

КЛАССИФИКАЦИЯ НОВОГО НАТИВНОГО БАКТЕРИОЦИНА НА ОСНОВЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК

Н. В. Мерзлякова, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова, Е. А. Улитина

При фракционировании биомассы *Lactobacillus lactis* с помощью флеш-хроматографии выделено 3 белковые фракции, которым даны условные наименования N1, N2, N3. Установлено, что образец N1 относится к бактериоцину I класса, так как состоит из 49 остатков аминокислот и имеет молекулярную массу 2114 Да. При идентификации полипептида по геномной базе данных противомикробных пептидов совпадений не установлено. Исследование аминокислотной последовательности позволило предположить, что полипептид обладает антимикробными свойствами. Установлено, что изоэлектрическая точка пептида находится в кислой среде – 4,81, уровень гидрофильности составляет +43,88 ккал·моль⁻¹, Индекс Бомана – 1,74 ккал/моль, заряд – 1, что подтверждает его антимикробные свойства. В эксперименте *in vitro* доказано, что пептид N1 обладает антимикробным действием в отношении *E. coli* ATCC 25922 и *B. Subtilis*. В результате исследований получен новый пептид, который классифицируется как антимикробный альфа-спиральный анионный бактериоцин I а класса – лантибиотик.

Ключевые слова: бактериоцин, пептид, антибактериальная активность, аминокислоты, заряд, молекулярная масса, лантибиотик.

Бактериоцины, полученные *in vitro*, являются безопасными, не имеют цвета, запаха, вкуса, устойчивы к низкому рН, высоким температурам [1], что позволяет их использовать в качестве биоконсервантов в различных пищевых продуктах в виде чистых препаратов или культур молочнокислых бактерий, продуцирующих низин [2].

Бактериоцины вводят в состав упаковки для увеличения срока годности пищевой продукции, что позволяет избежать прямого применения бактериоцинов в рецептуре пищевых продуктов и, соответственно, удовлетворить спрос потребителей на продукты без пищевых добавок консервирующего действия [3].

По данным [4], упаковка, покрытая бактериоцином, проявляет эффективную антилистерийную активность и значительно снижает количество листерий в мясе, искусственно зараженном *L. monocytogenes*.

Согласно классификации, разработанной авторами [5], бактериоцины с учетом следующих показателей: первичная структура, молекулярная масса, функция, модификация, содержание, количество и последовательность аминокислот, механизм действия можно разделить на три основных класса: I, II и III. К I классу

относятся нативные синтезированные рибосомами и модифицированные бактериоцины, модифицированные после трансляции пептиды. Бактериоцины I класса термостабильны, имеют молекулярную массу менее 10 кДа и в некоторых случаях пептидные цепочки с необычными аминокислотами, в частности, лантioniном, β-лантioniном, β-метиллантioniном и другими, которые определяют молекулярную структуру и свойства, например, циклизацию и гликозилирование [6–8].

Бактериоцины класса I разделены на 6 подклассов. Подкласс I а – лантибиотики или лантипептиды, подкласс I б, которые представляют собой круглые пептиды от головы до хвоста или циклизированные пептиды, подкласс I с состоит из сактибиотиков или сактипептидов, подкласс I д – линейные пептиды, подкласс I е – гликозилированные бактериоцины или гликоцины и подкласс I ф – пептиды лассо [5].

Низин и энтероцин AS-48 относятся к бактериоцинам I а и I б подклассов. Бактериоцины класса II представляют собой небольшие (< 10 кДа) термостабильные немодифицированные пептиды, которые не содержат необычных аминокислот. Бактериоцины II класса дополнительно подразделяются на 4 подкласса [9].



Авторы [10] утверждают, что бактериоцины класса II а являются пептидами, состоящими из 35–50 аминокислотных остатков и 1 или 2 цистиновых мостиков (дисульфидные связи). Бактериоцины этого класса содержат дисульфидную связь, N-концевую область β -листа, α -спираль и C-концевой гидрофильный и амфифильный конец, в частности, YGNGVXC [1].

Бактериоцины II б класса относятся к двухпептидным немодифицированным бактериоцинам, которым для проявления полной антимикробной активности необходимы два разных пептида. Такие пептиды имеют низкую антибактериальную активность при индивидуальном тестировании и проявляют синергетическую активность [11].

Бактериоцины класса II с или пептиды без лидера – это бактериоцины, которые синтезируются в виде активных пептидов без N-концевой лидерной последовательности [12].

Класс II d представляет собой разнообразную группу немодифицированных, линейных, непептидоподобных бактериоцинов с различными структурами, механизмами секреции и антимикробными способами действия [13]. В этих бактериоцинах отсутствует последовательность, характерная для пептидоцинов [14].

Бактериоцины III класса представляют собой термостойкие и неферментативно модифицированные бактериоцины с молекулярной массой более 10 кДа [15].

Продуцентами бактериоцинов являются бактерии, принадлежащие к родам *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* и *Weissella*. Бактериоцины, продуцируемые различными или одними штаммами бактерий, могут значительно отличаться друг от друга ингибирующим спектром, молекулярной массой и физико-химическими свойствами и, соответственно, могут относиться к разным классам [16].

Цель работы – выделение и классификация бактериоцина, продуцируемого *Lactobacillus lactis*.

Материалы и методы исследования

Для продуцирования бактериоцина в эксперименте использован замороженный инокулят – культура *Lactobacillus lactis*, которую хранили в пробирке с агаром при температуре $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Культуру активировали в 5,0 мл стерильной пробирке с питательной средой MRS, выдержанной в инкубаторе при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение

48 часов. Затем культуру переносили в стерильную пробирку с 10,0 мл MRS и выдерживали в инкубаторе при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ еще 48 часов. Затем 5,0 мл этого инокулята переносили в 45,0 мл бульона MRS в стерильную колбу Эрленмейера объемом 125,0 мл и снова инкубировали при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 48 часов. Впоследствии этот объем был перенесен в 450,0 мл бульона MRS, в результате чего получилось 500,0 мл, в колбу Эрленмейера объемом 1,0 л. Его выдерживали в шейкере при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ с вращением 150 об/мин в течение 30 часов для активации штамма перед ферментацией в биореакторе.

Для ферментации использовали среду MRS. Ферментацию проводили в течение 24 часов с помощью лабораторного ферментера Minipro-Lab производства компании «Биотехно». Процесс ферментации проводили при температуре $43\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, при перемешивании 200 об/мин и pH 6,5, которую поддерживали 5 М раствором NaOH с помощью насоса. Ферментацию проводили в анаэробных условиях.

Для выделения бактериоцина из биомассы использовали метод высаливания с помощью сульфата аммония. Полученные образцы обрабатывали ультразвуковым диспергатором и растворяли в дистиллированной воде. Затем к раствору образцов добавляли сульфат аммония до насыщения раствора 80% и оставляли его выдерживаться при комнатной температуре на 24 ч. Полученный бактериоцин отделяли центрифугированием при скорости ротора 8000 об/мин в течение 15 минут. Далее проводили ресуспензирование белков в фосфатном буфере (pH 6,8). Для дополнительной очистки от солей проводили диализ с отсечкой по массе 10 кДа.

Фракционирование бактериоцина осуществляли флеш-хроматографией (BUCHI, Германия), в градиентном режиме, элюэнт 1 буфер TAE (pH = 8,3), элюэнт 2 – TAE+2% NaCl. Пики детектировали с помощью УФ-детектора при длинах волн: UV1 – 230 нм, UV2 – 254 нм, UV3 – 270 нм, UV4 – 280 нм. Идентификацию полученного пептида проводили по геномным базам данных Protein NCBI и APD. Для выделенных фракций определяли молекулярную массу на масс-спектрометре AmaZon SL-Bruker (Bruker, Германия), а аминокислотную последовательность изучали с помощью программы Bruker Wiewer и базы данных Mascot.

Моделирование пространственной структуры бактериоцина осуществляли с помощью

программы молекулярного моделирования Schrodinger Maestro (США).

Антимикробную активность бактериоцина исследовали диско-диффузионным методом на грамположительных и грамотрицательных бактериях. В качестве тест-штаммов выбраны *Escherichia coli* и грамположительная бактерия *Bacillus subtilis*. В качестве контроля использовался бумажный диск с питательной средой, в качестве препарата сравнения – диск с антибиотиком (Канамицин из стандартного набора). Чашки Петри инкубировали при температуре, соответствующей оптимальной температуре роста каждого тест-штамма микроорганизма, в течение $24,0 \pm 0,5$ ч. Результаты учитывались по наличию и размеру (в мм) прозрачной зоны отсутствия роста микроорганизмов вокруг диска.

Результаты и обсуждение

Результаты фракционирования представлены на рисунке 1.

При фракционировании с помощью флеш-хроматографии выделено 3 белковые фракции, которым даны условные наименования N1, N2, N3.

На рисунке 2 представлены масс-спектры образцов белковых молекул: а – фракция N1; б – фракция N2; в – фракция N3.

Результаты определения молекулярной массы и аминокислотная последовательность представлены в таблице 1.

Из данных таблицы 1 следует, что образец N1 относится к бактериоцину, так как состоит из 49 остатков аминокислот (менее 50) и имеет молекулярную массу 2114 Да (менее 10 000 Да). Фракции N1 и N2 следует отнести к белкам, так как состоят из более 50 аминокислот. Следовательно, для дальнейшего исследования физико-химических характеристик, антимикробных свойств, присущих бактериоцину и последующей его классификации, использовали образец N1.

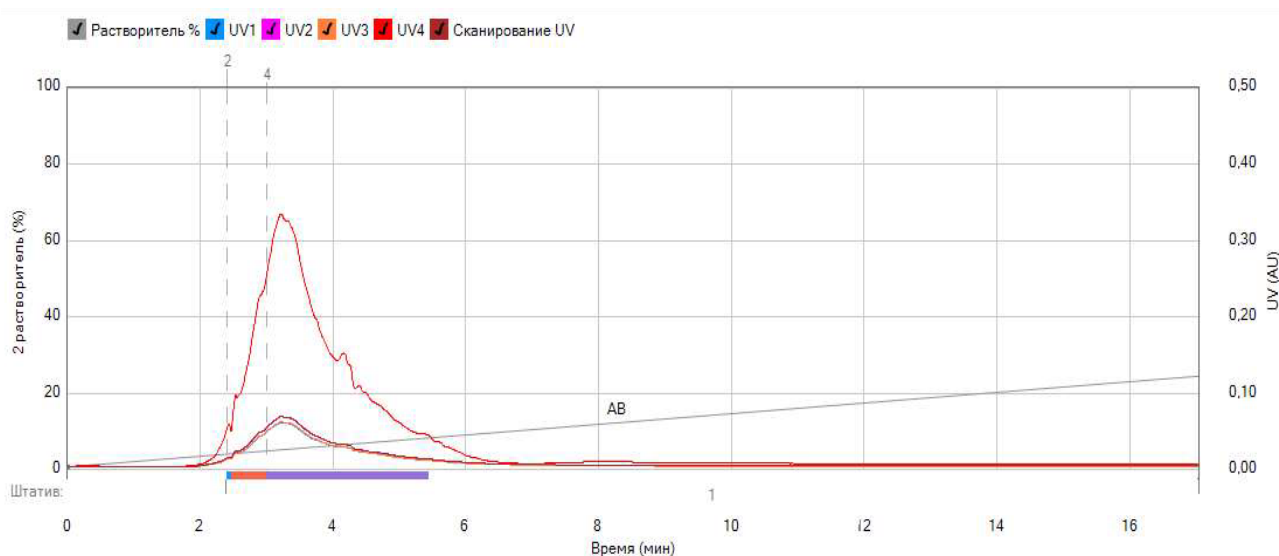
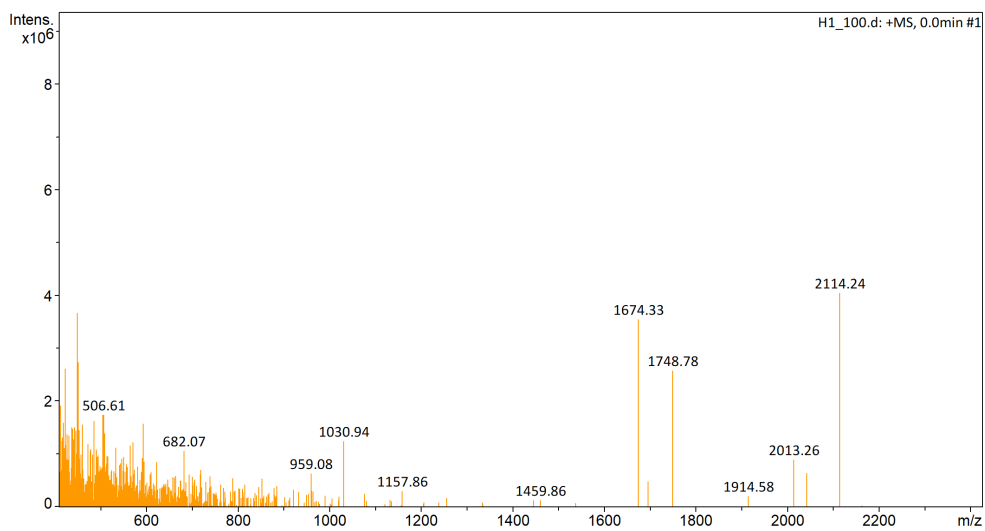


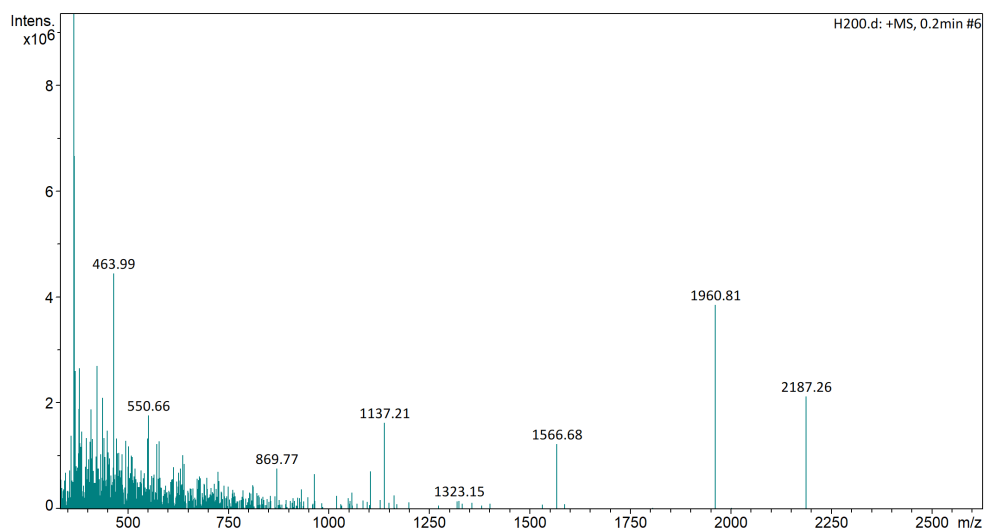
Рис. 1. Фракционирование образца раствора белковых молекул

Таблица 1 – Характеристика фракций белковых молекул

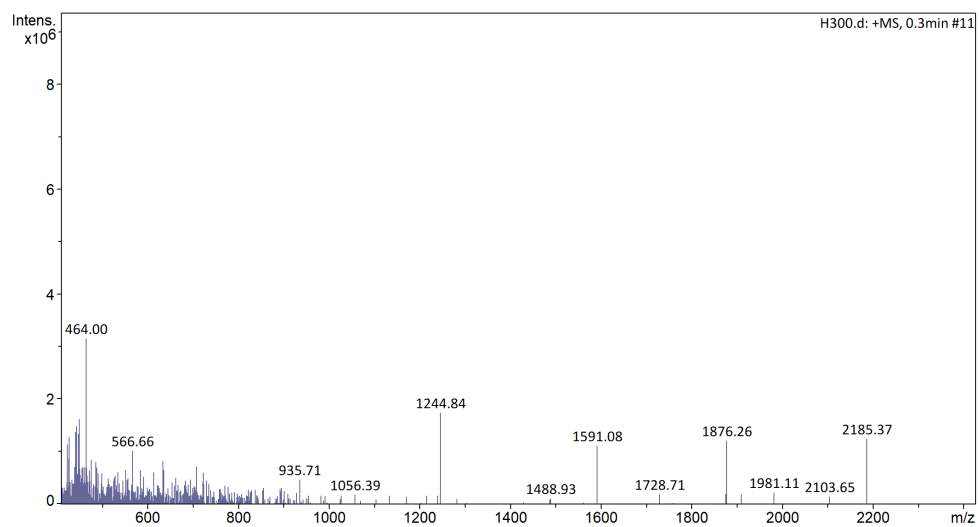
Название образца	Аминокислотная последовательность	Молекулярная масса, кДа
N1	GQLEANLLQVLEKVEEFRCEIADLNV RMDLPSATVVSTV KSGCRTTASK	2,114
N2	LGAAPSVYGGAGGHGTREQFERGFQVTELRLEQEIATYRR TTEYQLSTLEMKDIKK	2,19
N3	FQSEEQQQTEDELQDKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLPVR	2,185



а



б



в

Рис. 2. Масс-спектры образцов белковых молекул: а – фракция N1; б – фракция N2; в – фракция N3

При идентификации полученного полипептида по геномной базе данных по противомикробным пептидам (APD), которая содержит 3569 противомикробных пептидов из шести царств жизни (380 выделенных/предсказанных бактериоцинов / пептидных антибиотиков из бактерий, 5 из архей, 8 из протистов, 25 из грибов, 371 из растений и 2600 из животных, включая предсказанные геномом и некоторые синтетические пептиды не установлено его совпадение с имеющимися в базе полипептидами (рис. 3), что позволяет констатировать, что выделенный нами полипептид неизвестен и, соответственно, его биологическая активность не исследована.

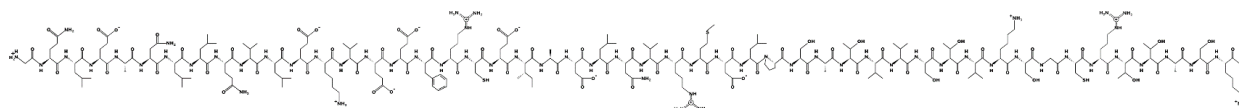
На основании анализа молекулярной массы (2,114 кДа) и количества аминокислот в исследуемом пептиде, согласно базе данных APD, можно свидетельствовать, что он относится к бактериоцинам I класса (класс I – молекулярная масса менее 5 кДа) и средним пептидам (25–50 аминокислот).

Исследование аминокислотной последовательности позволяет предположить, что полипептид обладает антимикробными свойствами. В исследуемом пептиде имеются следующие аминокислотные последовательности: VV, LP, SK, IA, VK, NL и KV как в антимикробных пептидах с названиями «FL-KV», «GL-AA», «FLG-LV», «IK-FLK», «GLR-KF», «GLKK-LA»

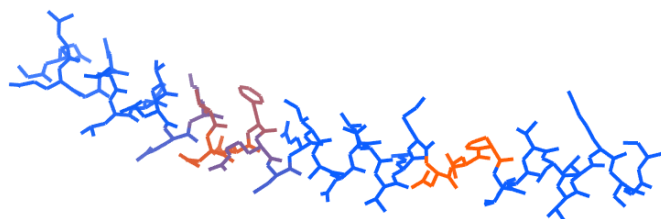
AMP Поиск по базе данных

<ul style="list-style-type: none"> База данных антимикробных пептидов О нас AMP Поиск по базе данных Калькулятор и предсказатель антимикробных пептидов Разработчик антимикробных пептидов Статистическая информация Связанные базы данных и веб-сайты прогнозирования Временная шкала Номенклатура антимикробных пептидов Классификация антимикробных пептидов Глоссарий Факты Трёхмерная структура антимикробных пептидов Инструменты Возможности Конференция Новости о вирусах Загрузки 	<p>Условия вашего запроса следующие:</p> <p>Идентификатор APD: "</p> <p>Расположение: 'Любой'</p> <p>Идентификатор местоположения: "</p> <p>Имя: ", ", "</p> <p>Тип: 'Любой'</p> <p>Длина: 'Любой'</p> <p>Netcharge: 'Любой'</p> <p>Процент гидрофобности: 'Любой'</p> <p>Активность: 'G', 'F', 'T', 'P', 'I', 'S', 'H', 'M', 'C', 'X', 'O', 'U', 'R', 'Z', 'K', 'Y', 'L', 'Q', 'N', 'BB', 'J', 'E', 'D', 'W', 'V'</p> <p>Автор: "</p> <p>Источник: "</p> <p>Содержит последовательность</p> <p>1: 'GQLEANLLQVLEKVEEFRCEIADLNV RMDLPSATVVSTV'</p> <p>2: 'KSGCRRTASK'</p> <p>Метод исследования: 'Любой'</p> <p>Дополнительная информация: ", ", "</p> <p>Отсортирован по: 'ID'</p> <p>Результаты не найдены</p> <p>Выполните поиск еще раз</p> <p>Нажмите здесь для загрузки файла FASTA</p>
---	--

Рис. 3. Результаты поиска полипептида по базе данных APD



а



б

Рис. 4. Вторичная структура (а) и третичная (б) структура полипептида



и «FLG-KL», ингибирующих, по данным авторов [17, 18], клетки MCF7, A549 и *E. coli*.

На рисунке 4 представлены 2 и 3 D-структуры молекулы полипептида.

В таблице 2 представлены физико-химические характеристики исследуемого полипептида, согласно исследованиям, проведенным по базам данных Protein NCBI и APD.

Изоэлектрическая точка полипептида находится в кислой среде – 4,81, что может свидетельствовать о некоторой защите перед протеазами [19]. Результаты моделирования структуры пептида (рис. 4) позволили определить уровень гидрофильности, который составляет +43,88 ккал·моль⁻¹. Высокая гидрофильность выделенного пептида связана с большим количеством атомов водорода в молекуле, что обеспечивает ей связывание с несколькими молекулами воды. Такой эффект называют «водяное облако», он приводит к увеличению гидродинамического радиуса, способствующего повышению растворимости и биодоступности пептида. Следует отметить, что «водяное облако» защищает пептид от защитных белков организма, например, антител, комплементов и др. Соответственно, высокая гидрофильность выделенного пептида защищает его от опсонизации фаго- и эритроцитов. Полученные данные о гидрофильности пептида позволяют предположить, что он может прикрепляться или проникать в клетку, минуя защиту организма «свой-чужой», что способствует повышению его способности ингибировать бактерии.

Исходя из суммарного заряда, согласно базе данных APD, в составе антимикробных пептидов есть катионные (88%), нейтральные (6%) и анионные пептиды (6%). Исследуемый пептид относится к анионным, так как имеет заряд –1.

Индекс Бомана у исследуемого пептида составляет 1,74 ккал/моль, что свидетельствует о среднем потенциале его связывания с белками. По данным [20] значение индекса выше 2,48 – высокая способность связываться с мембранами или другими белками в качестве рецепторов.

Поскольку аминокислотная последовательность пептида содержит четное количество Cys, она может образовывать связанную дисульфидными связями дефензиноподобную бета-структуру (~16–60 остатков AA), и выделенный полипептид можно отнести к антимикробным.

Согласно базе данных APD, выделяют семь типов классификации антимикробных пептидов: (1) биосинтетические машины (кодируемые генами или негенокодируемые), (2) исходные организмы (бактерии, растения или животные), (3) биологические функции (антибактериальные, противовирусные, противогрибковые, противопаразитарные и т.д.), (4) свойства пептидов (аминокислотный состав, длина, гидрофобность, заряд и длина), (5) структуры ковалентных связей (линейные пептиды, связанные боковая цепь с боковой цепью, связанные боковая цепь с основной цепью, кольцевые пептиды), (6) вторичные структуры (α , β , $\alpha\beta$ -спирали) и (7) молекулярные мишени (нацеливание на клеточную поверхность и внутриклеточное нацеливание) [20]. Исследуемый полипептид (рис. 4) относится к α -спиральным и имеет тиоэфирные связи, как в лантибиотиках. Примерами подобных альфа-спиральных являются антимикробные пептиды с количеством аминокислотных остатков от 11 до 49.

Согласно геномной базе данных по противомикробным пептидам (APD), выделенный нами пептид наиболее близок к известному спиральному антимикробному пептиду

Таблица 2 – Физико-химические характеристики исследуемого полипептида

Показатель	Характеристика
Количество аминокислотных остатков	49
Изоэлектрическая точка (pI)	4,81
Гидрофобность, Kcal/mol	+43,88
Заряд	–1
Гидрофобная аминокислота	1 V: 6 L: 6 F: 1 C: 2 M: 1 A: 4 W: 0
Молекулярная формула	C228H389N63O76S3
Потенциал связывания с белками (индекс Бомана), ккал/моль	1,74

Таблица 3 – Сравнительная антимикробная активность пептидов N1 и T1.4

Наименование образца	Диаметр зоны лизиса, мм	
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. subtilis</i>
T1.4	16	14
N1	18	17
Контроль	0	0
Антибиотик «Канамидин»	22	24

с идентификационным номером AP00088 с наименованием Эскулентин-2ЕМ, выделенном из кожи корейской морщинистой лягушки *Rana rugosa* и состоящем из 37 аминокислот с индексом Бомана 0,35 и гидрофобным остатком 45%, бактерицидному действию в отношении грам+ и грам- бактерий: *M. luteus* (2,5 мкг/мл), *S. epidermidis*, *B. subtilis* (10 мкг/мл), *K. pneumoniae*, *S. dysenteriae* (25 мкг/мл), *P. putida*, *P. aeruginosa* (100 мкг/мл) и *E. coli* (75 мкг/мл).

Проведена сравнительная оценка антимикробного действия выделенного пептида и антимикробного пептида с условным названием T1.4, выделенного из трипсинового гидролизата молозива коров (табл. 3).

Пептид N1 обладает антимикробным действием в отношении *E. coli* ATCC 25922 и *B. Subtilis*. Биологическая активность его выше пептида T1.4, выделенного из трипсинового гидролизата молозива коров, но ниже бактерицидного действия антибиотика «Канамидин».

Таким образом, полученный новый полипептид, продуцируемый *Lactobacillus lactis*, классифицируется как антимикробный альфа-спиральный анионный бактериоцин 1а класса – лантибиотик со средним потенциалом связывания с белками.

Выводы

Из продуцентов культуры *Lactobacillus lactis* получен пептид. В результате исследования физико-химических свойств установлено, что он состоит из 49 аминокислот, имеет молекулярную массу 2114 Да и предположительно относится к антимикробным. При идентификации пептида по известным протеомным базам совпадений не обнаружено. На основании полученных результатов пептид классифицируется как лантибиотик. Доказана антимикробная активность пептида в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Список литературы

1. Classification of antimicrobial peptides bacteriocins, and the nature of some bacteriocins with potential applications in food safety and biopharmaceuticals / O. Ibrahim [et. al.] // EC Microbiology. – 2020. – Vol. 15. – № 2. – P. 591–608.
2. Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective / P. M. O'Connor [et. al.] // Current Opinion in Biotechnology. – 2020. – Vol. 61. – № 4. – P. 160–167.
3. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products / Y. Malila [et. al.] // Meat Science. – 2016. – Vol. 120. – № 5. – P. 118–132.
4. Anti-listeria activity of poly (lactic acid) / sawdust particle biocomposite film impregnated with pediocin PA-1/AcH and its use in raw sliced pork / W. Woraprayote [et. al.] // International Journal of Food Microbiology. – 2013. – Vol. 167. – № 2. – P. 229–235.
5. Diversity of the bacteriocins, their classification and potential applications in combat of antibiotic resistant and clinically relevant pathogens / G. Choi [et. al.] // Critical Reviews in Microbiology. – Vol. 16. – № 1. – P. 20–28.
6. Molujin, A. M. A novel bacteriocin from *Lactobacillus pentosus* ZFM94 and its antibacterial mode of action / M. Dai [et. al.] // Frontiers in Nutrition. – 2021. – Vol. 8. – № 6. – P. 1–8.
7. Multiple bacteriocin production in lactic acid bacteria / R. H. Perez [et. al.] // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2022. – Vol. 134. – № 4. – P. 277–287.
8. Bacteriocins as potential therapeutic approaches in the treatment of various cancers: A review of in vitro studies / A. M. Molujin [et. al.] // Cancers. – 2022. – Vol. 14. – № 9. – P. 4758–4769.
9. Bacteriocins of lactic acid bacteria: Extending the family / P. Alvarez-Sieiro [et. al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2016. – Vol. 100. – № 7. – P. 2939–2951.



10. Synthesis, antimicrobial activity and conformational analysis of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1 and analogs thereof / F. Bédard [et. al.] // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 8. – № 1. – P. 9029–9038.
11. Antibacterial peptides “bacteriocins”: An overview of their diverse characteristics and applications / M. Nishie [et. al.] // *Biocontrol Science*. – 2012. – Vol. 17. – № 1. – P. 1–16.
12. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications / R. Perez [et. al.] // *Microbial Cell Factories*. – 2014. – Vol. 13. – № 1. – P. 3–12.
13. Novel group of leaderless multipolypeptide bacteriocins from Gram-positive bacteria / K. Ovchinnikov [et. al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2016. – Vol. 82. – № 7. – P. 5216–5224.
14. New pore-forming bacteriocin targeting mannose-PTS. / T. Oftedal [et. al.] // *Microbiology Spectrum*. – 2021. – Vol. 9. – № 2. – P. 347–358.
15. Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials / A. Darbandi [et. al.] // *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. – 2022. – Vol. 36. – № 3. – P. 1–40.
16. Diversity of lactic acid bacteria in fermented foods in Thailand / M. Miyashita [et. al.] // *Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria*. – 2012. – Vol. 23. – № 2. – P. 77–85.
17. Targeted Modification and Structure-Activity Study of GL-29, an Analogue of the Antimicrobial Peptide Palustrin-2ISb / S. Liu [et. al.] // *Antibiotics*. – 2022. – Vol. 11. – № 6. – P. 1048–1059.
18. Generating Ampicillin-Level Antimicrobial Peptides with Activity-Aware Generative Adversarial Networks. ACS Omega / A. Tucs [et. al.]. – 2020. – Vol. 5. – № 2. – P. 22847–22851.
19. Gelatin-Alginate Complexes for EGF Encapsulation: Effects of H-Bonding and Electrostatic Interactions Pharmaceuticals / J. Seonghee [et. al.] // *Journal of Internal Medicine*. – 2019. – Vol. 254. – № 3. – P. 197–215.
20. Chapter One-Unifying the classification of antimicrobial peptides in the antimicrobial peptide database / G. Wang [et. al.] // *In Methods in Enzymology*. – 2022. – Vol. 663. – № 5. – P. 1–18.

Мерзлякова Наталья Вадимовна, аспирант кафедры пищевой инженерии, ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет».

E-mail: merzlyakova@xk3.ru.

Тихонов Сергей Леонидович, д-р техн. наук, профессор, зав. кафедрой технологии хранения и переработки плодоовощной и растениеводческой продукции, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева; профессор кафедры пищевой инженерии аграрного производства, ФГБОУ ВО «Уральский государственный аграрный университет».

E-mail: tihonov75@bk.ru.

Тихонова Наталья Валерьевна, д-р техн. наук, профессор, заведующий кафедрой пищевой инженерии аграрного производства, ФГБОУ ВО «Уральский государственный аграрный университет».

E-mail: tihonov75@bk.ru.

Улитина Елизавета Андреевна, аспирант, ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный аграрный университет.

E-mail: egorulitin@inbox.ru.

* * *