

## СВЕРХКРИТИЧЕСКАЯ ФЛЮИДНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ ТАЛЛОМА ЛИШАЙНИКА *HYPOGYMNINGIA PHYSODES*

**О.С. Бровко** — Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лавёрова УрО РАН, Архангельск, Россия. ORCID: 0000-0002-1961-7831. Эл. почта: brovko-olga@rambler.ru

**А.Д. Ивахнов** — Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лавёрова УрО РАН, Архангельск, Россия; Северный (Арктический) Федеральный университет имени М.В. Ломоносова, Архангельск, Россия. ORCID: 0000-0003-2822-9192. Эл. почта: ivahnov-tema@yandex.ru (для переписки)

**Д.В. Жильцов** — Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лавёрова УрО РАН, Архангельск, Россия. ORCID: 0000-0002-1155-4135. Эл. почта: dnorton.usa@gmail.com

**Т.А. Бойцова** — Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лавёрова УрО РАН, Архангельск, Россия. ORCID: 0000-002-3899-7243. Эл. почта: tboitsova@yandex.ru

**А.А. Слобода** — Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лавёрова, Архангельск, Россия. ORCID: 0000-0002-1415-9050. Эл. почта: sloboda.iepn@yandex.ru

© Поступила в редакцию 15.02.2024 г. Прошла рецензирование: 01.03.2024 г.  
Принята к публикации: 01.03.2024 г.

Исследован процесс сверхкритической флюидной экстракции (СКФЭ) таллома лишайника вида *Hypogymnia physodes* диоксидом углерода в присутствии ацетона в качестве соразтворителя. Выполнена оценка условий экстракции (температура, давление и продолжительность) на выходы экстракта, фенольных соединений, в том числе низкомолекулярных фенолов, атранорина и флавоноидов. Показано, что основное количество экстрактивных веществ (до 90 %) извлекается в течение 40 мин экстракции. Выход экстракта достигает 156,5 мг/г при содержании в нем фенольных соединений до 87,3 %. Полученные экстракты обладают высокой антирадикальной активностью (до 225 мкмоль тролокса-экв/г). Установлено наличие положительной корреляционной связи антирадикальной активности экстрактов и содержания в них фенольных соединений, в том числе атранорина. Выявлена антибактериальная активность экстрактов по отношению к грамположительному (*Bacillus subtilis*) и грамотрицательным (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*) штаммам микроорганизмов.

**Ключевые слова:** *Hypogymnia physodes*, сверхкритическая флюидная экстракция, низкомолекулярные фенолы, флавоноиды, атранорин, антибактериальная активность.

### ВВЕДЕНИЕ

Одна из актуальных проблем современной медицины — создание препаратов современного поколения в связи с постоянным появлением новых штаммов микроорганизмов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью. Для борьбы с этим фактором предпринимаются активные попытки получения новых биологически активных веществ (БАВ) природного

(микробного, растительного, животного) происхождения [1]. Природные антибиотики — лекарственные вещества, обладающие широким спектром антибактериальной активности и не оказывающие при этом дополнительную нагрузку на печень, почки и органы кроветворения. Антибиотики растительного происхождения укрепляют иммунитет, мягко действуют на все системы организма, восполняют дефицит витаминов. Они могут применяться как мощное вспомогательное средство терапии при воспалительных заболеваниях вирусной и бактериальной этиологии дыхательных путей, в период выздоровления после тяжелых, истощающих заболеваний и как дополнительное общеукрепляющее средство.

В ряде работ [2—7] была показана высокая антибактериальная активность экстрактов растительных веществ фенольной природы (фенольные соединения, ФС): низкомолекулярные фенолы (НФ) и флавоноиды (ФВ) против некоторых видов грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*) и грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*) бактерий.

Кроме того, фенольные соединения растительного происхождения являются мощными антиоксидантами [8], а их многообразный терапевтический потенциал, в частности, высокая антибактериальная активность доказана многочисленными исследованиями [9—14]. Учитывая антиокислительное и антибактериальное действие фенольных соединений, предполагается, что при их одновременном применении с антибиотиками возможно повышение эффективности антибиотикотерапии [15].

К особой группе фенольных соединений можно отнести лишайниковые кислоты (ЛК), являющиеся уникальными и видоспецифичными соединениями лишайников, не синтезируемыми другими группами растений. Среди них стоит отметить усниновую (УК), барбатовую, фумарпротоцеттаровую, скватматовую кислоты и атранорин (АТ) [16]. Усниновая кислота — один из наиболее изученных и распространенных метаболитов лишайников, нашедший широкое применение в сельском хозяйстве, косметологии, а также фармакологии, стоматологии и других областях медицины [17—20]. Перспективным, но менее изученным метаболитом среди перечисленных, является АТ, который также обладает различными видами физиологической активности: противовирусной, антибиотической, анальгетической, антибактериальной, инсектицидной [21, 22].

Значимым источником фенольных соединений, в том числе флавоноидов и АТ, является лишайник *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. — широко распространенный в России и, в целом, в северном полушарии. *H. physodes* относится к листоватым лишайникам, слоевище розетковидное, верхняя сторона таллома светло-серого или светло-зеленого цвета, гладкая, в большинстве матовая, иногда с темными пятнами; нижняя сторона — черная. Произрастает лишайник на коре хвойных и лиственных пород деревьев [23]. Лишайниковое сырье можно рассматривать как недревесный ресурс леса, являющийся ценным источником уникальных биологически активных веществ.

Традиционно для выделения БАВ из растительного сырья применяют прессование (горячее и холодное), экстракцию водой и органическими растворителями (этанол, ацетон, хлороформ). Среди наиболее распространенных методов экстракции применяют мацерацию и ее различные модификации с использованием сверхвысокочастотного излучения или ультразвуковой обработки, а

также экстракцию в аппарате Сокслета (перколяция). Достоинство данных методов — простота и дешевизна оборудования; к недостаткам можно отнести неполноту экстракции действующих веществ (мацерация), большую продолжительность процесса, повышенное содержание балластных веществ в полученных экстрактах (высокомолекулярные вещества, пектины, слизи, белки и др.) [24, 25].

Для повышения эффективности получения экстрактов из растительного сырья применяют метод сверхкритической флюидной экстракции (СКФЭ) углекислым газом или органическими растворителями (этанол, ацетон) [26—30]. Такая обработка сырья относится к высокоэффективным технологическим процессам, обеспечивающим снижение трудовых затрат, улучшающим качество продукции и способствующим комплексному использованию сырьевых ресурсов и материалов. Высокая селективность метода обусловлена возможностью варьирования температуры и давления флюида, что позволяет получать высокоочищенные экстракты, содержащие более 88—89 % действующего вещества без потери биологической активности. Кроме того, преимуществом СКФЭ в сравнении с традиционными методами является сокращение продолжительности процесса экстракции и уменьшение расхода экстрагента.

Исследования по выделению БАВ фенольной природы из *H. physodes* различными органическими растворителями представлены в работах [5, 6, 31], в то же время в научной литературе отсутствуют работы по их выделению методом СКФЭ.

Цель данного исследования — выделение фенольных соединений из таллома лишайника *H. physodes* методом СКФЭ.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования — эпифитный лишайник *H. physodes*, был отобран на территории Большого Соловецкого острова (архипелаг Соловецкий, Архангельская обл.). Образцы лишайников хранили в плотных бумажных пакетах в темноте при комнатной температуре. Непосредственно перед экстракцией образцы лишайника размалывали на лабораторной мельнице VLM (Вилитек, Россия). Для исследования использовали фракцию размером 0,2—0,5 мм, составляющую 80 % от размолотого образца. Влажность ( $8,1 \pm 0,2$  %) и зольность ( $5,5 \pm 0,1$  %) образца определяли по стандартным методикам [32, 33].

Сверхкритическую экстракцию диоксидом углерода проводили с использованием экстрактора MV-10ASFE (Waters, США). Навеску сырья (~2 г) помещали в автоклав, расположенный в термостате, который разогревали до требуемой температуры. Продолжительность нагрева 20 мин. После установления требуемой температуры (60, 75 или 90 °С) проводили процесс экстракции при скорости потока диоксида углерода 5,0 мл/мин с добавлением соразтворителя — ацетона (0,5 мл/мин) при давлениях 25, 30 или 35 МПа и продолжительности процесса 20, 40, 60, 80, 100 и 120 мин. В качестве домывающего растворителя использовали ацетон (о.с.ч., Вектон, Россия), объемная скорость подачи потока 0,5 мл/мин. Полученные растворы экстрактивных веществ доводили ацетоном до 50 мл. По 1 мл ацетоновых растворов отбирали для определения антирадикальной и антибактериальной активности. Далее экстракты упаривали в токе азота для предотвращения окисления. Химическому анализу подвергали сухие экстракты.

Выход экстрактов (ЭК) определяли гравиметрически [34].

Содержание низкомолекулярных фенолов в экстрактах определяли спектрофотометрическим методом с реактивом Фолина—Дениса [35]. Измерения оптической плотности проводили при длине волны 730 нм на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония). В качестве стандарта использовали галловую кислоту (Sigma-Aldrich, США), содержание флавоноидов в экстрактах определяли спектрофотометрическим методом, основанным на реакции их комплексообразования с хлоридом алюминия. Измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) в кварцевых кюветках (толщина слоя 10 мм); максимум поглощения комплекса наблюдали при длине волны 415 нм. В качестве стандарта использовали рутин (Sigma-Aldrich, США). Для определения содержания флавоноидов строили калибровочную кривую зависимости оптической плотности от концентрации рутина. Результаты выражали в миллиграмм-эквивалентах рутина на грамм экстракта [36, 37].

Количественное содержание АТ в экстрактах проводили методом ВЭЖХ на приборе LCMS — 2020 (Shimadzu, Япония). Условия хроматографического анализа: подвижная фаза — 0,5 % водный раствор муравьиной кислоты и ацетонитрил в объемном соотношении 30:70; колонка RestekUltraC18 100 мм × 3 мм, размер зерна неподвижной фазы 3 мкм, скорость потока подвижной фазы 0,5 мл/мин, объем вводимой пробы 5 мкл. В качестве стандарта выступал образец атранорина (Sigma-Aldrich, США).

Выходы ЭК, АТ выражали в мг/г абсолютно сухой массы лишайника. Содержание низкомолекулярных фенолов в лишайниках определяли в пересчете на галловую кислоту, а флавоноидов — в пересчете на рутин.

Антирадикальную активность (АРА) экстрактов оценивали по методике [38] с применением катион-радикала АВТС. Для построения калибровочного графика использовали тролокс (Sigma-Aldrich, США).

Биологическую (антибактериальную) активность экстрактов лишайника определяли диско-диффузионным методом [39, 40]. В качестве тест-культур использовали штаммы грамположительного — *Bacillus subtilis* ATCC 6633 — и трех грамотрицательных — *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 3177 — микроорганизмов. Инокулянт-тест микроорганизмов содержал по стандарту МакФарланда примерно  $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл. Для получения бактериального газона производили посев 1 мл инокулянта на чашку Петри со средой *Nutrient agar*. Сверху стерильным инструментом накладывали бумажный диск диаметром 6,0 мм, пропитанный 1 мл экстракта (растворитель — ацетон). Чашки Петри с исследуемыми образцами инкубировали при температуре 37 °С (*Bacillus subtilis* культивировали при 30 °С) в течение 48 ч. Степень антибактериальной активности оценивали по диаметру зоны задержки роста тест-культуры: очень высокая чувствительность — 20 мм и более, умеренная — 15—19 мм, слабая — 9—14 мм, отсутствие чувствительности — менее 8 мм. Диаметр зон задержки роста измеряли с точностью до 1 мм. Аналогичные исследования, проведенные для растворителя (ацетон), показали отсутствие антибактериального эффекта по всем исследуемым штаммам бактерий.

Все аналитические измерения были выполнены в трех повторениях. Результаты экспериментов представлены в виде средней арифметической величины, относительная ошибка не превышала 5 %. Для установления статистической

взаимосвязи между параметрами использовали *t*-критерий Стьюдента при доверительном уровне  $P_i = 95\%$  с применением программы SPSS Statistics v22.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние температуры ( $T$ , °С), давления ( $P$ , МПа) и продолжительности ( $\tau$ , мин) экстракции на выходы экстрактов, фенольных соединений, АТ, низкомолекулярных фенолов, флавоноидов и АРА экстрактов, полученных из таллома лишайника *H. physodes*, отражено в табл. 1.

В ходе эксперимента отмечено изменение выхода ЭК в интервале 42,0–156,5 мг/г. Установлено, что с увеличением продолжительности экстракции

Таблица 1

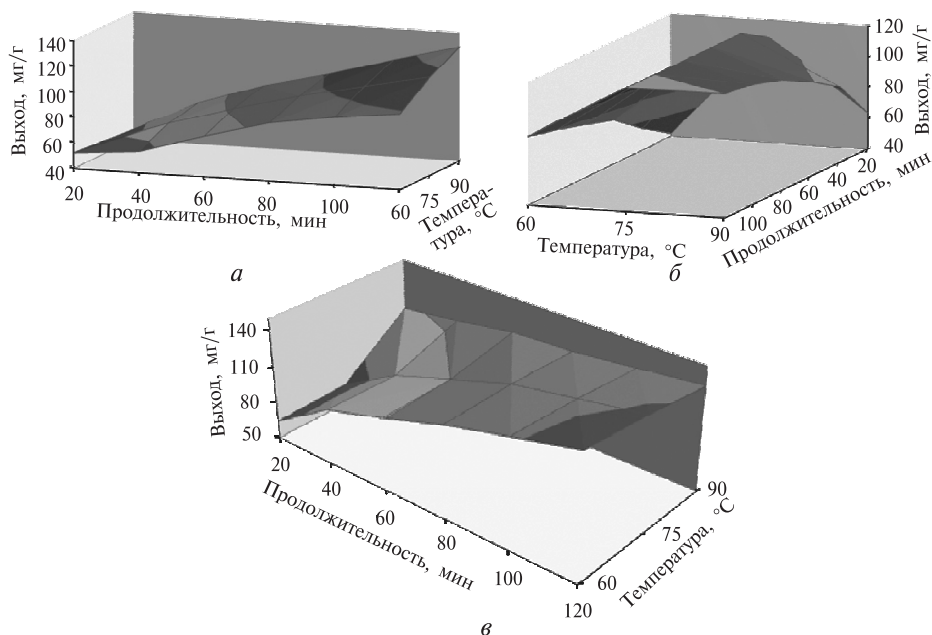
**Влияние условий СКФЭ на выходы экстрактов, фенольных соединений и величину антирадикальной активности экстрактов**

$P$ , МПа	$T$ , °С	$\tau$ , мин	Выход, мг/г					АРА, мкмоль тролокса, экв/г
			ЭК	АТ	НФ	ФВ	ФС*	
25	60	20	52,2±2,6	18,0±1,9	17,6±0,9	6,7±0,3	42,3±2,5	38,5±1,9
		40	56,4±2,8	21,4±2,1	20,4±1,0	8,4±0,4	50,2±3,0	54,2±2,7
		60	71,4±3,6	22,8±2,3	23,8±1,2	10,0±0,5	56,6±3,4	92,7±4,6
		80	85,0±4,3	23,7±2,5	26,5±1,3	11,5±0,6	61,7±3,7	127,8±6,4
		100	92,7±4,6	24,3±2,1	28,9±1,4	13,0±0,7	66,1±3,3	146,8±7,3
		120	98,6±4,9	24,9±2,6	31,0±1,6	14,5±0,7	70,3±4,2	177,0±8,9
	75	20	50,0±2,6	25,3±2,5	23,8±1,2	5,4±0,3	54,5±3,3	39,1±1,9
		40	66,8±3,5	29,0±3,1	30,8±1,5	7,7±0,4	67,5±3,5	79,7±4,0
		60	81,7±4,0	30,6±3,4	37,3±1,9	9,4±0,5	77,3±3,9	119,7±6,1
		80	94,8±5,0	31,7±3,2	42,4±2,1	10,8±0,5	84,9±4,3	156,3±7,8
		100	106,1±5,4	32,4±3,2	46,8±2,3	12,4±0,6	91,6±5,5	191,8±9,6
		120	116,4±5,8	33,0±3,5	49,7±2,5	13,4±0,7	96,1±4,8	222,9±11,1
	90	20	47,0±2,6	28,9±2,9	24,3±1,2	7,6±0,4	60,8±3,6	34,8±1,7
		40	72,0±3,6	32,7±3,1	32,9±1,6	9,9±0,5	75,5±4,5	69,1±3,5
		60	88,8±4,5	34,3±3,5	38,8±2,0	11,6±0,6	84,7±4,2	102,4±5,2
		80	101,1±5,5	36,0±3,8	43,6±2,2	13,0±0,7	92,6±4,6	132,4±6,6
		100	115,6±5,9	36,8±3,4	47,9±2,4	14,3±0,7	99,0±6,0	159,7±8,0
		120	128,6±6,5	37,5±3,9	51,7±2,6	15,4±0,8	104,6±6,3	181,8±9,1
30	60	20	42,0±2,1	26,2±2,5	11,0±0,8	4,6±0,2	41,8±2,5	22,2±1,1
		40	53,9±2,5	32,2±3,1	14,3±0,7	6,5±0,3	53,0±3,2	43,6±2,2
		60	68,1±3,4	36,6±3,8	16,5±0,8	7,8±0,4	60,9±3,7	58,2±2,9
		80	74,2±3,7	39,3±4,0	18,1±0,9	8,7±0,4	66,1±3,3	70,3±3,5
		100	79,9±4,0	41,6±4,3	18,9±1,0	9,7±0,5	70,2±4,2	79,7±4,0
		120	84,5±4,3	43,3±4,4	20,0±1,2	10,5±0,5	73,8±4,4	89,0±4,5

P, МПа	T, °C	τ, мин	Выход, мг/г					АРА, мкмоль тролокса, экв /г
			ЭК	АТ	НФ	ФВ	ФС*	
30	75	20	108,6 ± 5,5	38,5 ± 3,6	34,1 ± 1,7	12,7 ± 0,6	85,3 ± 5,1	40,4 ± 2,0
		40	123,1 ± 6,2	43,2 ± 4,5	38,4 ± 1,9	14,5 ± 0,7	96,1 ± 5,8	78,2 ± 3,9
		60	128,5 ± 6,5	45,7 ± 4,7	40,5 ± 2,0	15,8 ± 0,8	102,0 ± 6,1	100,0 ± 4,5
		80	134,5 ± 6,7	46,6 ± 4,9	42,5 ± 2,1	16,8 ± 0,8	105,9 ± 6,4	212,6 ± 10,6
		100	136,5 ± 6,9	47,2 ± 4,8	43,3 ± 2,2	17,5 ± 1,4	108,0 ± 6,5	218,9 ± 11,2
		120	156,5 ± 7,8	47,7 ± 4,6	43,7 ± 2,2	17,6 ± 1,5	109,0 ± 7,0	224,8 ± 11,3
	90	20	63,1 ± 3,2	34,4 ± 3,2	17,6 ± 0,9	8,3 ± 0,4	60,3 ± 4,1	40,3 ± 2,0
		40	89,3 ± 4,5	39,8 ± 4,1	25,6 ± 1,3	11,0 ± 0,6	76,4 ± 4,8	75,9 ± 3,8
		60	101,5 ± 5,0	42,1 ± 4,3	31,6 ± 1,6	12,6 ± 0,7	86,3 ± 5,2	110,9 ± 5,5
		80	111,6 ± 5,6	43,1 ± 4,2	36,2 ± 1,8	14,0 ± 0,7	93,3 ± 5,6	145,2 ± 7,3
		100	117,6 ± 5,9	44,1 ± 4,5	40,0 ± 2,0	15,4 ± 0,8	99,5 ± 6,0	178,1 ± 8,9
		120	123,9 ± 6,4	44,6 ± 4,5	43,3 ± 2,3	16,5 ± 0,8	104,4 ± 6,3	209,5 ± 10,5
35	60	20	64,5 ± 3,3	29,5 ± 3,2	21,0 ± 1,3	9,1 ± 0,5	59,6 ± 3,7	40,1 ± 2,0
		40	95 ± 4,9	37,5 ± 3,9	28,6 ± 1,4	12,5 ± 0,6	78,6 ± 4,7	80,3 ± 4,0
		60	109,1 ± 5,6	39,3 ± 4,0	32,8 ± 1,6	13,7 ± 0,7	85,8 ± 5,2	114,6 ± 5,7
		80	124,8 ± 6,3	40,4 ± 4,1	35,5 ± 1,8	15,0 ± 0,8	90,9 ± 5,5	148,2 ± 7,4
		100	137,7 ± 6,9	41,3 ± 4,2	38,1 ± 1,9	16,2 ± 0,8	95,6 ± 5,7	176,9 ± 8,8
		120	151,3 ± 7,6	42,6 ± 4,3	41,6 ± 2,1	17,8 ± 0,9	100,8 ± 6,0	206,4 ± 10,3
	75	20	66,5 ± 3,3	32,8 ± 3,3	20,5 ± 1,0	8,7 ± 0,4	62,0 ± 3,7	44,9 ± 2,2
		40	93,9 ± 4,7	37,2 ± 3,8	29,2 ± 1,5	12,2 ± 0,6	78,6 ± 4,7	82,8 ± 4,1
		60	110,2 ± 5,5	39,3 ± 3,8	37,0 ± 1,9	14,1 ± 0,8	90,4 ± 5,5	115,5 ± 5,8
		80	125,9 ± 6,3	40,1 ± 4,0	42,3 ± 2,1	15,7 ± 0,8	98,1 ± 5,9	150,6 ± 7,5
		100	134,5 ± 6,8	40,8 ± 4,2	46,1 ± 2,3	16,8 ± 0,9	103,7 ± 6,2	184,5 ± 9,2
		120	143,0 ± 7,2	41,5 ± 4,3	48,8 ± 2,5	17,8 ± 1,0	108,1 ± 6,5	214,7 ± 10,7
	90	20	107,6 ± 5,4	26,3 ± 2,7	32,9 ± 1,7	11,5 ± 0,6	70,7 ± 4,2	31,7 ± 1,6
		40	113,9 ± 5,8	29,3 ± 2,8	34,5 ± 1,8	13,1 ± 0,7	76,9 ± 4,6	42,6 ± 2,2
		60	121,7 ± 6,1	30,7 ± 3,2	35,6 ± 1,9	14,4 ± 0,7	80,7 ± 5,0	60,4 ± 3,1
		80	123,8 ± 6,2	31,2 ± 3,0	36,2 ± 2,0	15,5 ± 0,8	82,9 ± 5,2	76,1 ± 3,8
		100	128,7 ± 6,3	31,8 ± 3,3	36,8 ± 2,1	16,4 ± 0,8	85,0 ± 5,5	91,0 ± 4,6
		120	134,7 ± 6,7	32,3 ± 3,4	37,3 ± 2,3	17,0 ± 0,9	86,6 ± 5,6	99,0 ± 5,2

Примечание: \* Выход ФС включает сумму выходов АТ, НФ и ФВ.

закономерно возрастает и выход ЭК. Зависимость выхода ЭК от температуры и продолжительности процесса при опробованных давлениях имеет сложный характер (рис. 1).

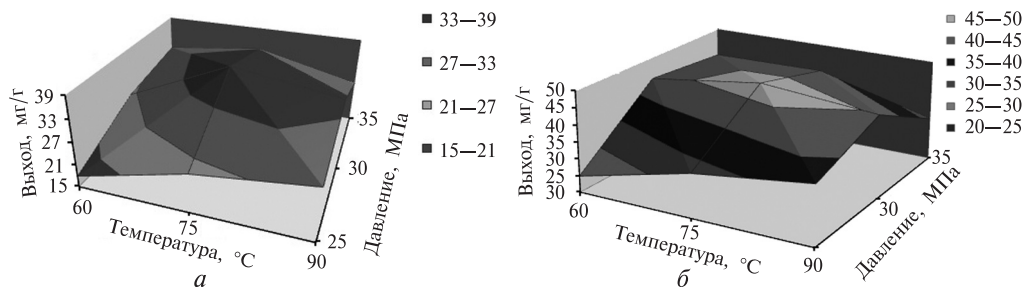


**Рис. 1.** Влияние температуры и продолжительности СКФЭ на выход экстрактов (ЭК) при давлении, МПа:  
а — 25; б — 30; в — 35

При давлении 25 МПа наблюдается монотонный рост выхода экстрактов при увеличении температуры и продолжительности процесса (рис. 1а), тогда как уже при давлении 30 МПа наблюдается явный положительный экстремум на зависимости выхода ЭК от температуры при всех опробованных продолжительностях экстракции (рис. 1 б). При давлении 35 МПа увеличение температуры приводит к увеличению выхода экстракта при продолжительности экстракции 20–60 мин, при большей продолжительности процесса наблюдается снижение выхода экстракта (рис. 1в).

При изучении влияния температуры и давления на выход АТ (рис. 2 а, б) наблюдается явно выраженный положительный экстремум при температуре 75 °С и давлении 30 МПа.

Увеличение температуры выше 75 °С, вероятно, приводит к частичной деградации атранорина, что вызывает снижение его выхода. Снижение выхода АТ при увеличении давления до 35 МПа, вероятнее всего, связано с механическим

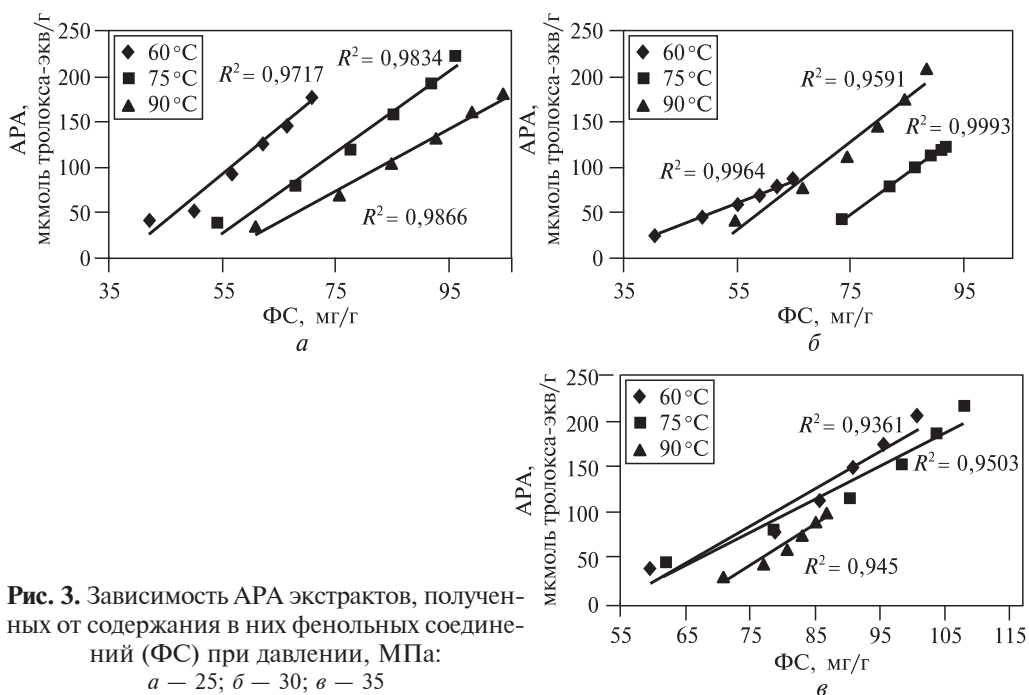


**Рис. 2.** Влияние температуры и давления процесса экстракции на выход атранорина (АТ) при продолжительности процесса, мин:  
а — 20; б — 120

уплотнением биомассы лишайника или затруднением диффузионных процессов ввиду увеличения вязкости флюида при повышении давления (табл. 1). Проведение экстракции при давлении 30 МПа и температуре 75 °С за 40 мин и более позволило извлечь 43,2—47,7 мг/г атранорина (табл. 1), что превышает его максимальное количество, определенное методом «исчерпывающей» экстракции ацетоном в аппарате Сокслета (41,0 мг/г) [41]. Сверхкритический углекислый газ, модифицированный ацетоном, в данных условиях оказывается более эффективным экстрагентом АТ из биомассы лишайника по сравнению с чистым ацетоном.

Тенденции влияния условий экстракции на выход АТ аналогичны и для выходов ФВ и НФ. В ходе проведения эксперимента выявлено, что в полученном экстракте из таллома лишайника доля фенольных соединений оставляла от 64,3 (90 °С, 35 МПа) до 87,3 % (60 °С, 30 МПа) от выхода ЭК. В ряде работ [8, 41, 42] показано, что данные соединения являются одними из основных природных антиоксидантов благодаря особенностям своего строения и реакционной способности. Увеличение продолжительности экстракции с 20 до 120 мин закономерно приводит к возрастанию АРА экстракта в 3,1—5,7 раза (табл. 1), что коррелирует с возрастанием содержания в экстрактах фенольных соединений. Следовательно, в экстрактах лишайника *H. physodes* АРА определяется содержанием в них фенольных соединений, как и в ряде других извлечений из растительного сырья [41, 42]. Максимальное увеличение АРА в 5,7 раз наблюдается при давлении 25 МПа и температуре 75 °С с увеличением продолжительности экстракции от 20 до 120 мин. С увеличением давления до 35 МПа и температуры до 90 °С наблюдается снижение АРА, связанное с уменьшением доли фенольных соединений в экстракте (до 64,3 %).

На рис. 3 и рис. 4 представлены зависимости АРА экстрактов, полученных при разных давлениях, от содержания в них ФС и АТ. В результате выявлена



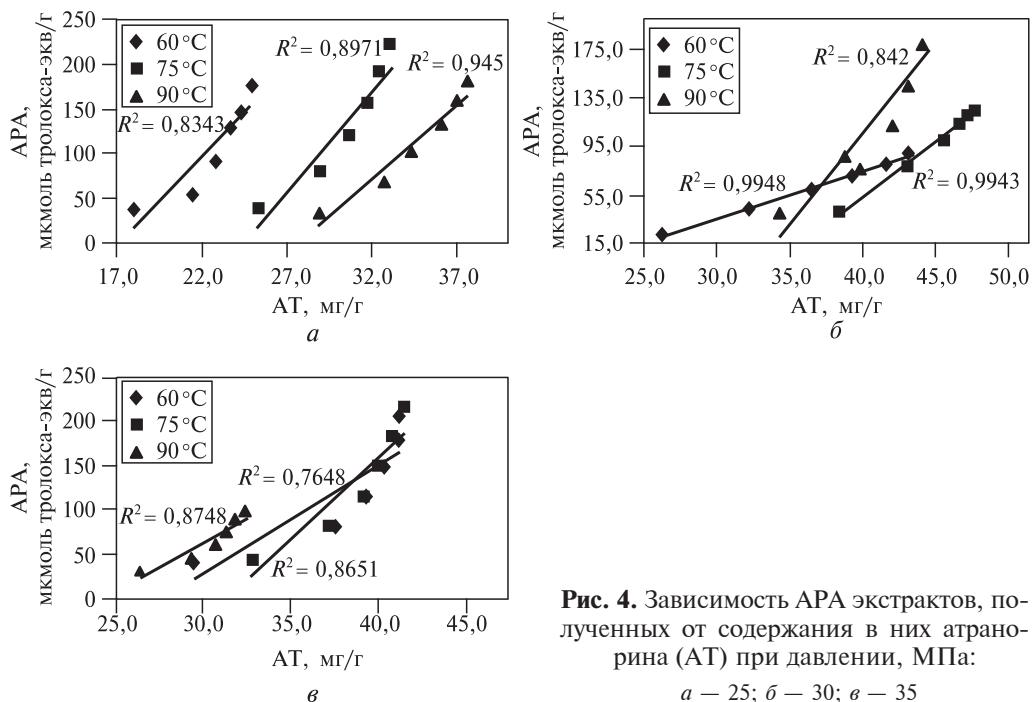


Рис. 4. Зависимость АРА экстрактов, полученных от содержания в них атранорина (АТ) при давлении, МПа: а — 25; б — 30; в — 35

линейная зависимость величины АРА от выходов АТ и суммарного содержания ФС с высокими коэффициентами детерминации (0,9361—0,9993).

При экстракции наибольшая часть АТ (74—91 %) из таллома лишайника экстрагируется за первые 20—40 мин (табл. 1). Аналогичные тенденции наблюдаются в отношении ФВ (извлекается 60—82 %) и НФ (60—90 %).

Проведенные исследования показывают рост антиоксидантной активности экстрактов в течение всего процесса экстракции. Следовательно, АРА экстрактов определяется различными классами фенольных соединений, включая ЛК (АТ), ФВ и НФ (рис. 3 и 4).

Обзор работ зарубежных и отечественных авторов по исследованию бактерицидных свойств экстрактов вторичных метаболитов лишайников, в том числе *H. physodes*, показал, что лишайниковые кислоты и флавоноиды обладают антибактериальной активностью против ряда различных штаммов микроорганизмов [28, 43—51].

Результаты исследования антибактериальной активности некоторых полученных экстрактов лишайника *H. physodes* представлены в табл. 2. Антибактериальная активность оценена для всех экстрактов, полученных при продолжительности экстракции 20 мин, что обусловлено выделением за этот период времени основного количества фенольных соединений (56—82 %). Так, их выход достигает 85,3 мг/г при 30 МПа и 75 °С за данный промежуток времени.

Экстракты, выделенные из лишайника *H. physodes*, показали высокую антибактериальную активность в отношении *B. subtilis* (зона отсутствия роста тест-культуры находится в диапазоне от 20 до 30 мм). Для штамма *P. mirabilis* зона отсутствия роста тест-культуры находится в диапазоне от 12 до 28 мм, что также свидетельствует о высокой антибактериальной активности получаемых экстрактов по отношению к данной культуре. Наименьший ингибирующий эффект наблюдается на тест-культуре *E. coli* (от 12 до 14 мм) для экстрактов, получаемых

Таблица 2

**Антибактериальная активность экстрактов, полученных из таллома лишайника  
*H. physodes***

Условия экстракции ( <i>P</i> , МПа/ <i>T</i> , °С/ <i>τ</i> , мин)	Микроорганизм (зоны подавления роста, мм)			
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
25/60/20	20 ± 0,1	0,0 ± 0,0	12 ± 0,1	0,0 ± 0,0
25/75/20	20 ± 0,1	0,0 ± 0,0	12 ± 0,1	0,0 ± 0,0
25/90/20	20 ± 0,1	0,0 ± 0,0	14 ± 0,2	0,0 ± 0,0
30/60/20	24 ± 0,1	12 ± 0,1	26 ± 0,1	0,0 ± 0,0
30/75/20	30 ± 0,3	14 ± 0,1	28 ± 0,1	0,0 ± 0,0
30/90/20	24 ± 0,2	12 ± 0,1	24 ± 0,1	0,0 ± 0,0
35/60/20	24 ± 0,2	0,0 ± 0,0	24 ± 0,1	0,0 ± 0,0
35/75/20	26 ± 0,1	0,0 ± 0,0	26 ± 0,1	0,0 ± 0,0
35/90/20	24 ± 0,1	0,0 ± 0,0	26 ± 0,1	0,0 ± 0,0

при давлении 30 МПа. Экстракты, получаемые при 25 и 35 МПа, антибактериальной активностью по отношению к *E. coli* не обладают. Не выявлена антибактериальная активность всех полученных экстрактов в отношении *P. aeruginosa*. Зачастую штаммы *P. aeruginosa* показывают высокую устойчивость к действию антимикробных препаратов [43]. Известно, что УК проявляет высокую антибактериальную активность в отношении *B. subtilis* и *E. Coli*, однако при достаточно значительном ее содержании в экстракте (до 3 мг/мл) [28]. В то же время АТ обладает меньшей антибактериальной активностью в сравнении с УК [31]. Полученные нами экстракты содержат до 1 мг/мл АТ, что возможно и обуславливает некоторое ослабление их антибактериальной активности.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что сверхкритическая экстракция *H. physodes* диоксидом углерода с добавлением ацетона в качестве соразтворителя является эффективным методом извлечения из него соединений фенольной природы.

Выявлено, что максимальный выход веществ фенольной природы, в том числе АТ, НФ и ФВ (более 87,3 %), достигается при температуре 60 °С, давлении 30 МПа и продолжительности экстракции 120 мин. При этом вне зависимости от температуры и давления экстракции большая часть АТ (74—91 %), НФ (60—90 %) и ФВ (60—82 %) извлекается в первые 20—40 мин.

Установлено, что наибольшей АРА (до 225 мкмоль тролокса-экв/г) обладают экстракты, полученные при 75 °С и 25—30 МПа; повышение давления до 35 МПа снижает АРА в 2,3 раза за счет снижения содержания веществ фенольной природы в полученном экстракте. Установлена положительная корреляция ( $R^2 = 0,93$ ) между выходом ФС в полученных экстрактах и их АРА, следовательно, антиоксидантная активность определяется именно веществами фенольной природы.

Показано, что полученные экстракты *H. physodes*, обладают антибактериальным действием на ряд штаммов грамположительных (*B. subtilis* ATCC 6633) и грамотрицательных (*E. coli* ATCC 25922, *P. mirabilis* ATCC 3177) микроорганизмов, за исключением *P. aeruginosa* ATCC 27853, обладающего устойчивой резистентностью ко многим антибактериальным препаратам.

## БЛАГОДАРНОСТЬ

Экспериментальная часть работы по проведению сверхкритической флюидной экстракции выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FSRU-2024-0004) с использованием оборудования ЦКП НО «Арктика» (САФУ), исследования в части анализа состава экстрактов проведены при поддержке программы прикладных исследований Министерства экономического развития и науки Архангельской области (проект № 123050500035-0) с использованием оборудования ЦКП КТ РФ-Арктика (ФИЦКИА УрО РАН).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лужанин В.Г., Уэйли А.К., Понкратова А.О., Новикова В.В., Безверхняя Е.А. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022. Т. 11. № 2. С. 65.
2. Коновалов Д.А., Алиева Н.М. // Фармация и фармакология. 2019. Т. 7. № 5. С. 244.
3. Моисеев Д.В. // Вестник ВГМУ. 2014. Т. 13. № 5. С. 130.
4. Савельева Е.Е., Булгакова Н.А., Лапкина Е.З., Баранкина Т.А., Рукосуева Т.В., Сукманов В.А. // Медико-фармацевтический журнал «Пульс». 2020. Т. 22. № 6. С. 99.
5. Тапальский Д.В., Косенкова К.М. // Проблемы здоровья и экологии. 2018. № 4. С. 52.
6. Храменкова О.М. // Вестник ВГУ. 2017. № 3 (96). С. 80.
7. Червоткина Д.Р., Борисова А.В. // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. № 2. С. 254.
8. Дубцова Г.Н., Негматуллоева Р.Н. // Хранение и переработка сельхозсырья. 2011. № 4. С. 46.
9. Shahidi F., Ambigaipalan P. // J. Functional Foods. 2015. Vol. 18. P. 820.
10. Smith A.H., Imlay J.A., Mackie R.I. // Applied and Environmental Microbiology. 2003. No 69. P. 3406.
11. Subramanian M., Goswami M., Chakraborty S., Jawali N. // Redox Biology. 2014. No 2. P. 865.
12. Cushnie T.P., Lamb A.J. // Intern. J. Antimicrobial Agents. 2005. No 26 (5). P. 343.
13. Ерошкин М.Ю., Колье Л.-П., Бангура Ж. // Вестник СПбГУ. Сер. 3. 2005. № 4. С. 69.
14. Замбулаева Н.Д., Жамсаранова С.Д. // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2018. № 1 (8). С. 51.
15. Belenky P., Ye J.D., Porter C.B., Cohen N.R., Lobritz M.A., Ferrante T., Jain S., Korry B.J., Schwarz E.G., Graham C.W., James J.C. // Cell Reports. 2015. No 13. P. 968.
16. Равинская А.П. // Новости систематики низших растений. 1984. Т. 21. С. 160.
17. Ingoldsdottir K. // Phytochemistry. 2002. Vol. 61. No 7. P. 729.
18. Cocchietto M., Skert N., Nimis P.L., Sava G. // Naturwissenschaften. 2002. Vol. 89. P. 137.
19. Mayer M., O'Neill M.A., Murray K., Santos-Magalhaes N.S., Carneiro-Leao A.M.A., Thompson A.M., Appleyard V.C.L. // Anticancer Drugs. 2005. Vol. 16. No 8. P. 805.
20. Соколов Д.Н., Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф. // Успехи химии. 2012. Т. 81. № 8. С. 747.
21. Stojanović G., Stojanović I., Stankov-Jovanović V. Mitić V., Kostić D. // Central European J. Biology. 2010. Vol. 5. P. 808.
22. Stojanović I.Z., Stanković M., Jovanović O., Petrović G., Smelcerović A., Stojanović G. // Natural Product Communications. 2013. Vol. 8. P. 109.
23. Цуриков А.Г., Корчиков Е.С. Определитель лишайников Самарской области. Ч. 1. Листоватые, кустистые и слизистые виды. Учеб. пособие. Самара: Изд-во Самарского университета, 2018. 128 с.

24. Коничев А.С., Федоровский Н.Н., Марахова А.И., Баурин П.В., Якубович Л.М., Черникова М.А. // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки». 2011. № 3. С. 49.
25. Глазков И.Н., Ревельский И.А., Кузякин С.В., Кузнецов М.П., Богданов А.А., Мартынов А.А., Ефимов И.П., Золотов Ю.А. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2006. Т. 1. № 1. С. 52.
26. Бровко О.С., Паламарчук И.А., Бойцова Т.А., Боголицын К.Г., Вальчук Н.А., Ивахнов А.Д. // Фундаментальные исследования. 2015. № 11. С. 659.
27. Бровко О.С., Ивахнов А.Д., Паламарчук И.А., Бойцова Т.А. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2017. Т. 12. № 1. С. 41.
28. Бойцова Т.А., Бровко О.С., Ивахнов А.Д., Жильцов Д.В. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2019. Т. 14. № 4. С. 9.
29. Бровко О.С., Ивахнов А.Д., Жильцов Д.В., Бойцова Т.А. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2022. Т. 17. № 1. С. 49.
30. Бровко О.С., Ивахнов А.Д., Жильцов Д.В., Бойцова Т.А. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2023. Т. 18. № 1. С. 24.
31. Studzinska-Sroka E. Galanty A., Bylka W. // Mini Reviews in Medicinal Chemistry. 2017. Vol. 17. P. 1633.
32. Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. М., 1991. 320 с.
33. ГОСТ 16483.7-71. Древесина. Методы определения влажности. М., 2006. 4 с.
34. ГОСТ 28561-90. Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения сухих веществ или влаги. М., 2011. 76 с.
35. Waterman P.G., Mole S. Analysis of phenolic plant metabolites. L., 1994. 238 p.
36. Лобанова А.А., Будаева В.В., Сакович Г.В. // Химия растительного сырья. 2004. № 1. С. 47.
37. Храменкова О.М. // Бюллетень науки и практики. 2023. Т. 9. № 5. С. 18.
38. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. // Free Radical Biology and Medicine. 1999. Vol. 26. P. 1231.
39. Сиволодский Е.П. // Систематика и идентификация энтеробактерий. ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 2011. С. 21.
40. Храменкова О.М. // Бюллетень Брянского отделения РБО. 2017. № 1 (9). С. 50.
41. Бровко О.С., Слобода А.А., Жильцов Д.В., Бойцова Т.А., Пустынная М.А., Ивахнов А.Д. // Химия растительного сырья. 2023. № 4. С. 155.
42. Бровко О.С., Ивахнов А.Д., Бойцова Т.А., Жильцов Д.В. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2021. Т. 16. № 2. С. 11.
43. Страховская М.Г., Беленикина Н.С., Никитина В.В., Коваленко С.Ю., Коваленко И.Б., Аверьянов А.В., Рубин А.Б. // Клиническая практика. 2013. № 1. С. 25.
44. Zizovic I., Ivanovic J., Mistic D., Stamenic M., Djordjevic S., Kukic-Markovic J., Petrovic S.D. // J. Supercritical Fluids. 2012. Vol. 72. P. 7.
45. Müller K. // Applied Microbiology and Biotechnology. 2001. Vol. 56. № (1–2). P. 9.
46. Золотарёв П.Н. // Вестник СамГУ. Естественнонаучная серия. 2006. № 9 (49). С. 145.
47. Popovici V., Bucur L., Gird C.E., Popescu A., Matei E., Cozaru G.C., Schroder V., Ozon E.A., Fița A.C., Lupuliasa D., Aschie M., Caraiane A., Botnariuc M., Badea V. // Pharmaceuticals. 2022. Vol. 15 (829). P. 2.
48. Соловьева М.И., Кузьмин С.С. // Вестник СВФУ. 2022. № 1 (87) С. 11.
49. Rankovic B., Mistic M., Sukdolak S. // British J. biomedical science. 2007. Vol. 64 (4). P. 143.
50. Тапальский Д.В., Петренев Д.Р., Храменкова О.М., Дорошкевич А.С. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2017. № 2. С. 60.
51. Тапальский Д. В., Косенкова К.М. // Проблемы здоровья и экологии. 2018. Т. 58 (4) С. 52.

## **SUPERCritical FLUID EXTRACTION OF THE LICHEN THALLUS *HYPOGYMNINGIA PHYSODES***

**O.S. Brovko** — N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russia. ORCID: 0000-0002-1961-7831. E-mail: brovko-olga@rambler.ru

**A.D. Ivakhnov** — N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russia; Northern (Arctic) Federal University named after Lomonosov, Arkhangelsk, Russia. ORCID: 0000-0003-2822-9192. E-mail: ivahnov-tema@yandex.ru (*for correspondence*).

**D.V. Zhiltsov** — N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russia. ORCID: 0000-0002-1155-4135. E-mail: dnorton.usa@gmail.com

**T.A. Boitsova** — N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russia. ORCID: 0000-002-3899-7243. E-mail: tboitsova@yandex.ru

**A.A. Sloboda** — N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russia. ORCID: 0000-0002-1415-9050. E-mail: sloboda.iepn@yandex.ru

The process of supercritical fluid extraction of the thallus of the lichen species *Hypogymnia physodes* with carbon dioxide in the presence of acetone as a co-solvent has been studied. An assessment of extraction conditions (temperature, pressure and duration) on the yields of extract, phenolic compounds, including low molecular weight phenols, atranorine and flavonoids was carried out. It has been shown that the main amount of extractives (up to 90 %) is extracted within 40 minutes of extraction. The extract yield reaches 156.5 mg/g, with a content of phenolic compounds up to 87.3 %. The extracts obtained have high antiradical activity (up to 225 rmol Trolox-equiv/g). A positive correlation has been established between the antiradical activity of extracts and the content of phenolic compounds in them, including atranorine. Antibacterial activity of the extracts was revealed against gram-positive (*Bacillus subtilis*) and gram-negative (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*) strains of microorganisms.

**Key words:** *Hypogymnia physodes*, supercritical fluid extraction, low molecular weight phenols, flavonoids, atranorine, antibacterial activity.

## ACKNOWLEDGMENTS

The experimental part of the work on carrying out supercritical fluid extraction was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project No FSRU-2024-0004) using the equipment of the Center for Shared Use of the Scientific Research Institute «Arctic» (NAFU), research in analyzing the composition of the extracts was carried out with the support of the applied program research of the Ministry of Economic Development and Science of the Arkhangelsk Region (project No 123050500035-0) using the equipment of the Center for Shared Use of the KT RF-Arctic (FGBUN FITSKIA Ural Branch RAS).

## REFERENCES

1. Luzhanin V.G., Whaley A.K., Ponkratova A.O., Novikova V.V., Bezverkhnyaya E.A. // Razrabotka i registraciya lekarstvennyh sredstv. 2022. Vol. 11. No 2. P. 65 (*in Russ.*).
2. Konovalov D.A., Alieva N.M. // Farmaciya i farmakologiya. 2019. Vol. 7 (5). P. 244 (*in Russ.*).
3. Moiseev D.V. // Vestnik VSMU. 2014. Vol. 13. No 5. P. 130 (*in Russ.*).
4. Savelyeva E.E., Bulgakova N.A., Lapkina E.Z., Barankina T.A., Rukosueva T.V., Sukmanov V.A. // Mediko-farmaceuticheskij zhurnal «Pul's». 2020. Vol. 22. No 6. P. 99 (*in Russ.*).
5. Tapalsky D.V., Kosenkova K.M. // Problemy 'zdorov'ya i ekologii. 2018. No 4. P. 52 (*in Russ.*).
6. Khranchenokova O.M. // Vestnik VGU. 2017. No 3 (96). P. 80 (*in Russ.*).

7. Chervotkina D.R., Borisova A.V. // Izvestiya vuzov. Prikladnaya himiya i biotekhnologiya. Vol. 12. No 2. P. 254 (in Russ.).
8. Dubtsova G.N., Negmatulloeva R.N. // Chranenie i pererabotka sel'chozsy ŗya. 2011. No 4. P. 46 (in Russ.).
9. Shahidi F., Ambigaipalan P. // J.Functional Foods. 2015. Vol. 18. P. 820.
10. Smith A.H., Imlay J.A., Mackie R.I. // Applied and Environmental Microbiology. 2003. No 69. P. 3406.
11. Subramanian M., Goswami M., Chakraborty S., Jawali N. // Redox Biology. 2014. No 2. P. 865.
12. Cushnie T.P., Lamb A.J. // Intern. J. Antimicrobial Agents. 2005. No 26 (5). P. 343.
13. Eroshkin M.Yu., Kol'e L.-P., Bangura Zh. // Vestnik SPbGU. Ser. 3. 2005. No 4. P. 69 (in Russ.).
14. Zambulaeva N.D., Zhamsaranova S.D. // Izvestiya vuzov. Prikladnaya himiya i biotekhnologiya. 2018. No 1(8). P. 51 (in Russ.).
15. Belenky P., Ye J.D., Porter C.B., Cohen N.R., Lobritz M.A., Ferrante T., Jain S., Korry B.J., Schwarz E.G., Graham C.W., James J.C. // Cell Reports. 2015. No 13. P. 968.
16. Ravinskaya A.P. // Novosti sistematiki nizshikh rastenii. 1984. Vol. 21. P. 160 (in Russ.).
17. Ingolfsdottir K. // Phytochemistry. 2002. Vol. 61. No 7. P. 729.
18. Cocchiotto M., Skert N., Nimis P.L., Sava G. // Naturwissenschaften. 2002. Vol. 89. P. 137.
19. Mayer M., O'Neill M.A., Murray K., Santos-Magalhaes N.S., Carneiro-Leao A.M.A., Thompson A.M., Appleyard V.C.L. // Anticancer Drugs. 2005. Vol. 16. No 8. P. 805.
20. Sokolov D.N., Luzina O.A., Salakhutdinov N.F. // Russ. Chem. Reviews. 2012. Vol. 81. No 8. P. 747.
21. Stojanović G., Stojanović I., Stankov-Jovanović V., Mitić V., Kostić D. // Central European J. Biology. 2010. Vol. 5. P. 808.
22. Stojanović I.Z., Stanković M., Jovanović O., Petrović G., Smelcerović A., Stojanović G. // Natural Product Communications. 2013. Vol. 8. P. 109.
23. Curikov A.G., Korchikov E.S. Opredelitel' lishajnikov Samarskoj oblasti. Ch. 1. Listovatyje, kustistyje i slizistyje vidy: ucheb. Posobie. Samara: Izd-vo Samarskogo universiteta, 2018. 128 p. (in Russ.).
24. Konichev A.S., Fedorovsky N.N., Marakhova A.I., Baurin P.V., Yakubovich L.M., Chernikova M.A. // Vestnik MGOU. Seriya «Estestvennyje nauki». 2011. No 3. P. 49 (in Russ.).
25. Glazkov I.N., Revel'skij I.A., Kuz'yakin S.V., Kuznecov M.P., Bogdanov A.A., Martynov A.A., Efimov I.P., Zolotov Yu.A. // Sverhkriticheskie Flyuidy: Teoriya i Praktika. 2006. Vol. 1. No 1. P. 52 (in Russ.).
26. Brovko O.S., Palamarchuk I.A., Bojcovja T.A., Bogolicyn K.G., Val'chuk N.A., Ivahnov A.D. // Fundamentalnye issledovaniya. 2015. No 11. P. 659 (in Russ.).
27. Brovko O.S., Ivahnov A.D., Palamarchuk I.A., Boitsova T.A. // Russ. J. Phys. Chem. B. 2017. No 11. P. 1306.
28. Boitsova T.A., Brovko O.S., Ivahnov A.D., Zhiltsov D.V. // Russ. J. Phys. Chem. B. 2020. Vol. 14. No 7. P. 1135.
29. Brovko O.S., Ivahnov A.D., Zhiltsov D.V., Boitsova T.A. // Russ. J. Phys. Chem. B. 2022. Vol. 16. No 8. P. 1332.
30. Brovko O.S., Ivahnov A.D., Zhiltsov D.V., Boitsova T.A. // Russ. J. Phys. Chem. B. 2023. Vol. 17. No 7. P. 1519.
31. Studzinska-Sroka E., Galanty A., Bylka W. // Mini Reviews in Medicinal Chemistry. 2017. Vol. 17. P. 1633.
32. Obolenskaya A.V., El'nickaya Z.P., Leonovich A.A. Laboratornye raboty po himii drevesiny i cellyulozy. M., 1991. 320 p (in Russ.).
33. GOST 16483.7-71. Drevesina. Metody opredeleniya vlazhnosti. M., 2006. 4 p. (in Russ.).
34. GOST 28561-90. Produkty pererabotki plodov i ovoshchej. Metody opredeleniya suhikh veshchestv ili vlagi. M., 2011. 76 p. (in Russ.).
35. Waterman P. G., Mole S. Analysis of phenolic plant metabolites. L., 1994. 238 p.
36. Lobanova A.A., Budaeva V.V., Sakovich G.V. // Himiya rastitel'nogo syr'ya. 2004. No 1. P. 47 (in Russ.).
37. Hramchenkova O.M. // Byulleten' nauki i praktiki. 2023. Vol. 9. No 5. P. 18 (in Russ.).
38. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. // Free Radical Biology and Medicine. 1999. Vol. 26. P. 1231.

39. *Sivolodskij E.P.* // Sistematika i identifikaciya enterobakterij. FBUN NII epidemiologii i mikrobiologii imeni Pastera. 2011. P. 21 (*in Russ.*).
  40. *Hramchenkova O.M.* // Byulleten' Bryanskogo otdeleniya RBO. 2017. No 1 (9). P. (*in Russ.*).
  41. *Brovko O.S., Sloboda A.A., Zhil'cov D.V., Bojцова T.A., Pustynnaya M.A., Ivahnov A.D.* // Himiya rastitel'nogo syr'ya. 2023. No 4. P. 155 (*in Russ.*).
  42. *Brovko O.S., Ivahnov A.D., Boitsova T.A., Zhiltsov D.V.* // Russ. J. Phys. Chem. B. 2021. Vol. 15. No 8. P. 1273.
  43. *Strahovskaya M.G., Belenikina N.S., Nikitina V.V., Kovalenko S.Yu., Kovalenko I.B., Aver'yanov A.V., Rubin A.B.* // Klinicheskaya praktika. 2013. No 1. P. 25 (*in Russ.*).
  44. *Zizovic I., Ivanovic J., Mistic D., Stamenic M., Djordjevic S., Kukic-Markovic J., Petrovic S.D.* // J. Supercritical Fluids. 2012. Vol. 72. P. 7.
  45. *Müller K.* // Applied Microbiology and Biotechnology. 2001. Vol. 56. № (1–2). P. 9.
  46. *Zolotarev P.N.* // Vestnik SamGU. Estestvennonauchnaya seriya. 2006. No 9 (49). P. 145 (*in Russ.*).
  47. *Popovici V., Bucur L., Gîrd C.E., Popescu A., Matei E., Cozaru G.C., Schroder V., Ozon E.A., Fița A.C., Lupuliasa D., Aschie M., Caraiane A., Botnariuc M., Badea V.* // Pharmaceuticals. 2022. Vol. 15 (829). P. 2.
  48. *Solov'eva M.I., Kuz'min S.S.* // Vestnik SVFU. 2022. No 1 (87). P. 11 (*in Russ.*).
  49. *Rankovic B., Mistic M., Sukdolak S.* // British J. Biomed Sci. 2007. Vol. 64 (4). P. 143.
  50. *Tapal'skij D.V., Petrenev D.R., Hramchenkova O.M., Doroshkevich A.S.* // Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii. 2017. No 2. P. 60 (*in Russ.*).
  51. *Tapal'skij D.V., Kosenkova K.M.* // Problemy zdorov'ya i ekologii. 2018. Vol. 58. No 4. P. 52 (*in Russ.*).
- 
-