

РОЗДІЛ І. ГЕНЕТИКА, ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН ТА ПРИКЛАДНА БОТАНІКА

УДК 582.751.42: 577.112

ОПТИМІЗАЦІЯ ВИДІЛЕННЯ ЛЕКТИНОПОДІБНИХ БІЛКІВ ЛИСТЯ ЛЬОНУ ОЛІЙНОГО

Левчук Г.М., аспірант, Войтович О.М., к.б.н., доцент

Запорізький національний університет

Запропоновано оптимізацію методики виділення лектиноподібних білків листя льону олійного різної клітинної локалізації. Виділення грубого лектинового екстракту проводили шляхом гомогенізації виділених клітинних фракцій із 0,02 М калій-фосфатним буферним розчином із додаванням сахарози, аскорбінової кислоти та ЕДТА. Розділення органел, цитозолу та клітинних стінок проводили шляхом фракційного центрифугування гомогенату. Виділення лектинів з мембран та клітинних стінок проводили за допомогою додавання детергенту Тритону Х-100. Очищення лектинового екстракту від небілкових домішок проводили за допомогою осадження сульфатом амонію. Очищення екстракту від нелектинових білків проводили за допомогою 60 % насичення ацетоном. Встановлено, що найбільшу чутливість лектини льону проявляють до еритроцитів кроля. У зв'язку з цим запропоновано використовувати в якості тест-об'єкта при визначенні гемаглютинуючої активності лектинів льону олійного трипсинизовані еритроцити кроля. Показана залежність характеристик лектинів від клітинної локалізації та генотипу.

Ключові слова: *Linum humile Mill, лектинова активність, вуглеводна специфічність, еритроцити, фракційне центрифугування, очищення екстрактів.*

Левчук А.Н., Войтович Е.Н. ОПТИМІЗАЦІЯ ВИДЕЛЕНИЯ ЛЕКТИНОПОДОБНЫХ БЕЛКОВ ЛИСТЬЕВ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО / Запорожский национальный университет, Украина.

Предложена оптимизация методики выделения лектиноподобных белков листьев льна масличного различной клеточной локализации. Выделение грубого лектинового экстракта проводили путем гомогенизации выделенных клеточных фракций с 0,02 М калий-фосфатным буферным раствором с добавлением сахарозы, аскорбиновой кислоты и ЭДТА. Разделение органеллы, цитозоля и клеточных стенок проводили путем фракционного центрифугирования гомогената. Выделение лектинов из мембран и клеточных стенок проводили с помощью добавления детергента Тритон Х-100. Очистку лектинового экстракта от небелковых примесей проводили с помощью осаждения сульфатом аммония. Очистку экстракта от нелектиновых белков проводили с помощью 60% насыщения ацетоном. Установлено, что наибольшую чувствительность лектины льна проявляют к эритроцитам кролика. В связи с этим предложен как тест-объект при определении гемагглютинирующей активности лектинов льна масличного трипсинизированные эритроциты кролика. Показана зависимость характеристик лектинов от клеточной локализации и генотипа.

Ключевые слова: *Linum humile Mill, лектиновая активность, углеводная специфичность, эритроциты, фракционное центрифугирование, очистка экстрактов.*

Levchuck A.M., Voitovych O.M. OPTIMIZATION OF THE ALLOCATION LECTINS OF LEAVES OIL SEED / Zaporizhzhya national university, Ukraine.

Proposed optimization method selection lectin proteins leaves of flax oil with different cellular localization. Isolation of rough lectin extract performed by homogenization of isolated cell fractions with 0.02 M potassium phosphate buffer solution with added sucrose, ascorbic acid and EDTA. Separation of organelles, cytosol and cell walls were carried out by fractional centrifuging homogenate. Isolation of lectins of membranes and cell walls were carried out by adding detergent Triton X-100. Cleaning lectin extract from non-protein impurities was carried out using ammonium sulfate precipitation. Purification of extract from alectin proteins was carried out using 60% acetone saturation. Found that the flax that lectins are most sensitive to red blood cells of rabbit. In this regard, proposed as a test object for determining the hemagglutinating activity of

lectins linseed trypsinized rabbit erythrocytes.. Dependence of characteristics of lectins from cellular localization and genotype.

Key words: *Linum humile Mill, lectins activity, carbohydrate specificity, erythrocytes, fractional centrifugation, purification of extracts.*

ВСТУП

До лектинів та лектиноподібних білків відносять білки або глікопротеїни, які здатні розпізнавати та зворотньо зв'язувати вуглеводи, що розташовані на клітинних поверхнях [1, 2]. Загально відомо, що склад цих вуглеводів під впливом ендо- або екзогенних факторів може суттєво змінюватись, і на цю зміну (завдяки своїй біологічній активності) миттєво реагують лектини, які зв'язуються з новими вуглеводами та змінюють при цьому свою конформацію, інформація про яку надходить у геном і рослина таким чином реагує на зміну умов [1].

Завдяки цьому фізіологічна роль лектинів у рослині дуже різноманітна: встановлена їх участь у процесах захисту насіння від патогенів при проростанні [2], упізнання клітин при диференціації, розпізнанню пилку при запиленні [1], формування адаптаційної стійкості при зміні умов оточуючого середовища [3], у фотоперіодичній адаптації та цвітінні рослин [1]. Визначена роль лектинів у світловій фазі фотосинтезу [4] та в процесі розкладу складних органічних речовин до неорганічних (дихання) [5].

Така багатофункціональність передбачає наявність певного лектинового складу клітини. Тому за локалізацією в клітині лектини поділяють на три групи: мембранні (розташовані в мембранах), розчинні (знаходяться в цитозолі та вакуолярному соці) та лектини клітинних стінок [2].

Існуючі методи виділення лектинів не завжди підходять при залученні до роботи нових об'єктів і часто потребують модифікації. Так, льон олійний у всіх органах (навіть вегетативних) містить достатньо багато слизу, який часто заважає чи взагалі робить неможливим певне біохімічне дослідження. Крім того, завжди актуальним є можливе спрощення методики, яке б суттєво не погіршувало результат, а робило процес аналізу доступнішим.

Метою нашої роботи була оптимізація методики виділення лектиноподібних білків для листя льону олійного.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження було листя льону олійного сортів Антарес, Ціан та Айсберг.

Отриманий із листя гомогенат розподіляли на 3 фракції відповідно до можливої локалізації лектинів (мембранні структури, цитозоль та клітинні стінки) за стандартною методикою [6] з певною модифікацією (змінений склад екстракційного буферного розчину).

Для цього наважку листя (0,5 г) гомогенізували в присутності піску та карбонату кальцію з 8 мл 0,02 М калій-фосфатного буферного розчину (рН 6,8) з додаванням 0,35 М сахарози, 0,1 М аскорбінової кислоти та 0,01 М ЕДТА. Для відокремлення клітинних стінок віджимали отриману суспензію крізь 2 шари лляної тканини. Осад клітинних стінок (залишок після віджимання) гомогенізували з 5 мл того ж буферного розчину, але з рН 4,0 та з додаванням 0,9 % хлориду натрію та 0,05 % детергенту Тритон X-100 і залишали для екстракції на 12 годин при температурі +4 °С. Після чого центрифугували протягом 15 хвилин при 10 000 g. Супернантант (фракцію, збагачену лектинами клітинних стінок) використовували для подальшого аналізу.

Для відділення органел суспензію, яка залишилася після вилучення клітинних стінок, центрифугували 5 хвилин при 100 g, при цьому цілі клітини та шматочки клітин випадають у осад, а надосадова рідина містить органели. Отриманий супернантант

піддавали центрифугуванню протягом 15 хвилин при 10 000 g для відділення органел, переважна більшість яких при цьому переходять в осад, а надосадова рідина містить розчинені в цитозолі та вакуолярному соці речовини. Отримані таким чином фракції використовували для екстракції лектинів.

Для виділення лектинів з мембран органел осад гомогенізували з 0,5 мл вихідного калій фосфатного буферного розчину (рН 6,8) з додаванням 0,05 % Тритону X-100 і залишали для екстракції на 20 хвилин. Отриману суспензію центрифугували в тому ж режимі (15 хвилин при 10 000 g), при цьому надосадова рідина містила мембранні лектини.

З отриманих розчинів (клітинних стінок, мембран органел та цитозолу) білки концентрували висоловванням 70 % сульфатом амонію та очищали шляхом осадження при 60 % насичені ацетону [7].

Отримані екстракти лектиноподібних речовин характеризували за двома параметрами: кількісним (лектинова активність) та якісним (вуглеводна специфічність).

Активність лектиноподібних білків визначали за допомогою реакції гемаглютинації. Для цього були використані 5 типів еритроцитів: людини з різною групою належністю (I, II, III та IV групи крові) та кроля. Усі еритроцити піддавали трипсинізації для збільшення чутливості до лектинів – звільнення вуглеводів у складі рецепторів від інших речовин [2]. Реакцію гемаглютинації проводили в планшетах із U-подібними лунками об'ємом 2 мкл кожна. Результати оцінювали візуально та реєстрували за 60-120 хвилин [3].

Вуглеводну специфічність лектиноподібних білків визначали стандартним методом за допомогою пригнічення гемаглютинації окремими вуглеводами [2]. Дослідження проводились у п'ятикратному повторенні. Статистичну обробку отриманих експериментальних даних проводили за загально прийнятими методами [9].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Загально визнаним методом виділення лектинів із рослинного матеріалу є екстракція цих білків сольовим розчином, встановлення вуглеводної специфічності та очищення екстрактів від домішок за допомогою афінної хроматографії [1, 2]. Застосування інших методів очищення не дозволяє отримати чистий препарат лектину, тому можна говорити лише про фракцію лектиноподібних білків.

Останнім часом було встановлено, що лектини розташовуються в різних частинах клітини, де виконують певні функції. Так, лектини мембран хлоропластів беруть участь у процесі фотосинтезу [4], лектини мітохондрій – у процесі дихання [5], розчинні лектини є сигнальними молекулами та приймають участь в адаптації рослин [3], а лектини цитоплазматичної мембрани є ланкою захисної реакції від патогенів [10].

Отже, завданням нашого дослідження було отримання лектиноподібних білків різних клітинних фракцій листя льону олійного. Рослинні клітини містять целюлозну клітинну стінку, завдяки якій біохімічні дослідження з рослинами є більш складними, ніж з іншими організмами. Для вивільнення компонентів рослинної клітини спочатку треба провести мацерацію – порушення структури клітинної стінки [11]. Цю процедуру зазвичай проводять або механічно – шляхом гомогенізації тканини з абразивним компонентом (наприклад, із піском), або хімічним шляхом (у кислому середовищі). У нашому випадку потрібно зберегти активність лектинів внутрішньоклітинних компартментів, тому мацерацію проводили механічним шляхом із додаванням карбонату кальцію для нейтралізації кислого вмісту клітинного соку листя.

За результатами відомих експериментальних досліджень [10, 12, 13] лектини з різних клітинних фракцій пропонується екстрагувати після фракційного центрифугування і

розділення тканини на клітинні компартменти. Для цього використовують 0,02 М калій-фосфатний буферний розчин (рН 6,8), що містить 0,2 – 0,36 М сахарози; 0,01 М ЕДТА або 0,05 мМ фенілметилсульфонілфторид та 0,1 М аскорбінової кислоти або 1,5 мМ дитіотрейтолу. Сахароза створює потрібний осмотичний тиск для того, щоб органели залишалися цілими, аскорбінова кислота або дитіотрейтол діють як антиоксиданти, попереджаючи необоротне окислення, а ЕДТА або фенілметилсульфонілфторид попереджують утворення фенолів, які також можуть порушувати цілісність мембран [8].

Відповідно до об'єкта дослідження – листя льону олійного нами експериментально був підібраний наступний склад екстракційного розчину: 0,02 М калій-фосфатний буферний розчин (рН 6,8) з додаванням 0,35 М сахарози, 0,1 М аскорбінової кислоти та 0,01 М ЕДТА.

Фракційне центрифугування здійснювали за встановленою методикою [13] із деякими модифікаціями. Так, шляхом мікроскопування суспензій було встановлено, що після відділення клітинних стінок суспензія містить багато мацерованих цілих клітин та шматочків тканин, тому після віджимання її відстоювали протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. При цьому осідають та утворюють осад непорушені ділянки мезофілу, які відокремлювали центрифугуванням протягом 5 хвилин при 100 г. Клітинні фракції натомість залишаються у супернантанті. Центрифугування останнього при 10 000 г протягом 15 хвилин [13], сприяє переходу в осад більшості основних крупних органел (ядро, пластиди та мітохондрії), а надосадова рідина містить переважно цитозоль та вакуолярний сік.

З отриманих розчинів (клітинних стінок, мембран органел та цитозолу) лектиноподібні білки концентрували та очищали від небілкових домішок (у тому числі і від слизу) шляхом висалювання білків при 70 % насичені сульфатом амонію (0,5 г цієї солі на 1 мл розчину). При цьому білки піддаються зворотній денатурації та випадають в осад, який розчиняли в 0,4 мл 0,9 % розчину хлориду натрію. Небілкові домішки в розчин не переходять. Отримані розчини додатково очищали від нелектинових білків шляхом осадження при 60 % насичені ацетону (2 частини ацетону на 1 частину розчину лектину). Лектини є стійкими до такої високої концентрації ацетону, і при розчиненні осаду у фізіологічному розчині відновлюють свою початкову структуру. Решта білків при такій концентрації ацетону остаточно денатурує [7].

У результаті досліджень було встановлено (табл. 1), що лектини льону олійного є специфічними до IV групи крові людини, оскільки титр аглютинації є найвищим при використанні еритроцитів людини саме цієї групи крові. У залежності від генотипу льону та клітинної локалізації він складає 1:4 – 1:16. При використанні еритроцитів I та II груп крові аглютинація взагалі не спостерігається, а при використанні еритроцитів III групи складає 1:0 – 1:2. Такий показник активності є безумовно слабким та може виявитися недостатньо специфічним для проведення порівняльного аналізу за сортами чи фракціями. Тому не може бути рекомендований для використання.

Найчутливішими до лектинів льону олійного виявилися еритроцити кроля, титр аглютинації при використанні яких як мінімум у 1000 разів вищий, ніж при використанні еритроцитів людини IV групи та становить від 1:4064 до 1:16254. Показово, що обрані для аналізу генотипи льону мають схожі показники лектинової активності, а відмінності між клітинними фракціями мають однаковий характер при використанні як еритроцитів IV групи крові людини, так і кроля.

Отримані нами дані стосовно більш високого титру аглютинації при використанні трипсинизованих еритроцитів кроля в порівнянні з еритроцитами людини знаходять своє підтвердження і в роботах інших авторів [1, 14]. Так, при тестуванні лектинів різного походження Антонюк В.О. встановив, що еритроцити кроля є більш

перспективними в порівнянні з еритроцитами людини для багатьох рослинних лектинів, особливо для представників родин бобових та злакових, які відносяться до групи манозоспецифічних лектинів, оскільки рецептори еритроцитів кроля містять багато манози [14]. Взагалі як тест-об'єкт при визначенні гемаглютинуючої активності еритроцити кроля займають 2 місце після еритроцитів коня [1].

Таблиця 1 – Титр аглютинації лектинів листя льону олійного в залежності від типів еритроцитів.

№ п/п	генотип льону	клітинна фракція	Титр аглютинації				
			еритроцити людини				еритроцити кроля
			I група	II група	III група	IV група	
1.	Антарес	мембрани	-	-	1:1	1:8	1:8128
		цитозоль	-	-	1:2	1:16	1:16254
		клітинні стінки	-	-	1:0	1:4	1:4064
2.	Циан	мембрани	-	-	1:0	1:4	1:4064
		цитозоль	-	-	1:1	1:8	1:8128
		клітинні стінки	-	-	1:0	1:4	1:4064
3.	Айсберг	мембрани	-	-	1:0	1:4	1:4064
		цитозоль	-	-	1:1	1:8	1:8128
		клітинні стінки	-	-	1:2	1:16	1:16254

Тому в подальшому для вивчення характеристик лектиноподібних білків льону нами використовувалися саме трипсинизовані еритроцити кроля.

Для визначення вуглеводної специфічності отриманих екстрактів лектиноподібних білків були обрані 10 D-ізомерів вуглеводів, шість із яких були моносахаридами (галактоза, глюкоза, маноза, арабіноза, ксиліоза та фруктоза), три – дисахаридами (сахароза, мальтоза та лактоза) та аміносахарид глюкозамін.

Взагалі вуглеводна специфічність багатьох лектинів є показником із досить низьким рівнем чутливості. Загальновідомим є той факт, що проявляється специфічність не до певного вуглеводу, а до основних груп: D-галактози, D-манози, L-фукози та L-ксиліози. Ця класифікація оснований на цис- або транс-положенні гідроксильних груп при 3 та 4 атомах вуглецю. Так, D-ізомери з цис-положенням цих гідроксильних відносяться до групи D-галактози, а з транс-положенням - D-манози. L-ізомери з цис-положенням відносяться до групи L-фукози, а з транс-положенням - L-ксиліози. Отже, до групи D-манози з обраних вуглеводів входять глюкоза, глюкозамін, сахароза, фруктоза, ксиліоза та мальтоза; а галактоза, арабіноза та лактоза – до групи D-галактози [1, 2].

Як видно з таблиці 2, незалежно від генотипу та клітинної локалізації всі лектини здатні розпізнавати арабінозу, яка відноситься до групи D-галактози. Це можна пояснити тим фактом, що слиз, який міститься у всіх клітинах льону, має великий вміст цього вуглеводу [15].

Отже, виділені нами лектиноподібні білки, є галактозоспецифічними. Крім того, у залежності від генотипу спостерігається додаткова специфічність. Так, лектини льону сорту Антарес окрім арабінози, здатні розпізнавати манозу та глюкозамін, сорту Циан – глюкозу та мальтозу, а сорту Айсберг – глюкозу, маннозу та глюкозамін. Усі ці

вуглеводи належать до групи D-манози, що може свідчити як про наявність у комплексі виділених лектиноподібних речовин також групи манозоспецифічних, так і про генотипово зумовлені відмінності у складі цих комплексів.

Таблиця 2 – Вуглеводна специфічність лектинів листя льону олійного

№ п/п	вуглевод	Група вуглеводів	Сорт льону								
			Антарес			Циан			Айсберг		
			мембрани	цитозоль	клітинні стінки	мембрани	цитозоль	клітинні стінки	мембрани	цитозоль	клітинні стінки
1.	манноза	D-маноза	+	+	+	0	0	0	+	+	+
2.	глюкоза		+	0	0	+	+	+	+	+	+
3.	фруктоза		0	+	0	0	+	0	0	0	0
4.	ксилоза		0	0	+	0	0	+	0	0	+
5.	глюкозамін		+	+	+	0	0	+	+	+	+
6.	мальтоза		0	0	0	+	+	+	0	0	0
7.	сахароза		0	+	0	0	+	0	0	+	0
8.	галактоза	D-галактоза	+	0	0	+	0	0	+	+	0
9.	арабіноза		+	+	+	+	+	+	+	+	+
10.	лактоза		+	0	0	+	0	0	+	0	0

Примітка:

«+» – здатність розпізнавати лектином даний вуглевод;

«0» – лектин не розпізнає даний вуглевод.

Простежується також залежність вуглеводної специфічності лектиноподібних речовин від клітинної фракції. Так, мембранні лектини, окрім арабінози, здатні розпізнавати галактозу, лактозу та глюкозу, лектини цитозолю – сахарозу та фруктозу, а лектини клітинних стінок ксилозу та глюкозамін. Подібні відмінності у властивостях свідчать на користь специфічності функціонування лектинів різних частин клітини.

У подальшому планується дослідити зміни характеристик лектиноподібних білків протягом онтогенезу в різних органах льону олійного.

ВИСНОВКИ

1. Оптимізовано методику виділення лектиноподібних білків для листя льону олійного. Пропонується екстрагувати лектиноподібні білки з різних клітинних фракцій 0,02 М калій-фосфатним буферним розчином (рН 6,8) з додаванням 0,35 М сахарози, 0,1 М аскорбінової кислоти та 0,01 М ЕДТА; концентрацію та очистку екстракту проводити за допомогою висолювання сульфатом амонію та осадження ацетоном.
2. Екстракція лектиноподібних білків із різних клітинних фракцій дозволяє вивчати їх властивості та відмінності з урахуванням фізіологічної ролі. Для оптимізації розділення на клітинні фракції пропонується проводити фракційне центрифугування гомогената після механічного відділення клітинних стінок та наступного відокремлення непошкоджених клітин шляхом додаткового центрифугування.
3. Встановлено, що лектини льону проявляють найбільшу чутливість до еритроцитів кроля, а також є специфічними до еритроцитів 4 групи крові людини. У зв'язку з цим запропоновано використовувати як тест-об'єкт при визначенні

гемаглютинуючої активності лектинів льону олійного трипсинизовані еритроцити кроля.

4. Виявлено, що листя льону містить лектиноподібні білки з яскраво вираженою специфічністю до арабінози, тому їх віднесено до групи галактозоспецифічних. Показана залежність вуглеводної специфічності лектинів як від генотипу, так і від клітинної локалізації.

ЛІТЕРАТУРА

1. Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела / В.О. Антонюк. – Львів: Вид-во ПП «Кварт», 2005. – 554 с.
2. Луцик М.Д. Лектины / М.Д. Луцик, В.М. Панасюк, А.Д. Луцик – Львов: Вища школа, 1981. – 156 с.
3. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и её регуляция. / Ф.М. Шакирова – Уфа: Гилем, 2001. - 160 с.
4. Алексидзе Г. Я. Модель организации на мембране тилакоидов комплекса ферментов цикла кальвина с участием лектина фотосистемы I / Г.Я. Алексидзе, А. И. Литвинов, Э.И. Выскребенцева // Физиология растений. – 2002. – Т. 49, № 1 – С. 155-159.
5. Борисова Н.Н. Субмитохондриальное распределение лектиновой активности в осевых органах проростков кормовых бобов разного возраста / Н.Н. Борисова, Э.И. Выскребенцева // Физиология растений. – 1997. – Т. 44, № 3. – С. 331 – 337.
6. Алексидзе Г.Я. Выделение лектинов и их возможных рецепторов из корнеплода сахарной свеклы / Г.Я. Алексидзе, Н.П. Королёв, И.Л. Семёнов, Э.И. Выскребенцева // Физиология растений. – 1983. – Т. 30, № 6. – С. 1069 – 1076.
7. Скоупс Р. Методы очистки белка / Р. Скоупс; [пер. с англ. В.К. Антонова]. – М.: Мир, 1985. – 358 с.
8. Справочник биохимика / [Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.]; пер. с англ. В.Л. Друца, О.Н. Королёв. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 351 с.
10. Бабоша А.В. Действие α -интерферона человека и вирусной инфекции на активность фитогемагглютининов и другие показатели в листьях растений табака и картофеля / А.В. Бабоша // Физиология растений. – 1995. – Т.42, № 6. – С. 891 – 898.
11. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы / [Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г. и др.]. – М.: МГУ, 2004 – 312 с.
12. Тимофеева О.А. Индуцированные модификаторами цитоскелета изменения активности лектинов при адаптации растений к низким температурам и обработке АБК / О.А. Тимофеева, Л.П. Хохлова, Т.В. Трифонова и др. // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 2. – С. 181 – 186.
13. Комарова Э.М. Активность лектиноподобных белков клеточных стенок и внешних мембран органелл и их связь с эндогенными лигандами в проростках озимой пшеницы при холодной адаптации / Э.М. Комарова, Э.И. Выскребенцева, Т.И. Трунова // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 4. – С. 511 – 516.
14. Антонюк В.А. Использование эритроцитов, хранившихся при умеренно низких температурах, для поиска лектинов и оценки их активности / В.А. Антонюк // Проблемы криобиологии. – 1994, № 3. – С. 50 – 55.
15. Оленников Д.Н. Исследование процесса экстракции полисахаридов семян льна (*Linum usitatissimum L.*) / Д.Н. Оленников, Л.М. Тапхаева // Химия растительного сырья. – 2007. – № 4. – С. 79 – 83.