции роста растений. Проведенные эксперименты указывают на высокую биологическую активность полученного вещества, что позволяет рассматривать его в качестве нового эффективного регулятора роста комплексного действия.

**Ключевые слова:** фуллерен, регулятор роста, индолилмасляная кислота, вегетационный период, инокуляция, мицелий, спектр.

**A. V. Chichvarin<sup>1</sup>, T. I. Igumenova<sup>2</sup>, N. R. Prokopchuk<sup>3</sup>, K. V. Vishnevskiy<sup>3</sup>**<sup>1</sup>Starooskol Technological Institute (branch of the "MISIS")<sup>2</sup>Voronezh State University of Engineering Technologies<sup>3</sup>Belarusian State Technological University**SYNTHESIS AND RESEARCH OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF ADDUCT OF THE FULLERENES AND INDOLEBUTYRIC ACID MIXTURE**

The possibility of synthesis of new growth regulators based on carbon fullerene and a 2-indole-3-oleic acid and research of influence of the received adducts on plant cells (wheat "Har'kovskaja 39") and mushrooms cells (*Kuehneromyces mutabilis* (sheathed woodtuft), *Lentinula edodes* (shiitake), *Ganoderma lucidum* (lingzhi mushroom), *Flammulina velutipes* (enokitake) is considered in the work. The received products, being in general electroneutral, represent the tsvitter-ions possessing unlimited solubility in water and ethyl alcohol that facilitates their use in microdosages for regulation of plants growth. The conducted experiments indicate high biological activity of the received substance that allows us to consider it as the new effective regulator of growth of complex action.

**Key words:** fullerene growth regulator, indolebutyric acid, vegetation period, inoculation, mycelium, spectrum.

**Введение.** Фитогормоны, низкомолекулярные органические вещества, вырабатываемые растениями и имеющие регуляторные функции, представляют большой практический интерес в современных биологических исследованиях.

Поиск и целенаправленный синтез новых препаратов данных классов актуален в связи с растущим спросом на высококачественную сельскохозяйственную продукцию. Создание супрамолекулярных наноструктур с высокой биологической активностью позволяет получить вещества и сформировать класс новых препаратов. Их биологическая активность проявляется при очень низких дозировках, что сказывается на качестве производимой продукции и ее конечной стоимости.

Целью работы было осуществить синтез нового аддукта углеродных фуллеренов с аминокисло-

той и исследовать возможность его применения в качестве биологически активного вещества.

**Основная часть.** При проведении предварительного эксперимента было отмечено, что многие растения, выращиваемые на водной культуре с применением смесей углеродных фуллеренов и синтетических стимуляторов роста, таких как гетероауксин и индолилмасляная кислота (ИМК), обладали повышенным тургором и очевидным, более высоким содержанием хлорофилла в надземной части, также нельзя было не заметить более интенсивного развития колоний плесневых грибов. На основании ряда наблюдений было сделано предположение о том, что производные фуллеренов и ауксинов должны обладать регулятивными свойствами.

Синтез нового аддукта смеси углеродных фуллеренов проводили на основе метода Прато [2, 3].

В качестве исходных реагентов использовали 2-индол-3-масляную кислоту и смесь углеродных фуллеренов фракции C<sub>50</sub>–C<sub>92</sub>. Реакция проводилась в контролируемых термokatалитических условиях на границе раздела фаз используемых при синтезе растворителей – метилбензола и диметилкетона. Об окончании процесса судили по изменению температуры реакционной среды. Полученный продукт представлял собой вязкую жидкость красно-оранжевого цвета с характерным запахом.

Осуществляемый синтез на примере C<sub>60</sub> фуллерена может быть представлен в виде схемы на рис. 1

Получаемый продукт, являясь в целом электронеутральным, представляет собой цвиттер-

ион, обладающий неограниченной растворимостью в воде и этиловом спирте, что облегчает его использование для регуляции роста растений и грибов.

Для исследования спектральных характеристик полученного аддукта фуллерена использовали метод ИК-Фурье спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Исследование проводили на ИК-Фурье спектрометре NICOLET6700. Выбранный спектральный диапазон составил от 400 до 4000 см<sup>-1</sup>. Для регистрации оптических характеристик использовали образцы анализируемого продукта, полученного на алюминиевой подложке путем перекристаллизации в этиловом спирте. ИК спектр поглощения представлен на рис. 2.

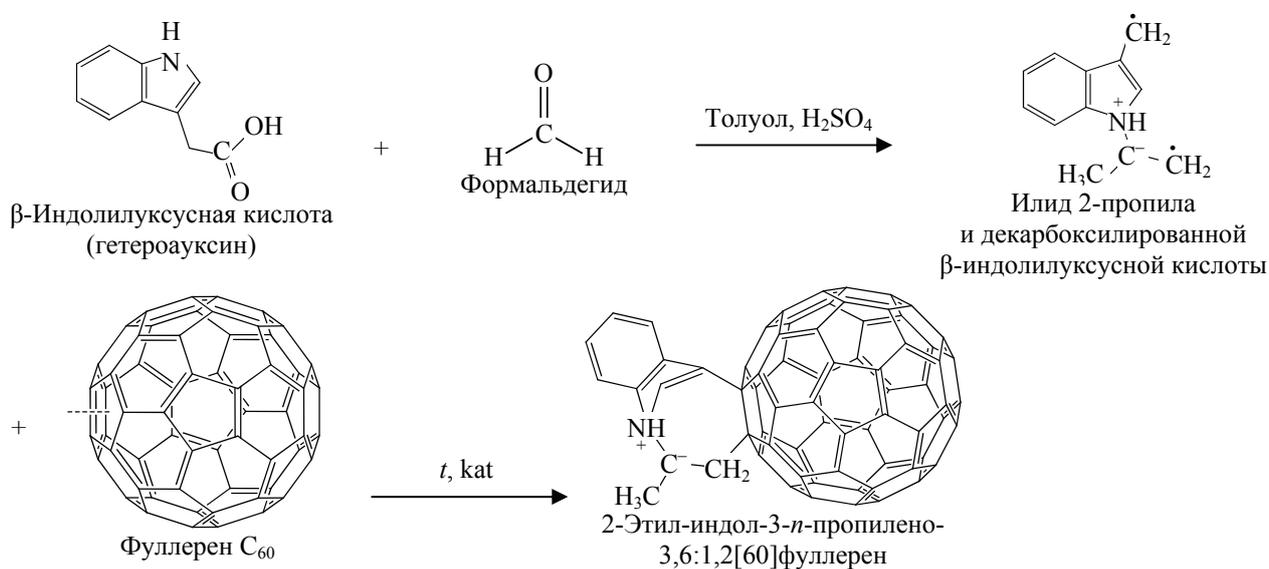


Рис. 1. Схема синтеза аддукта на основе 2-индол-3-масляной кислоты и фуллеренов фракции C<sub>50</sub>–C<sub>92</sub>

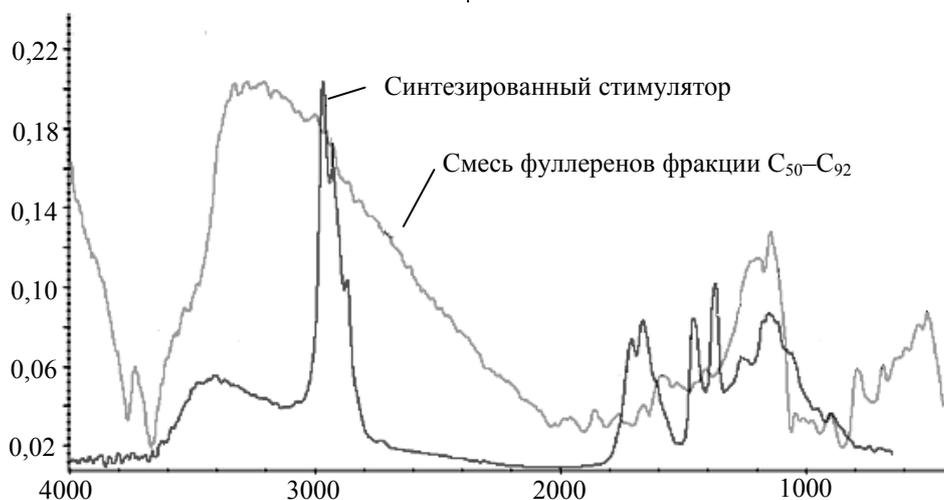


Рис. 2. ИК-спектры синтезированного стимулятора роста и смеси фуллеренов фракции C<sub>50</sub>–C<sub>92</sub>

Снижение интенсивности характерных линий поглощения в области 1150 и 1250  $\text{см}^{-1}$  и смещение этих пиков относительно спектра фуллерена, а также появление новых пиков в области 3500, 2950, 1670, 1460 и 1730  $\text{см}^{-1}$  свидетельствуют о протекающей химической реакции и позволяют предположить следующую структуру полученного стимулятора: 2-этил-индол-3-*n*-пропилено-3,6:1,2[60]фуллерен (рис. 1) [4, 5]. Интересной особенностью синтезированного стимулятора роста является глобулярная структура образца, полученного после перекристаллизации в этиловом спирте, что показано на рис. 3.

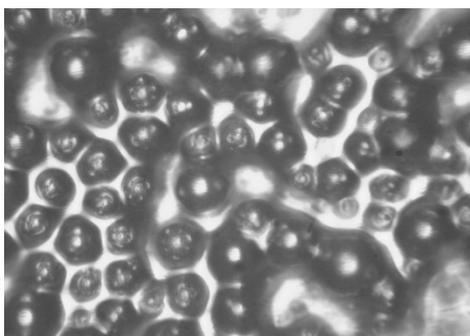


Рис. 3. Структура синтезированного стимулятора роста (увеличение 250 $\times$ )

В качестве объекта биологического исследования была выбрана яровая пшеница твердого сорта «Харьковская 39». Посев проводили на чашках Петри. Сравнивали влияние на морфофизиологические свойства выбранного сорта пшеницы синтезированным стимулятором роста по отношению к контрольному образцу, а также к исходным компонентам синтеза – смесь гидратированный фуллерен  $\text{C}_{60}$  и индолмасляная кислота.

Эксперимент по проращиванию семян пшеницы проводили в трех биологических поверхностях. К раствору Кноппа в соответствующих вариантах добавляли раствор анализируемого стимулятора (от 0,0001 до 0,00001% мас.), раствор индолмасляной кислоты (от 0,001 до 0,0001% мас.), раствор гидратированного фул-

лерена (от 0,0001 до 0,00001% мас.). Результаты исследования представлены в табл. 1.

На рис. 4 продемонстрированы результаты полевых испытаний. Системный анализ полученных данных показывает эффективность синтезированного стимулятора в концентрациях на порядок меньше, чем индолмасляная кислота. Десятикратное увеличение концентрации от нормы в 0,00001% вызывает подавление роста органов анализируемых объектов. Полученные данные указывают также на отсутствие существенной разницы между сухой и влажной массой в процентном отношении, хотя четко отмечена более высокая оводненность тканей исследуемых растений под влиянием синтезированного стимулятора и гидратированного фуллерена. В целом следует отметить, что синтезированный продукт больше влияет на длину надземной части, чем на массу и размер корневой системы. Это дает основание полагать о повышенной концентрации осмолитиков в тканях растений. Наряду с этим нельзя не отметить тот факт, что в присутствии синтезированного стимулятора оводненность корневой системы минимальна, одновременно ее длина значительно увеличена.

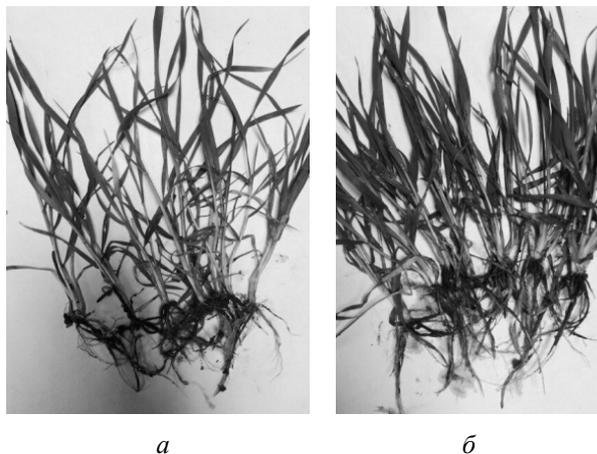


Рис. 4. Рост партии озимой пшеницы под воздействием дистиллированной воды (а) и синтезированного аддукта фуллерена (б)

Таблица 1

**Результаты исследования влияния синтезированного стимулятора на морфологические свойства пшеницы сорта «Харьковская 39»**

Препарат/концентрация, % мас.	Масса влажн., мг			Масса сух., мг		
	корни	ростки	общ.	корни	ростки	общ.
Контроль	333,8	780,7	1114,5	55,0	141,0	196,1
ИМК 0,001%	346,0	947,2	1293,2	102,0	248,0	350,1
$\text{C}_{60}\text{H}_3$ 0,0001%	181,0	536,0	717,0	43,2	150,4	193,6
$\text{C}_{60}\text{H}_3$ 0,00001%	237,3	909,6	1146,8	43,8	207,0	250,8
ИМК+ $\text{C}_{60}\text{H}_3$ 0,0001%	277,3	763,1	1040,4	78,7	169,9	248,5
Стимулятор 0,0001%	316,9	529,4	1046,3	87,0	139,8	226,8
Стимулятор 0,00001%	381,0	723,6	1104,6	94,3	134,3	228,5

В целом анализ данных, представленных в табл. 1, позволяет утверждать, что синтезированный аддукт фуллерена в концентрациях 0,00001% мас. проявляет свойства стимулятора роста ауксинного типа. Очень низкая действующая концентрация анализируемого вещества может быть объяснена тем, что биологическое действие 2-этил-индол-3-*n*-пропилено-3,6:1,2[60]фуллерена обусловлено ускоренным перемещением остатка аминокислоты к рецепторам за счет высокого сродства молекулы фуллерена к биохимическим структурам.

Во второй части эксперимента в качестве объектов исследования рассматривали мицелий культивируемых грибов следующих видов: *Ganoderma lucidum* (лакированный трутовик), *Kuehneromyces mutabilis* (опенок летний), *Flammulina velutipes* (опенок зимний), *Lentinula edodes* (шиитакэ).

Инокуляцию мицелия анализируемых штаммов проводили на контрольную агаризованную среду (агар Чапека), и среду с добавлением исследуемого стимулятора роста в количестве 0,00001% мас. В качестве основного состава агара Чапека использовали следующие компоненты для приготовления 1 л раствора: 20 г агара, 1000 мл дистиллированной воды, 30 г сахарозы, 3 г нитрата натрия, 1 г дигидрофосфата калия, 0,5 г сульфата магния, 0,5 г хлорида калия, 0,01 г железного купороса [4, 5]. Приготовление агара Чапека проводили в автоклаве текучим паром при температуре 120°C в течение 1 ч. Полученную среду фильтровали, разливали по чашкам Петри и стерилизовали при температуре 110°C, под давлением 0,5 кгс/см<sup>2</sup> в течение 20 мин. Инокуляцию стерилизованной среды проводили в ламинарном боксе при температуре 24°C. Результаты эксперимента представлены на рис. 5.

Полученные данные указывают на то, что гифы мицелия *Kuehneromyces mutabilis* и *Ganoderma lucidum* развиваются более интенсивно в опытном варианте, а *Lentinula edodes* обозначивает свой рост только при введении аддукта фуллерена.

Детальное изучение гиф анализируемых штаммов проводили методом визуальной микроскопии с применением лабораторного микроскопа Полам Р312М. Выбранный диапазон увеличения составил от 250× до 550×. Результаты исследования на примере *Flammulina velutipes* и *Lentinula edodes* приведены на рис. 6 и рис. 7.

Полученные данные указывают на то, что гифы мицелия *Kuehneromyces mutabilis* и *Ganoderma lucidum* развиваются более интенсивно в опытном варианте, а *Lentinula edodes* обозначивает свой рост только при введении аддукта фуллерена.

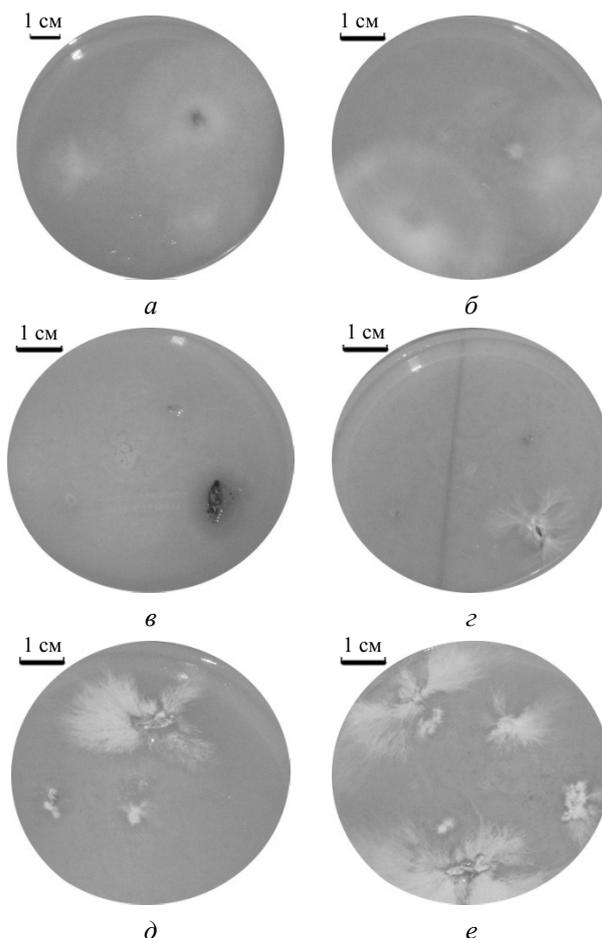


Рис. 5. Мицелий культивируемых грибов, выращенных на чашках Петри:  
а, б – *Kuehneromyces mutabilis* (опенок летний);  
в, г – *Lentinula edodes* (шиитакэ); д, е – *Ganoderma lucidum* (лакированный трутовик)

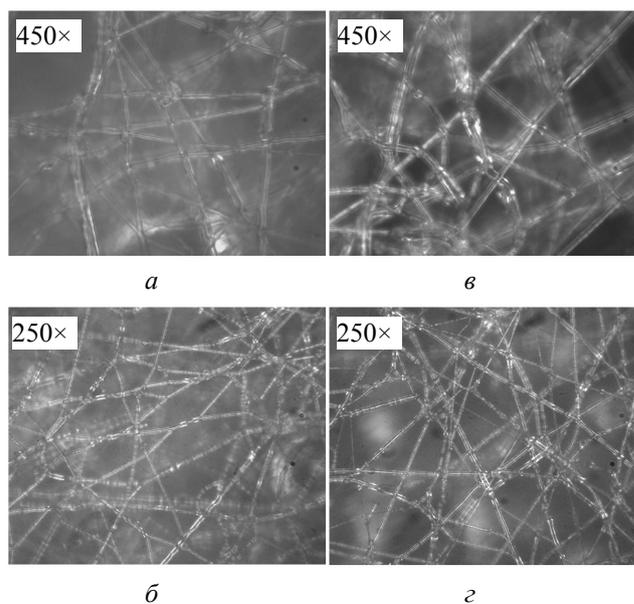


Рис. 6. Микроструктура мицелия *Flammulina velutipes* (опенок зимний):  
а, б – контрольный;  
в, г – обрабатывался аддуктом фуллеренов

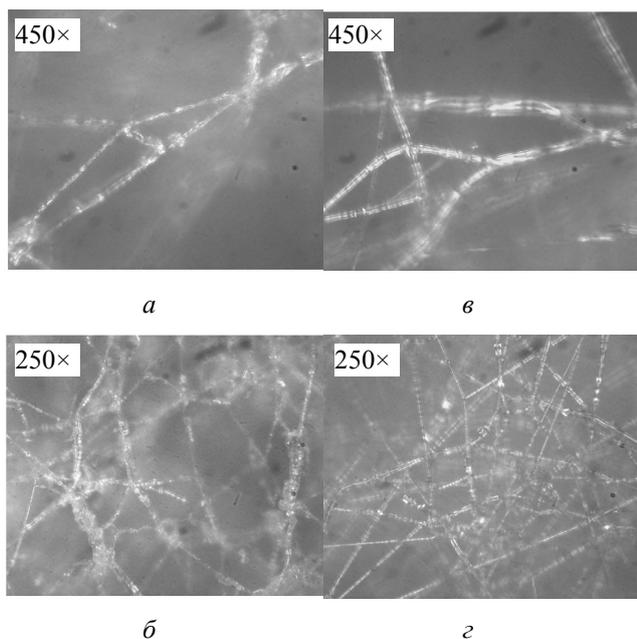


Рис. 7. Микроструктура мицелия *Lentinula edodes* (шиитаке):  
а, б – контрольный; в, г – обрабатывался аддуктом фуллеренов

Результаты исследований показали, что для гриба *Flammulina velutipes* плотность гиф мицелия сохраняется, увеличивается их толщина, появляется блеск, незначительно увеличивается число разветвлений и степень септирования. Микроструктура поверхности мицелия *Lentinula edodes* свидетельствует о существенно возросшей плотности гиф мицелия на фоне увеличения их толщины и степени септирования. Также отмечено появление блеска, видны границы отдельных клеток, существенно возросло число разветвлений и количество клеток на единицу длины. Такие тенденции ведут в конечном итоге к возрастанию частоты перекрещивания отдельных гиф между собой и образованию диплоидных клеток, что в свою очередь ведет к увеличению урожая.

Исследование действия синтезированного стимулятора в виде 0,00001%-ного водного раствора на плодовые тела вешенки обыкновенной показали, что обработка первичного мицелия перед посевом в субстратные блоки приводит к увеличению плотности мицелия и значительному увеличению количества примордиев, что в свою очередь приводит к изменению урожайности в положительную сторону. Также отмечена общая тенденция к ускорению роста грибницы на фоне увеличивающейся температуры мицелия и, как следствие, сокращение вегетационного периода культивируемой вешенки в среднем на 4 дня, что представлено в табл. 2. Кроме того, 2-этил-индол-3-*n*-

пропилено-3,6:1,2C[60]фуллерен проявляет регулятивный характер, повышая устойчивость к воздействию триходермы.

Таблица 2

**Показатели вегетационного периода вешенки**

Показатель вегетации	Контрольный опыт (дист. вода)	Стимулятор (аддукт фуллеренов)
Вид субстрата	Пшеница твердых сортов	
Концентрация вводимого препарата, %-ный водный раствор	0	0,00015
Увеличение числа примордиев относительно контрольного опыта, %	–	44,2
Увеличение урожайности относительно контрольного опыта, %:		
– первая волна	–	21,3
– вторая волна	–	11,7
Температура грибницы, °С:		
– на 14-е сутки	34	38
– на 21-е сутки	33	39
Устойчивость к заражению триходермой	Средняя	Высокая
Производственный цикл, сутки:		
– первая волна	34	31
– вторая волна	67	63

Анализ экстрактов из плодовых тел вешенки обыкновенной спектральным методом показал отсутствие в них компонентов вводимого стимулятора, в частности фуллеренов, а также незначительное увеличение содержания селена, что указывает на экологическую безопасность получаемой продукции. Также на основании лабораторного метода в чашках Петри и вегетационно в теплице было отмечено снижение способности триходермы к подавлению роста и развития вешенки.

**Закключение.** Полученные результаты позволяют рекомендовать к широкому опробованию синтезированный аддукт углеродных фуллеренов в качестве нового стимулятора роста с целью последующего промышленного применения, в частности для решения проблемы устойчивости посевов яровой пшеницы к весенней засухе и как компонента питательных сред, в том числе для трудно культивируемых и перспективных грибов и для инокуляции первичного мицелия.

### Литература

1. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха [и др.]; под ред. В. С. Шевелухи. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Высш. шк., 2008. 710 с.
2. Maggini M., Scorrano G., Prato M. Addition of azomethine ylides to C60: synthesis, characterization, and functionalization of fullerene-pyrrolidines // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. Vol. 115 (21). P. 9798–9799.
3. Трошин П. А., Любовская Р. Н. Органическая химия фуллеренов: основные реакции, типы соединений фуллеренов и перспективы их практического использования // *Успехи химии*. 2008. № 4. С. 323–369.
4. Черепанова Н. П. Морфология и размножение грибов. Ленинград: Изд-во Ленингр. ун-та, 1981. 120 с.
5. Дудка И. А., Вассер С. П. Грибы. Справочник миколога и грибника. Киев: Наукова думка, 1987. 535 с.

### References

1. Shevelukha V. S., Kalashnikova E. A., Kochieva E. Z. *Sel'skohozyaystvennaya biotekhnologiya* [Agricultural biotechnology]. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 2008. 710 p.
2. Maggini M., Scorrano G., Prato M. Addition of azomethine ylides to C60: synthesis, characterization, and functionalization of fullerene-pyrrolidines. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, vol. 115 (21), pp. 9798–9799.
3. Troshin P. A., Lyubovskaya R. N. Organic chemistry of fullerenes: the basic reaction types of fullerene compounds and perspectives of their practical use. *Uspekhi khimii* [Chemistry success], 2008, no. 4, pp. 323–369 (in Russian).
4. Cherepanova N. P. *Morfologiya i razmnzheniye gribov* [Morphology and reproduction of mushrooms]. Leningrad, Izdatel'stvo Leningradskogo Universiteta Publ., 1981. 120 p.
5. Dudka I. A., Vasser S. P. *Griby. Spravochnik mikologa i gribnika* [Mushrooms. Directory mycologist and mushroom picker]. Kiev, Naukova dumka Publ., 1987. 535 p.

### Информация об авторах

**Чичварин Александр Валерьевич** – кандидат химических наук, доцент кафедры химии. Старооскольский технологический институт (филиал Национального исследовательского технологического университета «МИСиС») (309516, г. Старый Оскол, мкр. Макаренко, 42, Российская Федерация).

**Игуменова Татьяна Ивановна** – кандидат технических наук, доцент кафедры химии и химической технологии органических соединений и переработки полимеров. Воронежский государственный университет инженерных технологий (394036, г. Воронеж, пр. Революции, 19, Российская Федерация).

**Прокопчук Николай Романович** – член-корреспондент НАН Беларуси, доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой технологии нефтехимического синтеза и переработки полимерных материалов. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: tnsippm@belstu.by

**Вишневский Константин Викторович** – кандидат технических наук, старший преподаватель кафедры технологии нефтехимического синтеза и переработки полимерных материалов. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: vik@belstu.by

### Information about the authors

**Chichvarin Aleksandr Valer'evich** – Ph. D. Chemistry, associate professor, Department of Chemistry. Starooskol Technological Institute (branch of the National University of Science and Technology “MISIS”) (42, microdistrict Makarenko, 309516, Stary Oskol, Russian Federation).

**Igumenova Tat'yana Ivanovna** – Ph. D. Engineering, associate professor, Department of Chemistry and Chemical Engineering Organic Compound and Polymer Processing. Voronezh State University of Engineering Technologies (19, Revolution Ave., 394036, Voronezh, Russian Federation).

**Prokopchuk Nikolaj Romanovich** – corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, D. Sc. Chemistry, professor, Head of the Department of Technology of Petrochemical Synthesis and Polymer Materials Processing. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tnsippm@belstu.by

**Vishnevskiy Konstantin Viktorovich** – Ph. D. Engineering, senior lecturer, Department of Technology of Petrochemical Synthesis and Polymer Materials Processing. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vik@belstu.by

Поступила 19.02.2015