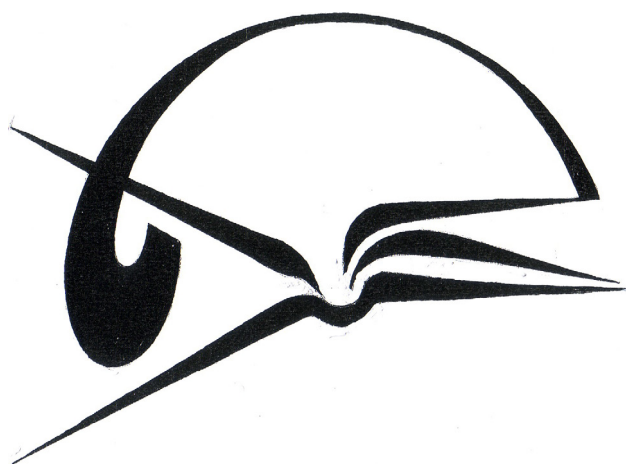


**ИНДУСТРИАЛНИ
ТЕХНОЛОГИИ**

**INDUSTRIAL
TECHNOLOGIES**



**УНИВЕРСИТЕТ
“Проф. д-р Асен Златаров”, Бургас
Том 8 (1) 2021**

**UNIVERSITY
“Prof. Dr. Assen Zlatarov”, Burgas
Vol. 8 (1) 2021**

Главен редактор:
Проф. д-р Иван Димитров

Editor-in-chief:
Prof. Dr. Ivan Dimitrov

**Научен борд, гост-редактори,
рецензенти:**

Проф. д-р Валентин Ненов
Проф. д-р Любомир Влаев
Проф. д-р Красимир Василев
Проф. д-р Сотир Сотиров
Проф. д-р Севдалина Турманова
Проф. д-р Евдокия Сотирова
Проф. д-р Ирена Марковска
Доц. д-р Цветко Прокопов
Доц. д-р Георги Добрев
Доц. д-р Светлана Желева
Доц. д-р Пламен Райков
Доц. д-р Роман Захариев
Доц. д-р Добромир Йорданов
Доц. д-р Тодор Паличев
Доц. д-р Любка Атанасова
Доц. д-р Жечка Михайлова
Доц. д-р Магдалена Дюлгерова

**Scientific Board, Guest Editors and
Reviewers:**

Prof. Dr. Valentin Nenov
Prof. DrSc Ljubomir Vlaev
Prof. Dr. Krasimir Vasilev
Prof. Dr. Sotir Sotirov
Prof. Dr. Sevdalina Turmanova
Prof. Dr. Evdokia Sotirova
Prof. Dr. Irena Markovska
Assoc. Prof. Dr. Tsvetko Prokopov
Assoc. Prof. Dr. Georgi Dobrev
Assoc. Prof. Dr. Svetlana Zheleva
Assoc. Prof. Dr. Plamen Raikov
Assoc. Prof. Dr. Roman Zahariev
Assoc. Prof. Dr. Dobromir Yordanov
Assoc. Prof. Dr. Todor Palichev
Assoc. Prof. Dr. Ljubka Atanasova
Assoc. Prof. Dr. Zhechka Mihailova
Assoc. Prof. Dr. Magdalena Djulgerova



© **Индустриални технологии**
ISSN 1314-9911



© **Industrial Technologies**
ISSN 1314-9911

Университет „Проф. д-р Асен Златаров”
ул. „Проф. Якимов”, № 1
Бургас, 8010, България

Prof. Dr. Assen Zlatarov University
1 “Prof. Yakimov” Str.
Burgas, 8010, Bulgaria

TABLE OF CONTENTS

THE DEVELOPMENT OF E-LEARNING IN GREECE. HISTORICAL ORIGINS. NEW INSTITUTIONAL INITIATIVES. E-LEARNING AT ALL LEVELS OF EDUCATION Dimos Charidimou, Dimitris Kalergis, Athanasios Maniotis	7
REGIOSELECTIVE SYNTHESIS OF PHOSPHORYLATED 3-(α-HYDROXYALKYL)ALLENES Hasan Hasanov, Ali Mustafa, Feyme Halil, Ismail Ismailov, Ivaylo Parushev, Ivaylo Ivanov, Valerij Christov	15
MODELING A WEB-BASED APPLICATION WITH PYTHON Bojhidara Uzunska and Egnar Özdikililer	20
DETERMINATION OF PROTEIN IN FOOD. PROTEIN AN IMPORTANT INGREDIENT IN A BALANCED DIET Galina Grigorova	27
OPPORTUNITIES AND PERSPECTIVES FOR RECOVERY OF ORGANIC FOOD AND NON-FOOD WASTES TO BIOFUEL PRODUCTION Galina Yordanova, Dobromir Yordanov	30
STUDY OF THE GROUP HYDROCARBON COMPOSITION OF ULTRALIGHT, LIGHT, MEDIUM, HEAVY AND ULTRA HEAVY TYPES OF CRUDE OIL, CRUDE OIL SANDS AND BITUMEN Lilyana Todorova-Yankova, Dobromir Yordanov, Dicho Stratiev, Ivelina Shishkova	38
INVESTIGATION OF THE GROUP HYDROCARBON COMPOSITION OF VACUUM RESIDUES FROM DIFFERENT TYPES OF CRUDE OIL, CRUDE OIL SANDS AND BITUMENS Lilyana Todorova-Yankova, Dobromir Yordanov, Dicho Stratiev, Ivelina Shishkov	51
5-HYDROXYMETHYLFURFURAL IN FOODS. POTENTIAL DAMAGE TO THE HUMAN BODY AND STRATEGIES FOR REDUCING ITS QUANTITIES IN FOOD Ivan Georgiev Ivanov	65
ACRYLAMIDE IN FOOD. POTENTIAL DAMAGE TO THE HUMAN ORGANISM AND STRATEGIES FOR REDUCING ITS QUANTITIES IN FOOD Ivan Georgiev Ivanov	72
STRATEGIES IN THE SYNTHESIS OF <i>ORTHO</i>-DIIODINE-SUBSTITUTED AROMATIC ACIDS Tanya Dimova, Nadya Hadzhieva, Nadezda Nefedova, Iliyan Kolev	81
SENSORY PROFILE OF CA (II)-ALGINATE BEADS CONTAINING HYDROSOL FROM <i>ROSA DAM- ASCENA</i> MILL. Ivanka Petrova, Nadezhda Petkova	87
BIODEGRADATION OF PHENOLIC COMPOUNDS BY <i>TRAMETES VERSICOLOR</i> Ralitza Koleva, Mariya Brazkova, Galena Angelova	93
THE TRANSFORMATION OF CHEMISTRY INTO SCIENCE.FIRST PART Krasimira Stancheva	100
DERIVATIVE Spectrophotometric METHOD FOR Determination OF palladium (ii) Chand Pasha, Krasimira Stancheva	106
THERMODYNAMIC AND KINETIC CHARACTERISTICS OF ADSORPTION PROCESSES OF MID- DLE DISTILLATED FRACTION Yordanka Tasheva, Milena Dimitrova, Aleksandar Dimitrov	112
ANTIOXIDANT PROPERTIES AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF COMMERCIAL PROPOLIS EXTRACTS FROM BULGARIA Mariyana Topuzova, Mina Todorova, Yulian Tumbariski, Nadezhda Petkova and Ivan Ivanov	117

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SOME ESSENTIAL OILS USED IN THE CULINARY AND FOOD BIOPRESERVATION AGAINST REPRESENTATIVES OF THE GASTROINTESTINAL MICROBIOTA Yulian Tumbarski, Ivanela Cholakova, Remzi Cholakov, Nadezhda Petkova, Ivan Ivanov, Pavel Merdzhanov, Nikolay Panayotov and Alexander Trayanov	125
TOXICOLOGICAL EVALUATION OF 2-METHYLTHIOPHENE FROM PETROLEUM Yana Koleva	134
PROBABLE REACTIVITY OF 2-METHYLTHIOPENE Yana Koleva	139
OPPORTUNITY TO EVALUATE INSULATION AND ACCUMULATION ROOM CAPACITY ACCORDING TO THE TRANSITION PROCESS AFTER SWITCHING OFF HEATING Rumen Yankov	145
BIOINFORMATICS AND MICROSATELLITE MARKER DEVELOPMENT FOR <i>SOLANACEAE</i> CROPS BREEDING Andrey Popatanasov	149
NEW PERSPECTIVES FOR THE APPLICATION OF BEE POLLEN IN ALTERNATIVE DIRECTIONS Mariyana Topuzova, Mina Todorova, Nadezhda Petkova, Ivan Ivanov	157

СЪДЪРЖАНИЕ

РАЗВИТИЕТО НА ЕЛЕКТРОННОТО ОБУЧЕНИЕ В ГЪРЦИЯ. ИСТОРИЧЕСКИ ПРОИЗХОД. НОВИ ИНСТИТУЦИОНАЛНИ ИНИЦИАТИВИ. ЕЛЕКТРОННО ОБУЧЕНИЕ НА ВСИЧКИ НИВА НА ОБРАЗОВАНИЕ	7
Димос Шаридиму, Димитрис Калергис, Атанасиос Маниотис	
РЕГИОСЕЛЕКТИВЕН СИНТЕЗ НА ФОСФОРИЛИРАНИ 3-(α-ХИДРОКСИАЛКИЛ) АЛЕНИ	15
Хасан Хасанов, Али Мустафа, Фейме Халил, Исмаил Исмаилов, Ивайло Парушев, Ивайло Иванов, Валерий Христов	
ИЗГОТВЯНЕ НА МОДЕЛ НА УЕБ БАЗИРАНО ПРИЛОЖЕНИЕ С PYTHON	20
Божидара Узунска и Егнар Йоздикилилер	
ОПРЕДЕЛЯНЕ НА БЕЛТЪК В ХРАНИ. ПРОТЕИНИТЕ ВАЖНА СЪСТАВКА В РАЦИОНАЛНОТО ХРАНЕНЕ	27
Галина Григорова	
ВЪЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВИ ЗА ОПОЛЗОТВОРЯВАНЕ НА ОРГАНИЧНИ ХРАНИТЕЛНИ И НЕХРАНИТЕЛНИ ОТПАДЪЦИ ЗА ПРОИЗВОДСТВО НА БИОГОРИВА	30
Галина Йорданова, Добромир Йорданов	
ИЗСЛЕДВАНЕ НА ГРУПОВИЯ ВЪГЛЕВОДОРОДЕН СЪСТАВ НА СВРЪХ ЛЕКИ, ЛЕКИ, СРЕДНИ, ТЕЖКИ И СВРЪХ ТЕЖКИ ТИПОВЕ НЕФТ, НЕФТЕНИ ПЯСЪЦИ И БИТУМИ	38
Лиляна Тодорова-Янкова, Добромир Йорданов, Дичо Стратиев, Ивелина Шишкова	
ИЗСЛЕДВАНЕ НА ГРУПОВИЯ ВЪГЛЕВОДОРОДЕН СЪСТАВ НА ВАКУУМНИ ОСТАТЪЦИ ОТ РАЗЛИЧНИ ТИПОВЕ НЕФТ, НЕФТЕНИ ПЯСЪЦИ И БИТУМИ	51
Лиляна Тодорова-Янкова, Добромир Йорданов, Дичо Стратиев, Ивелина Шишкова	
5-ХИДРОКСИМЕТИЛФУРФУРАЛ В ХРАНИТЕ. ПОТЕНЦИАЛНИ ВРЕДИ ЗА ЧОВЕШКИЯ ОРГАНИЗЪМ И СТРАТЕГИИ ЗА НАМАЛЯВАНЕ НА КОЛИЧЕСТВАТА МУ В ХРАНИТЕ	65
Иван Георгиев Иванов	
АКРИЛАМИД В ХРАНИТЕ. ПОТЕНЦИАЛНИ ВРЕДИ ЗА ЧОВЕШКИЯ ОРГАНИЗЪМ И СТРАТЕГИИ ЗА НАМАЛЯВАНЕ НА КОЛИЧЕСТВАТА МУ В ХРАНИТЕ	72
Иван Георгиев Иванов	
ОСНОВНИ СТРАТЕГИИ В СИНТЕЗА НА <i>ОРТО</i>-ДИЙОДОЗАМЕСТЕНИ АРОМАТНИ КИСЕЛИНИ	81
Таня Димова, Надя Хаджиева, Надежда Нефедова, Илиан Колев	
СЕНЗОРЕН ПРОФИЛ НА Ca (II) - АЛГИНАТНИ МИКРОСФЕРИ С ХИДРОЗОЛ ОТ <i>ROSA DAMASCENA</i> MILL.	87
Иванка Петрова, Надежда Петкова	
БИОДЕГРАДАЦИЯ НА ФЕНОЛНИ СЪЕДИНЕНИЯ ОТ <i>TRAMETES VERSICOLOR</i>	93
Ралица Колева, Мария Бръзкова, Галена Ангелова	
ПРЕВРЪЩАНЕ НА ХИМИЯТА В НАУКА. ЧАСТ ПЪРВА	100
Красимира Станчева	
МЕТОД НА ДЕРИВАТИВНА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПАЛАДИЙ (II)	106
Чанд Паша, Красимира Станчева	
ТЕРМОДИНАМИЧНИ И КИНЕТИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА АДСОРБЦИОННИ ПРОЦЕСИ НА СРЕДНОДЕСТИЛАТНА ФРАКЦИЯ	112
Йорданка Ташева, Милена Димитрова, Александър Димитров	
АНТИОКСИДАНТНИ СВОЙСТВА И АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ НА ТЪРГОВСКИ ПРОПОЛИСОВИ ЕКСТРАКТИ ОТ БЪЛГАРИЯ	117
Марияна Топузова, Мина Тодорова, Юлиан Тумбарски, Надежда Петкова и Иван Иванов	

АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ НА НЯКОИ ЕТЕРИЧНИ МАСЛА, ИЗПОЛЗВАНИ В КУЛИНАРИЯТА И БИОКОНСЕРВИРАНЕТО НА ХРАНИ СПРЯМО ПРЕДСТАВИТЕЛИ НА СТОМАШНО-ЧРЕВНАТА МИКРОБИОТА	125
Юлиан Тумбарски, Иванела Чолакова, Ремзи Чолаков, Надежда Петкова, Иван Иванов, Павел Мерджанов, Николай Панайотов и Александър Траянов	
ТОКСИКОЛОГИЧНО ОЦЕНЯВАНЕ НА 2-МЕТИЛТИОФЕН ОТ ПЕТРОЛ	134
Яна Колева	
Вероятна реакционна способност на 2-метилтиофена	139
Яна Колева	
ВЪЗМОЖНОСТ ЗА ОЦЕНКА НА ИЗОЛАЦИОННАТА И АКУМУЛАЦИОННАТА СПОСОБНОСТ НА ПОМЕЩЕНИЕ ПО ДАННИТЕ ОТ ПРЕХОДНИЯ ПРОЦЕС СЛЕД ИЗКЛЮЧВАНЕ НА ОТОПЛЕНИЕТО	145
Румен Янков	
БИОИНФОРМАТИКАТА И СЪЗДАВАНЕТО НА МИКРОСАТЕЛИТНИ МАРКЕРИ В СЕЛЕКЦИЯТА НА КУЛТУРИ ОТ СЕМЕЙСТВО SOLANACEAE	149
Андрей Попатанасов	
НОВИ ПЕРСПЕКТИВИ ЗА ПРИЛОЖЕНИЕТО НА ПЧЕЛНИЯ ПРАШЕЦ В АЛТЕРНАТИВНИ НАПРАВЛЕНИЯ	157
Марияна Топузова, Мина Тодорова, Надежда Петкова, Иван Иванов	



РАЗВИТИЕТО НА ЕЛЕКТРОННОТО ОБУЧЕНИЕ В ГЪРЦИЯ.
ИСТОРИЧЕСКИ ПРОИЗХОД. НОВИ ИНСТИТУЦИОНАЛНИ ИНИЦИАТИВИ.
ЕЛЕКТРОННО ОБУЧЕНИЕ НА ВСИЧКИ НИВА НА ОБРАЗОВАНИЕ

Димос Шаридиму, Димитрис Калергис, Атанасиос Маниотис

THE DEVELOPMENT OF E-LEARNING IN GREECE. HISTORICAL ORIGINS.
NEW INSTITUTIONAL INITIATIVES. E-LEARNING AT ALL LEVELS OF EDUCATION

Dimos Charidimou, Dimitris Kalergis, Athanasios Maniotis

ABSTRACT: Digital technology transforms every aspect of life and human activity. Today's Europe and the whole world are experiencing changes on a scale comparable to that of the industrial revolution since the patterns of learning, living and working change rapidly (European Commission, 2000). The dimensions of globalization, free movement and the abolition of the "educational", economic and political borders create new (common) rules and challenges. The "Knowledge-based Economy", i.e. the redefinition of the concept of education based on the needs of the economy, Educational Technology as a "means", "tool" and "object of teaching", as well as the modern technological achievements of the new Information and Communication Technologies (ICT), have inevitably affected the operation of educational units at all levels and grades of education. An e-learning ecosystem consists of both institutional and technological components, which require essential efficiency parameters and quality assurance indicators for the inputs of the educational system, i.e. the Curricula (C), the material and technical infrastructure, the administrative and scientific support of the provided educational project, the available educational materials, as well as the continuous education/training of all the teaching staff. In Greece, the integration of ICT in education has not yet been fully adopted, as there is limited school time, over-burdened detailed C and incomplete training of the teachers in new technologies that will combine and apply modern pedagogical principles. This assumption is also reflected in the report of the DESI 2018 index, "Digital Economy and Society" for the digital performance of European Union countries, where Greece is ranked second to last among its twenty-eight members (DESI, 2018).

Key words: e-Learning, ICT, Educational Technology.

Introduction

The new era of e-learning education opens up a new space for researchers to redefine the educational needs that arise in this field. Demand for the facilitation of e-learning is growing according to the number of participants.

First of all, we must point out that European influences contributed to the adoption of e-learning in Greece through a common European educational policy for the promotion of the knowledge-based society and Lifelong Learning (LLL). Thus, e-learning is inextricably linked to non-formal learning policies and LLL, which aim to develop new knowledge, skills and competencies to keep pace with the modern labour market, competitiveness and employability. In addition, COVID-19 pandemic has led to an unprecedented shift to online learning using digital technologies. E-learning is expected to become

an integral part of the education system worldwide in the future, as it allows students to take pre-required courses remotely, but also to combine both e-learning and face-to-face teaching. E-learning allows access to the knowledge of all students, at any time and anywhere. This easily leads to the conclusion that in the future e-learning will be the most widespread method for people wishing to acquire knowledge. Therefore, it is considered appropriate in Greece for educational policy to be institutionally and practically harmonized with the new data and for immediate actions to be taken to adapt to the new reality so that the education systems meet the requirements of the digital and modern age.

E-learning, PC and ICT

Requirements for the participants Computer-based education is considered to be the corner-

stone of creating the current form of e-learning (Hubackova, 2015). Several terms for e-learning are identified in the literature, such as mobile learning, learning via Personal Computers (PC), online learning etc. Therefore, as it becomes apparent, all these terms differ depending on the technological tool used each time, whether the learning is carried out remotely or face to face or even in a combination of both above methods. In several cases today the term ICT is used instead of the term informatics. Until recently in Greece, ICT was treated mainly as an object of education rather than as a means of research, knowledge and learning (Darantoumis, 2015). In any case, it is noteworthy that today the distinction of the informatics course as an autonomous subject module is obvious, in relation to ICT as an educational and teaching means and learning tool (Dimitriadis, 2015).

According to Cohen and Nycz (2006) e-learning is considered the process in which education is provided only through online services. Other researchers (Harasim, 2000, Lionarakis, 2009, Lu & Chiou, 2010, Makrakis, 2000) consider that the characteristics of e-learning are the distance between the teacher and the student, the use of technical means for the transfer of the curriculum content, the use of digital learning materials and the electronic communication, two-way or not, between the two parties.

Historical origins of e-learning in Greece

Historically, e-learning is based on a long tradition of teaching and learning experience. Informatics sector and Education and Training sector have influenced the term e-learning, making it a subset of them. According to Efthymiou and Vitsilakis (2007), during the 1980s, research began to be conducted on the fact that the PC can not just have only informative character but also interactive. As a result, applications for two-way communication (modern and asynchronous) between those involved in the educational process began to develop. At the same time, multimedia began to be used, which had the ability to integrate information in the form of video, audio, image, animation, etc.

For the integration of e-learning in Greece, the inclusion of the course of Informatics in the Detailed Curriculum for each level of education can be set as a milestone, as this course is a new science and a constantly evolving information medium (Dimitriadis, 2015) which is also developed in parallel with e-learning. Below, we list

chronologically how the Informatics course was integrated in all levels of education.

Historically, the first Greek Higher Education Institution which incorporated Informatics in the Curricula was the University of Patras in 1980 following the creation of the faculty of "Computer Engineering & Informatics" which deals with teaching and research in Computer Science and Technology, as well as the study of their applications (University Patras, 2021).

Then, as Dimitriadis (2015) reports, in 1983-1984, the subject of informatics was included in the Technical and Vocational High Schools, while in 1992 the secondary schools followed and at the same year the branch of Informatics teachers was established.

In the 1990s, computer technology was introduced in homes before being introduced in schools. This underlines not only the importance of non-formal learning but also the potential that this new form of learning can offer (European Commission, 2000, p. 8). The creation of the World Wide Web in 1992, combined with the new ICT, made education increasingly accessible (Harasim, 2000), having this as a result its use as a tool to promote knowledge, employment and consequently the development of "Human Capital".

In 1997 in Greece the institutional Unified Curricula Framework of Informatics/ICT was developed in school education, which incorporated pedagogical models and took into consideration modern learning theories, depending on the specifics of each school unit (Goudi, 2015). The adoption of informatics and ICT in primary education, however, was still a demand, as it provided only for the optional integration of informatics in the last two grades.

In the same year - 1997, the co-financed project by the European Structural Fund "Odyssey" of the Operational Program of Education and Initial Vocational Training (OPEIVT) began, which was completed in 2002 (Darantoumis, 2015). The strategic goals of OPEIVT were the access of all young people, aged 15-20, to education and vocational training as well as the improvement of infrastructure and the upgrading of the education system in order to be connected to the new needs of the labour market. The ultimate goal of the "Odyssey" project was for ICT to be integrated and supported as a teaching and learning tool in Greek education, as an integral part of the daily learning process (CTI, 2002).

This effort was one of the first ones in order for e-learning to be integrated in schools through

the continuous training of teachers and the provision of appropriate software and activities. Subsequently, in 1998 the subject of informatics was introduced in the Unified Lyceums and then in 2003 in the Primary education/Kindergarten with the Interdisciplinary Unified Curriculum Framework (IUCF), (Dimitriadis, 2015) (IEP, 2003).

New institutional initiatives

The European Union (EU) since the Maas-tricht Treaty - 1992 and the subsequent Lisbon Strategy 2000, adjusts its priorities for the period 2010-2020 with the strategy Europe2020, which sets as aims the smart, sustainable and without restrictions development of the citizens of the member states of the European Union, priorities which will lead to the re-duction of inequalities and consequently to the increase of social cohesion. The role of education is considered important and for this purpose funds are released through various European programs linking it with employment within the European Union. This period is characterized by an intense global economic crisis that did not leave unaffected the European Union - but culminating in the global health crisis to this day. Every EU member state, like ours, must harmonize its national institutional framework having as a basis the Europe2020 strategy, using modern tools for the LLL in order to achieve the goals set (European Commission. 2010). The development and use of modern e-learning methods is intensified both in face-to-face teaching and in the distance learning at all levels of education with the ultimate goal of society acquiring highly trained citizens by adding value to the socio-economic life of the country. Our country, based on the Europe2020 strategy towards this direction, instituted the first law (Law 3879/2010) that laid the foundations of LLL at all levels of the education system and set the basic guidelines for the use of new technologies.

As regard the latest institutional initiatives, the drafting of the program for employment and education for the period 2021-2027 has been assigned to the social partners in a public consultation, ending on 14/02/2021, in the context of LLL and education, in which one of the main issues to be addressed is the risks of exclusion of disadvantaged students from education, due to e-learning and digital learning of the teachers, issues that have emerged due to Covid-19. Thus, it becomes imperative the LLL and Training to be

conducted using digital media and ap-plications for teachers' training and the without restrictions in the learning opportunity of the persons under training. The ultimate goal is for education systems to be able to fulfill their primary mission of educating pupils and students so that they can have a successful course in a complex and inter-connected world facing rapid technological, cultural, economic and demographic developments (European Commission,. 2020).

E-learning as a tool and as a subject module at all levels of education.

E-learning concerns all levels of education, however until recently it was applied mostly in higher education and especially in postgraduate programs. As regards primary education, the first attempts to adopt e-learning concern the use of educational software by teachers with the ultimate goal of enhancing the cognitive level of students while providing them with incentives for students to participate in it. The program "Education of Expatriates" was a similar software. Similar programs aroused the students' interest and encouraged them to participate in the learning process, thus ensuring better cognitive outcomes. Then, in the 2000s, communication and collaboration programs, such as E-twinning, were introduced in primary education, enabling students from different schools and even from different countries to communicate with each other. Following the development of social networks (facebook, twitter), more and more teachers are using these tools to motivate their students and ensure quality learning outcomes. In all the above, the fact that since 2011 the Ministry of Education has digitized the textbooks of primary education and at the same time has additional interactive material, should not be ignored. In particular, in pre-school education, i.e., in kindergarten, teachers, by using ICT, set as an aim, students:

- To acquire new knowledge and skills.
- To become familiar with the basic forms of digital information (text, image, sound)
- To develop and express ideas through digital media

This is achieved through organized activities, such as internet research and various educational collaborative games such as digital photos, videos, recordings, creating a digital calendar, creating multimedia presentations, e-book using the presentation software of Photo Story 3 or related applications on a tablet. In this way, children

learn through a combination of learning experiences that may start from their own interests, as well as experiences organized by the teacher with specific learning goals (Kontopoulou & Christodoulou, 2014).

In Primary school, ICT is part of the curriculum with the aim of enhancing learning, the continuous development of students and preparing their participation in the modern knowledge-based society. In particular, the teaching of the ICT course in primary school does not involve mere acquaintance of the students with computers, software functions and the Internet, but mainly aims at the development of cognitive skills and the enhancement of students' learning capabilities through exploration, critical thinking, solution modeling, summarizing ability, creativity, as well as communication and collaboration skills. The integration of ICT in primary school is structured in four interdependent components, ICT as:

- Learning-cognitive tool: They are considered as a means of supporting modern pedagogical approaches, a tool of communication, exploratory and collaborative learning, development of critical thinking and creativity.
- Problem-solving methodology: Students participate in activities aimed at cultivating high-level and methodological skills.
- Technological tool: Developing technical skills and adequacy in handling modern ICT environments.
- Social phenomenon: Students know and evaluate the applications of ICT in modern society with the ultimate goal of acquiring digital education and forming new attitudes and values (IEP, 2014).

Similar efforts were observed also in secondary education with the use of educational software, the creation of student online communities through social networks, but also the digitization of school textbooks (Anastasiadis, 2014).

E-learning, as regards higher education and adult education in Greece, has its roots in the Hellenic Open University (HOU) which is considered a pioneer in distance learning in Greece. Since its establishment in 1997, it has offered open and distance adult learning at undergraduate and postgraduate level. HOU offers its services using ICT tools and learning systems. These systems provide important resources and data collected through the online activities of both teachers and students. Conventional universities, on the other hand, usually rely on face-to-face teaching in classrooms. However, in recent

years, the role of universities has changed (Lionarakis, 1999). According to Law 4485 of 2017, conventional universities can offer their postgraduate programs using mixed learning methodologies, where 35% of teaching hours can be of distance learning (Karachristos et al., 2020). These sessions are the online equivalent of sessions carried out in lecture halls and classrooms and could take the form of lectures, seminars, workshops, mentoring or teaching.

The role of the teacher

The purpose of facilitating e-learning as well as the duties of the teacher in the context of it are not clearly defined. The teacher in e-learning should facilitate the online educational course, to motivate, involve and support the students, but also to facilitate their communication and cooperation throughout the course (Efthymiou & Vitsilaki, 2007, Harasim, 2000, Raptis & Raptis, 2000).

In distance learning, many teachers can act as facilitators of e-learning in order to support distance learning. In the Greek context, the teacher in order to fulfill the role of supporter in the e-learning process, motivates, supports, creates ideas, talks with the learner and generally monitors the learning process of the e-learning community (Efthymiou & Vitsilaki, 2007, Lionarakis, 2006, Makrakis, 2000).

As Vogiatzaki (2020) claimed, the e-learning teacher also acts as a facilitator. The teacher in the field of e-learning provides students with additional material through innovative and alternative ways. According to the study of Ikonomou (2017), conducted in order to explore the views and attitudes of teachers towards e-learning programs, the role of the teachers was highly appreciated, especially for the role of support, motivation and guidance, regardless of its physical absence. However, according to Spanaka & Kameas (2015), the role of facilitator involves planning and delivering, in real-time, group sessions using web conferencing tools ("webinars").

Sophos, Kostas & Parachou (2015) stated that facilitating e-learning combines self-directed learning and e-learning with a teacher's guidance. However, Ntourmas et al. (2019, p. 12) argue that a facilitator should act more as an omniscient interlocutor than as a knowledge facilitator.

Modern distance e-learning

Recent developments in education due to the Covid-19 pandemic have influenced the way of thinking and acting in education and the benefits of distance learning were highlighted, reinforcing the need for further dynamic educational design models and the acquisition of new skills (Karachristos et al., 2020).

According to unofficial data, e-learning in Greece, in 2015, corresponded to 8-10% of the total Education Programs offered in the country. Historically, in 2006, the Ministry of Education established the "Electronic Classroom Management Service" (e-class). This service enables teachers and students to make good use of ICT daily. The service also aims to support the teaching work of teachers, to facilitate the way in which curricula is organized and planned and to utilize the school timetable. Through the electronic classroom management, teachers can publish electronic notes, cite helpful resources, schedule their courses, create exercises for self-assessment or even manage the traditional book electronically (Roumeliotis, 2016).

Students have free access to the Electronic Classroom Management. On the other hand, those teachers who wish to enter the Electronic Classroom Management must create an account so that they can manage their courses on the platform.

E-learning can take the following forms: asynchronous, synchronous and mixed-combined (Anastasiadis, 2012; Bonk & Graham, 2006; Moore & Kearsley, 2012). Asynchronous e-learning is carried out with advanced technologies and enables students and teachers to interact at different times regardless of where they are located. Examples of asynchronous e-learning are considered to be the Learning Management Systems (LMS), such as the moodle platform (Ellis, 2009) and Content Management Systems (CMS), which disseminate content over the Internet, such as Joomla, Drupal, etc. (Browning & Lowndes, 2001). Synchronous e-learning is carried out with advanced technologies and provides the opportunity for students and teachers to interact at the same time regardless of where they are located (Anastasiadis, 2008, Kampourakis & Loukis, 2006). Finally, mixed-combined e-learning includes both asynchronous and synchronous e-learning (Anastasiadis, 2008).

Emergency e-learning

Today, the most widespread e-learning is the online one due to the coronavirus pandemic. In any case, Emergency Distance Learning is not exactly e-learning, although it is used as a tool for its implementation. Schools and universities in Greece suspended their operation for the first time on March 11, 2020 due to the coronavirus pandemic as part of government measures to prevent the spread of the disease. The Ministry of Education responded immediately to this emergency and gradually implementing distance learning, offered students the opportunity to stay in touch with the educational process. Without intending to replace face-to-face learning, the Ministry of Education has activated digital platforms and tools that are offered free of charge by ICT providers that are addressed to students of all levels of education: primary, secondary and higher education (Karachristos et al., 2020).

The distance learning program of the Ministry of Education includes synchronous and asynchronous distance learning. Synchronous learning was offered and is offered to students of the Third Grade of Lyceum who are getting prepared for the panhellenic exams and then it was applied to the other grades of secondary education and all grades of primary education. The educational program is developed by the principal and the teachers of each school unit according to the specific needs of each grade. During synchronous learning, the teacher can share files, presentations and even its screen and notes with its students, while it can allow them to ask questions or just talk, thus participating in an interactive course.

As for the asynchronous learning, students and teachers can use the existing digital tools and platforms already provided by the Ministry of Education, such as the Interactive Textbooks, the Digital Teaching Materials ("Fotodentro") and the Advanced Electronic Scenarios ("Aesop"), that are organized at educational level. E-learning videos are also uploaded to the platforms so that students can watch online courses at any time of the day.

The IT companies CISCO, Google and Microsoft have offered for free three digital platforms to the Ministry of Education and the Greek Universities in order to cover the increased needs in distance learning under these exceptional circumstances. Greek universities already had e-learning programs and for this reason they could adapt more easily to the new needs that arose.

Taking into consideration the possible technological restrictions on access to the digital platforms, the Ministry of Education has provided the possibility of connecting to digital classrooms through a simple telephone connection. Special ICT applications and learning techniques are also used where possible in order for the digital classrooms to be adapted to the needs of students with disabilities and/or special needs (Greek News Agenda, 2020).

However, we should point out the difficulties that occurred during the implementation of the above process, such as the lack of PCs and equipment by many families or teachers, the use of a PC by two or more children - members of the same family, families without internet connection, teaching staff without the necessary knowledge in the use of technologies in education.

E-learning is a phenomenon where technologies improve teaching methods and create new pedagogical models. The real value of e-learning lies not only in its ability to educate anyone, anytime, anywhere, but, through the facilitation of learning, to enable people to acquire the right skills or knowledge, having equal rights, at the right time (Govindasamy, 2002). In any case in emergency e-learning the theories of distance learning and e-learning have not yet been adopted and applied as they should have been by several Greek public education systems of all levels of education, as there is limited school time, overburdened detailed C as well as insufficient training of teachers in new technologies that will combine and apply modern pedagogical principles.

Conclusion

Nowadays, citizens need to adapt to today's changes and at the same time education systems need to be able to prepare the students based on the modern data and the ways in which people live and learn their lives, so that they can cope in an internationally competitive environment (European Commission, 2000).

The modern teacher, in addition to its traditional role, is called to become a designer, to structure and specify the material in order to be interactive and communicative. It should be able to structure interactive activities in order to produce modern training programs, solve emerging problems and meet specific needs.

At the same time, teachers should be able and be at a position to follow open learning paths of

their own choice, instead of being obliged to follow predetermined path to specific destinations (European Commission, 2000). Therefore, it is considered appropriate for teachers to become harmonized with the new data and for the school to operate based on the requirements of modern socio-economic world and the individual needs of the students.

References

English:

1. Anastasiadis, P. 2012. Design of a Blended Learning Environment for the Training of Greek Teachers: Results of the Survey on Educational Needs. In P. Anastasiades (ed.), *Blended learning environments for adults: Evaluations and frameworks*. pp. 230–256. Hershey, PA: Information Science Reference
2. Bonk, C. J. & Graham, C. R. (Eds.) 2006. *Handbook of blended learning: Global perspectives, local designs*. San Francisco, CA: Pfeiffer Publishing
3. Browning, P., & Lowndes, M. 2001. *JISC TechWatch Report: Content Management Systems*. Retrieved from http://www.jisc.ac.uk/uploaded_documents/tsw_01-02.pdf
4. Cohen, E., & Nycz, M. 2006. Learning objects and e-learning: an informing science perspective. *Interdisciplinary Journal of Knowledge and Learning Objects*, 2, pp. 23-34.
5. DESI. (2018). The Digital Economy and Society Index . European Commission.
6. Ellis, R. 2009. *A field guide to learning management systems*. USA: American Society of Training and Development (ASTD).
7. European Commission, 2000. *Memorandum on Lifelong Learning*. Commission Staff Working Paper. Brussels: Commission of the European Communities
8. European Commission, 2010. Europe 2020: A strategy for smart, sustainable and inclusive growth. COM(2010) 2020 final.
9. European Commission, 2020. *About innovation in education Improving and modernising education is a key priority for the EU and its Member States*. https://ec.europa.eu/education/policies/innovation-in-education/about-innovation-in-education_en
10. Govindasamy, T. (2002). *Successful implementation of e-Learning: Pedagogical considerations*. The Internet and Higher Education, pp. 287-299, Volume 4, Issues 3–4.

11. Greek News Agenda (2020). Distance learning after the closure of schools in Greece. Ανακτημένο από: Distance learning after the closure of schools in Greece (greeknewsagenda.gr)
 12. Harasim, L. 2000. Shift happens: online education as a new paradigm in learning. *The Internet and Higher Education*, 3, pp. 41-61.
 13. Hubackova, S. 2015. History and Perspectives of Elearning. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, pp. 1187-1190, Is. 191.
 14. Karachristos, C., Kouvara, T., Orphanoudakis, T., Stavropoulos, E., Batsi, Z., & Chronopoulou, M. 2020. Defining e-learning facilitation-the Greek Case study. In *Proceedings of ICERI2020 Conference* Vol. 9, p. 10th.
 15. Lu, H. P & Chiou, M. J. 2010. The impact of individual inferences on e-learning system satisfaction: A contingency approach. *British Journal of Education Technology*, 41, pp. 307-323.
 16. Moore, M. G. & Kearsley, G. 2012. *Distance Education: A Systems View of Online Learning*. Belmont, CA: Wadsworth.
 17. Ntourmas, A., Avouris, N., Daskalaki, S., & Dimitriadis, Y. 2019. Teaching assistants in MOOCs forums: Omnipresent interlocutors or knowledge facilitators. In *European conference on technology enhanced learning*. pp. 236-250. Springer, Cham.
 18. Sophos, A., Kostas, A., & Paraschou, B. 2015. Online Distance-Learning Education, from Theory to Practice. *SEAB*. Athens.
 19. Spanaka, A., & Kamea, A. 2015. Training for New E-learning Role Profiles: the Case of E-virtue Project. In *Conference Proceedings. The Future of Education*. pp. 92-96. libreriauniversitaria. it Edizioni.
- Greek:**
20. Anastasiadis, P. 2008. Pedagogical Planning Issues for the Teaching Utilization of Interactive Teleconferencing in a Mixed-Polymorphic- Learning Environment Socially Constructive Approach. The Case of the program "Education of Expatriates" for the Training of Teachers of the Expatriate at the University of Crete (E.DIA.M.ME). In *Anastasiades, P. (et al.), Teleconferencing in the Service of Lifelong Learning and Distance Learning: Pedagogical Applications of Collaborative Distance Learning in Greek Higher Education*. Athens: Gutenberg.
 21. Anastasiadis, P. 2014. The research on Distance Learning using ICT (e-learning) in the Greek Standard Education System. Review and Prospects for Primary, Secondary and Higher Education. *Open Learning: the magazine for Open and Distance Learning and Educational Technology*, 10 (1), pp. 5-32.
 22. CTI (Computer Technology Institute and Press), 2002. What is Odyssey? Retrieved from <http://odysseia.cti.gr/about.htm>
 23. Darantoumis, A. 2015. Introduction to Educational Technology. Rhodes: University of the Aegean.
 24. Dimitriadis, S. 2015. *Teaching of Informatics. Informatics curricula in Greek*. Thessaloniki, AUTH.
 25. Efthymiou, H. & Vitsilaki, X. 2007. *New Forms of Learning and the role of Technology. The case of Teacher Training*. Thessaloniki: Kyriakidis brothers.
 26. Goudi, O. 2015. *Evolution of the Detailed Curricula for their integration of the New Digital Media in Education*. Rhodes: University of the Aegean. School of Humanities. Department of Primary Education.
 27. IEP (Institute of Educational Policy), 2003. *Managing Committee of Model-Experimental Schools, GG 304, Bulletin B'* (13/03/2003). Athens: Ministry of Education and Religious Affairs.
 28. IEP (Institute of Educational Policy). 2014. *New School (21st century school) – New Curricula. Subproject 1 : "Elaboration of Compulsory Education Curricula". ITC 1st-6th Grade of Primary School*. Athens: Ministry of Education and Religious Affairs.
 29. Ikonomou, X. B. 2017. Distance learning in the context of non-formal education and learning: Investigation of the views and attitudes of trainees who participated in distance learning/training / mixed education programs of the Labour Institute of the General Confederation of Greek Workers (GSEE). *Open Learning: the magazine for the Open and Distance Learning and Educational Technology*, 13(2), 17-34.
 30. Kampourakis, G. & Loukis, E. 2006. *E-learning*. Athens: Klidarithmos Publications.
 31. Kontopoulou, M. & Christodoulou, I. (2014). *Teacher's Guide for the Kindergarten Curricula*. Athens: Ministry of Education and Religious Affairs - Institute of Educational Policy.
 32. Lionarakis, A. 1999. "Open and distance learning: the experience of the Hellenic Open University". Conference of the Department of Primary Education of the University of the Aegean, Rhodes.

33. Lionarakis, A. 2006. "The theory of distance learning and the complexity of its polymorphic dimension". In A. Lionarakis Open and distance learning. Elements of Theory and Practice. Athens: Propompos.
 34. Lionarakis, A. 2009. *The elaboration of a Methodological Approach (Teaching) of the distance Lifelong Learning Programs*. Athens: Ministry of Education, Lifelong Learning and Religious Affairs, General Secretariat for Lifelong Learning, Institute of Adult Continuing Education (IDEKE).
 35. Makrakis, B. 2000. *Hypermedia in education: a socio-constructive approach*. Athens: Metechmio.
 36. Raptis, A. & Rapti, A., 2000. "Educational Policy and the Introduction of New Technologies in Education". In Komis, B. *Presentations at the 2nd Panhellenic Conference with international participation*. October 2000, Univ. of Patras, Patras.
 37. Roumeliotis, A. 2016. *Distance Learning: New services for the professor*. Postgraduate Thesis, University of Patras, Faculty of Engineering, Department of Computer Engineering & Informatics.
 38. University of Patras. 2021. University of Patras. Retrieved from the Department of Computer Engineering & Informatics: <http://www.upatras.gr/el/node/122>
 39. Vogiatzaki, E., 2020. Roles and skills of teachers in distance learning. *International Conference on Open & Distance Learning*, 10(1B), pp.38-42.
-
- 1) Dimos Charidimou
Aristotle University of Thessaloniki
Department of Informatics, School of Sciences
Thessaloniki, Greece
dcharidim@csd.auth.gr
 - 2) Dimitris Kalergis
University of the Aegean
Department of Pre-school Education and Educational Design
Rhodes, Greece
psemnem20010@aegean.gr
 - 3) Athanasios Maniotis
University of the Aegean
Department of Pre-school Education and Educational Design
Rhodes, Greece
psemnem20023@aegean.gr



РЕГИОСЕЛЕКТИВЕН СИНТЕЗ НА ФОСФОРИЛИРАНИ 3-(α -ХИДРОКСИАЛКИЛ)АЛЕНИ

Хасан Хасанов, Али Мустафа, Фейме Халил, Исмаил Исмаилов, Ивайло Парушев,
Ивайло Иванов, Валерий Христов

REGIOSELECTIVE SYNTHESIS OF PHOSPHORYLATED 3-(α -HYDROXYALKYL)ALLENES

Hasan Hasanov, Ali Mustafa, Feyme Halil, Ismail Ismailov, Ivaylo Parushev,
Ivaylo Ivanov, Valerij Christov

ABSTRACT: A convenient and efficient regioselective synthesis of phosphorylated 3-(α -hydroxyalkyl)allenes by an atom- economical [2,3]-sigmatropic rearrangement of the mediated propargyl phosphites or phosphinites which can be readily prepared via reaction of (tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-alkynols with dimethyl chlorophosphite or chlorodiphenyl phosphine respectively in the presence of a base is described.

Key words: Synthesis; protection of hydroxy group; [2,3]-sigmatropic rearrangement; phosphorylated 3-(α -hydroxyalkyl)allenes

Introduction

The synthesis and application of allene derivatives has had a great influence in preparative organic chemistry during the last three decades. The crucial structural characteristic of allenes is the presence of two π electron clouds separated by a single sp -hybridized carbon atom. Due to that very unique structural and electronic arrangement allenic compounds have an extraordinary reactivity profiles. Moreover, functionalized allenes have also attracted growing attention due to their versatility as key building blocks for organic synthesis. The synthetic potential of functionalized allenes has been thoroughly explored in recent years. The research in that area has led to the development of novel methods for the construction of a variety of functionalized heterocyclic and carbocyclic systems [1–6].

There are variety of methods for the construction of hydroxyallenes that include prototropic rearrangement of propargylic alcohols [7, 8], metal-catalyzed nucleophilic addition of propargylic derivatives to aldehydes [9–15], Cu(I)-catalyzed reaction of propargylic chlorides with Grignard reagents [16, 17], metal-catalyzed reaction of propargylic oxiranes with organometallic compounds [18–22] and ketones [23, 24], reduction of alcohols, ethers, oxiranes *etc.* with

aluminium reagents [25–27], Pd(0)-catalyzed reaction of cyclic carbonates with acetylenic compounds [28, 29], S_N2 , [30, 31] and A_N [32, 33] reactions of metallated alkoxy-allenes with oxiranes and ketones [34], and other routes [35].

In addition, there are methods [36–39] for the synthesis of phosphorus-containing allenes (phosphonates [40–43], phosphinates [44, 45], and phosphine oxides [46–51]) including reactions of α -alkynols with chloride-containing derivatives of phosphorus acids followed by [2,3]-sigmatropic rearrangement. Several diethylphosphono-substituted α -allenic alcohols were prepared by Brel [52, 53] directly from alcohols by Horner-Mark rearrangement of unstable propargylic phosphites.

As a part of our research program on the chemistry of the bifunctionalized allenes, we required a convenient method to introduce a phosphorus-containing group such as phosphonate or phosphine oxide group as well as a α -hydroxy group in the third position to the allenic system of double bonds. The above mentioned groups provoke organic researchers' interest because of their useful functionalities in organic synthesis. The emphasis is particularly on the applications of these groups as temporary transformers of chemical reactivity of the allenic system in the synthesis of eventually heterocyclic compounds.

Our scientific interest on the synthesis [54, 55] and electrophilic cyclization [56, 58] and cycloisomerisation reactions [57, 58] of phosphorylated 1-(α -hydroxyalkyl)allenes [54, 56, 57], 1-(β -hydroxyalkyl)allenes [55, 58], 4-hydroxy-1,3,4-triphenyl-buta-1,2-dienes [63] and 3-(β -hydroxy-alkyl)allenes [64] reported in our previous articles let to the discovery of a convenient and efficient regioselective synthesis of phosphorylated 3-(α -hydroxyalkyl)allenes by an atom economical [2,3]-sigmatropic rearrangement of the mediated (tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-propargyl phosphite or phosphinite.

Results and Discussion

We based our strategy for the synthesis of the phosphorylated 3-(α -hydroxyalkyl)allenes on our experience in preparation of the phosphorylated 1-(α - [54] and β - [55] hydroxyalkyl)allenes, and relied on the well-precedented [2,3]-sigmatropic shift of propargylic phosphites to allene-phosphonates [40–43] and propargylic phosphinites to allenyl phosphine oxides [46–51]. We were aware of the fact that a precedent exists for such an approach to the synthesis of the diethylphosphono- substituted α -allenic alcohols [52, 53], but as far as we know, a general useful method for regioselective synthesis of phosphorylated (phosphonates and phosphine oxides) 3-(α -hydroxyalkyl)allenes with protected or unprotected hydroxy group with protected or unprotected hydroxy group has not been reported yet.

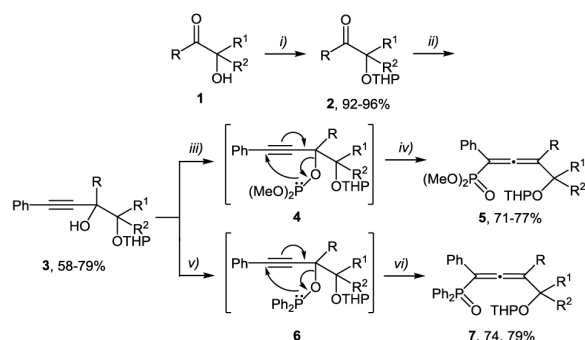
The main target in our research, and namely 1,3-bifunctionalized allenes, was achieved as a range of the phosphorylated 3-(α -hydroxyalkyl)allenes **5**, **7**, **8**, and **9**, was prepared by applying the following four-step procedure: (i) protection of hydroxy group in the α -hydroxy-alkanones **1**; (ii) subsequent reaction of Grignard reagent and the protected ketones **2** to give the (tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-alkynols **3** with protected hydroxy group at 4 position; (iii) interaction with dimethylchlorophosphite or chlorodiphenyl phosphine in the presence of a base; and finally (iv) [2,3]-sigmatropic rearrangement of the mediated hydroxy-protected propargyl phosphites or phosphinites.

The first step in our investigation was to examine the hydroxy group protection in the α -hydroxy-alkanones **1** with 3,4-dihydro-2H-pyran (DHP) in the presence of pyridinium *p*-toluenesulfonate (PPTS) [59–62] (Scheme 1). Thus, the formed (tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-alkanones **2** were isolated by column chromatog-

raphy with excellent yield (92-96%). Reaction of the protected alkanones **2** with the *in situ* generated phenylethynylmagnesium bromide from ethyl magnesium bromide and phenylacetylene to give the (tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-alkynols **3** which are stable and were isolated by column chromatography in 58-79% yield.

Once we had the required alk-1-yn-3,4-diols **3** with protected hydroxy group at 4 position, we were then able to investigate the proposed reactions with the corresponding chloro-containing phosphorus reagents such as dimethyl chlorophosphite and chlorodiphenyl phosphine in the presence of a base and subsequent [2,3]-sigmatropic rearrangement of the mediated propargyl phosphites **4** or phosphinites **6**.

Let us start with the dimethyl (tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-alka-1,2-dienephosphonates **5** that can be easily prepared *via* an atom economical 2,3-sigmatropic rearrangement of the protected propargyl phosphites **4**, intermediate formed by reaction of the alkynols **3** with dimethyl chlorophosphite, *in situ* prepared from phosphorus trichloride in the presence of triethylamine and 2 *equiv* of methanol and 2 *equiv* of pyridine, according to Scheme 1.



Entry	Product	R	R ¹	R ²	Yield, %			
					2	3	5	7
1	a	Me	H	H	95	75	72	79
2	b	Me	Me	H	96	79	77	-
3	c	Ph	-(CH ₂) ₅ -	H	93	65	73	-
4	d [63]	Ph	Ph	H	92	58	71	74

Reagents and Conditions: i) (α -hydroxyalkyl)ketone (1 eq), DHP (1.5 eq), PPTS (0.1 eq), CH₂Cl₂, rt, 10h, column chromatography; ii) dropwise addition of EtMgBr (1 eq) to phenylacetylene (1 eq), THF, reflux, 2h, dropwise addition of prepared ethynylmagnesium bromide to **2** (2 eq), THF, reflux, 16h, column chromatography; iii) PCl₃ (1 eq), Et₃N (1.1 eq), Et₂O, -70 °C, 30 min stirring, pyridine (2.2 eq), MeOH (2 eq), Et₂O, -70 °C; iv) [2,3- σ]-rearrangement, -70 °C, 1h, rt, 12h, column chro-

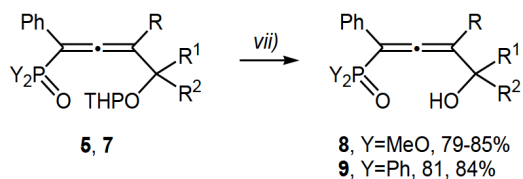
matography v) Ph_2PCl (1 eq), Et_3N (1.1 eq), Et_2O , -70°C ; vi) [2,3- σ]-rearrangement, -70°C , 1h, rt, 8h, column chromatography.

Scheme 1. Synthesis of the 3-(α -hydroxyalkyl)-allenephosphonates **5** and 3-(α -hydroxyalkyl)-allenyl phosphine oxides **7** with protected hydroxy-group.

Next, the reaction of the (tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-alkynols **3** with chlorodiphenyl phosphine in the presence of triethylamine at -70°C gave the expected diphenyl (tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-alka-1,2-dien-1-yl phosphine oxides **7** in very good yield (74 and 79%) as a result of [2,3]-sigmatropic rearrangement of the protected propargyl phosphinites **6**, according to the reaction sequence outlined in Scheme 1.

A new family of the phosphorylated 3-(α -hydroxyalkyl)allenes with protected hydroxy group **5** and **7** were synthesized *via* an atom economical and regioselective [2,3]-sigmatropic rearrangement of the intermediate formed propargyl phosphites **4** or phosphinites **6** in the reaction of the alk-1-yn-3,4-diols with protected hydroxy group at 4 position **5** with dimethylchloro phosphite or chlorodiphenyl phosphine in the presence of triethylamine.

Allenic compounds **5** and **7** were stable enough to be handled at ambient temperature. The hydroxy group was deprotected by stirring the ethanol solution of the protected 3-(α -hydroxyalkyl)-allenephosphonates **5** and 3-(α -hydroxyalkyl)-allenyl phosphine oxide **7** in the presence of 0.1 equiv PPTS at room temperature for 6 hours, according to Scheme 2.



Entry	Product	Y	R	R ¹	R ²	Yield, %
1	8a	MeO	Me	H	H	80
2	8b	MeO	Me	Me	H	83
3	8c	MeO	Ph	-(CH ₂) ₅ -	H	85
4	8d [63]	MeO	Ph	Ph	H	79
5	9a	Ph	Me	H	H	84
6	9d [63]	Ph	Ph	Ph	H	81

Reagents and Conditions: vii) PPTS (0.1 eq), EtOH, rt, 6h, stirring, column chromatography.

Scheme 2. Synthesis of the 3-(α -hydroxyalkyl)-allenephosphonates **8** and 3-(α -hydroxyalkyl)-allenyl phosphine oxides **9**

After a conventional work-up, all allenic products **5**, **7**, **8**, and **9** were isolated as stable yellow or orange oils by column chromatography and identified by ^1H , ^{13}C , and ^{31}P NMR and IR spectra as well as by elemental analysis.

A series of new phosphorylated 3-(α -hydroxyalkyl)allenes with protected (**5** and **7**) and unprotected hydroxy group (**8** and **9**) were synthesized by a convenient, efficient, atom economical and regioselective method.

Conclusion

In conclusion, a convenient and efficient regioselective synthesis of a new family of 1,3-bifunctionalized allenes has been explored. Phosphorylated 3-(α -hydroxyalkyl)allenes prepared were derived from [2,3]-sigmatropic rearrangement of the intermediate propargyl phosphites or phosphinites formed in the reaction of protected alkynols with dimethylchloro phosphite or chlorodiphenyl phosphine in the presence of a base.

Further investigations on this potentially important synthetic methodology are currently in progress. At the same time, the synthetic application of the prepared phosphorylated 3-(α -hydroxyalkyl)allenes with protected or unprotected hydroxy group for synthesis of different heterocyclic compounds is now under investigation in our laboratory as a part of our general synthetic strategy for investigation of the scope and limitations of the electrophilic cyclization and cycloisomerization reactions of bifunctionalized allenes. Results of these investigations will be reported in due course. Moreover, results of an initial investigation of the biological activity of the compounds prepared were encouraging, and the antibacterial and antifungal activities of selected compounds as well as potential precursors of effective anticancer drugs are now under investigation in our university.

Acknowledgment

This work was supported by European Regional Development Fund and the Operational Program "Science and Education for Smart Growth" under contract UNITE № BG05M2OP001-1.001-0004 (2018-2023)

References

1. R. W. Bates, V. Satcharoen, *Chem. Soc. Rev.*, **2002**, 31, 12.

2. N. Krause, A. S. K. Hashmi (Eds.), *Modern Allene Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**, Vol. 1 & 2.
3. S. Ma, *Aldrichimica Acta*, **2007**, *40*, 91.
4. K. M. Brummond, J. E. DeForrest, *Synthesis*, **2007**, 795.
5. T. M. V. D. Pinho e Melo, *Curr. Org. Chem.*, **2009**, *13*, 1406.
6. T. G. Back, K. N. Clary, D. Gao, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 4498.
7. M. Enomoto, T. Katsuki, M. Yamaguchi, *Tetrahedron Lett.*, **1986**, *27*, 4599.
8. S. Phadtare, J. Zemlicka, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 5925.
9. S. Ma, H. Hou, S. Zhao, G. Wang, *Synthesis*, **2002**, 1643.
10. J. Ye, S. Li, B. Chen, W. Fan, J. Kuang, J. Liu, Y. Liu, B. Miao, B. Wan, Y. Wang, X. Xie, Q. Yu, W. Yuan, S. Ma, *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 1346.
11. G. P. Boldrini, L. Lodi, E. Tagliavini, C. Tarasco, C. Trombin, A. Umani-Ronchi, *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 5447.
12. R. W. Hoffman, U. Weldmann, *Chem. Ber.*, **1985**, *118*, 3966.
13. E. J. Corey, R. Imwinkelried, S. Pikul, Y. B. Xiang, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 5493.
14. E. J. Corey, C.-M. Yu, D.-H. Lee, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 878.
15. E. J. Corey, G. B. Jones, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 5713.
16. J. Li, W. Kong, C. Fu, S. Ma, *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 5104.
17. J. Li, C. Zhou, C. Fu, S. Ma, *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 3695.
18. A. Alexakis, I. Marek, P. Mangeney, J. F. Normant, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 2387.
19. A. Alexakis, I. Marek, P. Mangeney, J. F. Normant, *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 1677.
20. J. A. Marshall, K. G. Pinney, *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 7180.
21. N. Krause, A. Hoffmann-Röder, J. Canisius, *Synthesis*, **2002**, *12*, 1759.
22. N. Krause, A. Hoffmann-Röder, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 11671.
23. J. M. Aurecochea, M. Solay, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 2501.
24. J. M. Aurecochea, E. Alonso, M. Solay, *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 3833.
25. J. S. Cowie, P. D. Landor, S. R. Landor, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1969**, 541.
26. J. S. Cowie, P. D. Landor, S. R. Landor, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1973**, *1*, 720.
27. M. Nakano, N. Furuichi, H. Mori, S. Katsumura, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 7307.
28. C. Darcel, C. Bruneau, P. H. Dixneuf, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 1845.
29. C. Darcel, S. Bartsch, C. Bruneau, P. H. Dixneuf, *Synlett*, **1994**, 457.
30. S. Hoff, L. Brandsma, J. F. Arens, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1968**, *87*, 916.
31. S. Hoff, L. Brandsma, J. F. Arens, *Trav. Chim. Pays-Bas*, **1968**, *87*, 1179.
32. S. Hormuth, H.-U. Reissig, *Synlett*, **1991**, 179.
33. S. Hormuth, H.-U. Reissig, D. Dorsch, *Liebigs Ann. Chem.*, **1994**, 121.
34. R. Zimmer, *Synthesis*, **1993**, 165.
35. J. A. Marshall, Y. Tang, *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 3233.
36. V. Mark, *The Uncatalyzed Rearrangements of Tervalent Phosphorus Esters*, in: *Selective Organic Transformations*, B. S. Thyagarajan (Ed.), John Wiley & Sons, New York, **1970**, pp. 319-437.
37. P. D. Landor, in: *The Chemistry of the Allenes*, Vol. 1, S. R. Landor (Ed.), Academic Press, New York, **1982**, pp. 174-178.
38. R. W. Saalfrank, C.-J. Lurz, in: *Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl)*, H. Kropf, E. Scheumann (Eds.), Thieme, Stuttgart, **1993**, pp. 2959-3102.
39. A. S. K. Hashmi, *Synthesis of Allenes*, in: *Modern Allene Chemistry*, Vol. 1, N. Krause, A. S. K. Hashmi (Eds.), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**, pp. 3-50.
40. R. S. Macomber, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 3072.
41. S. E. Denmark, J. E. Marlin, *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 1003.
42. B. Cai, G. M. Blackburn, *Synth. Commun.*, **1997**, *27*, 3943.
43. R. W. Saalfrank, M. Haubner, C. Deutscher, U. Bauer, *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 2367.
44. A. P. Boiselle, N. A. Meinhardt, *J. Org. Chem.*, **1962**, *27*, 1828.
45. V. Mark, *Tetrahedron Lett.*, **1962**, *3*, 281.
46. K. C. Nicolaou, P. Maligres, J. Shin, E. de Leon, D. Rideout, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 7825.
47. M. L. Curfin, W. H. Okamura, *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 5278.
48. J. W. Grissom, D. Huang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1995**, *34*, 2037.
49. C. Darcel, C. Bruneau, P. H. Dixneuf, *Synthesis*, **1996**, 711.
50. O. de Frutos, A. M. Echavarren, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 7941.

51. M. Schmitt, J.-P. Steffen, M. Maywald, B. Engels, H. Helten, P. Musch, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2001**, 2, 1331.
52. V. K. Brel, *Synthesis*, **1999**, 463.
53. V. K. Brel, E. V. Abramkin, *Mendeleev Commun.*, **2002**, 12, 64.
54. I. E. Ismailov, I. K. Ivanov, V. Ch. Christov, *Molecules*, **2014**, 19, 6309.
55. I. E. Ismailov, I. K. Ivanov, V. Ch. Christov, *Bulg. Chem. Commun.*, **2014**, 46, Special Issue A, 39.
56. I. E. Ismailov, I. K. Ivanov, V. Ch. Christov, *Molecules*, **2014**, 19, 11056.
57. V. Ch. Christov, I. E. Ismailov, I. K. Ivanov, *Molecules*, **2015**, 20, 7263.
58. V. Ch. Christov, I. E. Ismailov, I. K. Ivanov, *Int. J. Rec. Sci. Res. (IJRSR)*, **2015**, 6, 4526.
59. D. N. Robertson, *J. Org. Chem.*, **1960**, 25, 931.
60. M. Miyashita, A. Yoshikoshi, P. A. Griecolb, *J. Org. Chem.*, **1977**, 42, 3772.
61. M. C. Joshi, P. Joshi, D. S. Rawat, *ARKIVOC*, **2006**, (xvi), 65.
62. B. Partha, I. Pimkov, *US Patent 8378123 B2*, **2011**.
63. V. Ch. Christov, H. H. Hasanov, I. K. Ivanov, *Global J. Pure Appl. Chem. Res.* **2015**, 3, 20-36.
64. H. H. Hasanov, I. K. Ivanov, V. Ch. Christov, *Heteroatom Chem.*, **2017**, 28, e21357.

Hasan Hasanov
 Konstantin Preslavsky University of Shumen
 Department of Chemistry
 115 Universitetska Str., 9700 Shumen
 e-mail: h.hasanov@shu.bg

Ali Mustafa
 Konstantin Preslavsky University of Shumen
 Department of Chemistry
 115 Universitetska Str., 9700 Shumen
 e-mail: elaemren@abv.bg

Feyme Halil
 Konstantin Preslavsky University of Shumen
 Department of Chemistry
 115 Universitetska Str., 9700 Shumen
 e-mail: feymelevant@abv.bg

Ismail Ismailov
 Konstantin Preslavsky University of Shumen
 Department of Chemistry
 115 Universitetska Str., 9700 Shumen
 e-mail: i.ismailov@shu.bg

Ivaylo Parushev
 Medical University-Varna
 Faculty of Dental Medicine
 Department of Clinical Medical Sciences
 55 Marin Drinov Str., 9002 Varna
 e-mail: Ivaylo.Parushev@mu-varna.bg

Ivaylo Ivanov
 Konstantin Preslavsky University of Shumen
 Department of Chemistry
 115 Universitetska Str., 9700 Shumen
 e-mail: i.ivanov@shu.bg

Valerij Christov
 Konstantin Preslavsky University of Shumen
 Department of Chemistry
 115 Universitetska Str., 9700 Shumen
 e-mail: v.christov@shu.bg



ИЗГОТВЯНЕ НА МОДЕЛ НА УЕБ БАЗИРАНО ПРИЛОЖЕНИЕ С PYTHON

Божидара Узунска и Егнар Йоздикилилер

MODELING A WEB-BASED APPLICATION WITH PYTHON

Bojhidara Uzunska and Egnar Özdikililer

ABSTRACT: Web applications are widely available on different types of devices, only a web browser and internet connection are required. This paper aims to obtain a generalized idea of the interdependence of different technologies used in web development. During the process of creating a web application, it is necessary to create concepts and designs that support the development of the web application. There are many important steps and decisions to be made starting from the description of the idea through the functionality of the final product. As a result of the size and scope of the idea, different resources and time may be required to develop the web application. Developers should plan accordingly..

Key words: web applications, web development, web technologies, python

Въведение

Съвременното общество разчита на Интернет. Уеб приложенията са широко достъпни на различни видове устройства, необходими са само уеб браузър и интернет връзка. Най-използваните приложения са в сферата на комуникацията, забавлението и търговията.

С този труд се цели получаване на обобщена идея за взаимозависимостта на различните технологии, използвани при уеб разработка, както и на по-задълбочено знание за мястото на различните технологии в този процес.

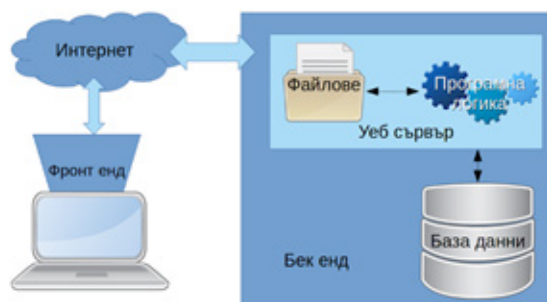
Настоящата разработка се концентрира над етапите при изработване на уеб приложение – идея, дизайн, код, тестване, експлоатация и поддръжка. Технологиите, които се изследват включват Python, HTML, CSS, JavaScript, Django, PostgreSQL, React и други. Получените изходни данни след анализа и проучването на процеса на разработка показват реалните първи стъпки от този процес.

Характеристика на уеб базирано приложение

Всеки човек, използвал Интернет, е използвал и някакво уеб приложение. За обикновения потребител разликата между уеб сайт и приложение често не е очевидна. И до двете имаме достъп като отворим URL в браузър.

Уеб базираното приложение може да е просто като контактна форма за обратна връзка или по-сложно като текстов редактор, игра и т.н. То е всякакъв вид софтуер, който се достъпва през Интернет и обменя информация чрез HTTP протокол. Обикновено се използва през браузър или чрез малко клиент-приложение, което се инсталира локално на потребителската машина.

Принципът на работа е сървър-клиент. (фиг. 1) Потребителят взаимодейства с приложението чрез потребителски интерфейс, за



Фиг. 1 Обща схема на работата на едно уеб приложение

да извърши различни действия (създаване, записване, достъпване, модифициране и изтриване на данни). Това са така наречените CRUD операции, които са и основните функции на една база данни. Тя е сърцето на всяко приложение, което трябва да обработва заявки, защото без нея то няма да е функционално.

Логическата част на приложението е тази, която се грижи за изчисленията, съхранението

на информацията и нейното по-късно използване. Тя е сървърната или още наречена бек енд. Там е и базата данни за даденото приложение. Различните бази данни използвани от бек енд са: PostgreSQL, MongoDB, MySQL, Firebase и много други. Съществуват няколко архитипа на бази данни. Те имат, както своите силни страни, така и недостатъците си.

- Първата най-проста парадигма е ключ-стойност (пример Redis, Memcache). Структурирана е като речник. Има сет от уникални ключове, които сочат към някакви стойности. Тя се пази в RAM паметта на машината за разлика от другите традиционни бази данни, които се съхраняват на твърдия диск. Този вид бази данни е много бърз, защото не се налага достъп до твърдия диск. Недостатъкът е, че са толкова опростени, че не могат да се изпълняват заявки към нея. Най-често са използвани за кеширана версия на част от друга структура с данни.

- Бази данни от типа на Apache Cassandra и Apache Hbase също са нерелационни със структура ключ-стойност. При тях може да има повече от една колона на ред. Това помага свързана информация да се съхранява на едно място. За разлика от релационните бази данни, те нямат схема, тоест могат да съдържат неструктурирана информация. Добри са в случаите, когато често се записват, но рядко се четат или обновяват. Използват се при постоянно увеличаваща се база данни. Обикновено не се използва за основна база данни.

- Документални бази данни като MongoDB, DinamoDB и Firebase Store работят на принципа на свързани документи, където всеки документ е контейнер за ключ-стойност двойки или подгрупа документи. Групираните документи се наричат колекции. Те са неструктурирани. Често използвани са при мобилни приложения и игри, IoT, CMS. Четенето на информация е сравнително бързо, но при записването се използват повече ресурси. Това ги прави неуспешни в случаите, когато информационният модел е граф.

- Релационните бази данни като PostgreSQL, MySQL, Oracle и много други са едни от най-използваните бази данни. При тях се налага изграждането на релационна схема, както за логиката, така и за концепцията. При тях се използва SQL

(structured query language), за да се изпращат заявки. Най-просто обяснено те са свързани таблици с редове и колони, наричани записи и атрибути. Те подsigуряват ACID (atomicity, consistency, isolation and durability) на данните, което означава при транзакция на данни, цялостта им е гарантирана, дори при грешка по време на процеса. Затова са най-добрите за банкови системи.

- Съществуват и други видове като граф бази данни (Neo4j), индексиращи бази данни (Solr, Elasticsearch) и други.

За представянето на информацията се грижи клиентската част или още фронт енд. Помежду си те общуват чрез API. За да изиска информация от сървър, клиента използва сървърния API. Обратното не се случва, защото няма нужда сървър да изисква информация от клиентската част. Тя се изпраща със заявката за дадения ресурс, ако е необходима. Могат да се използват различни програмни езици за създаването на програмната логика и функции – такива са: Java, C#, Node.js, PHP, Python, Ruby и други. Използването на бек енд фреймуърци ускорява създаването на уеб приложение като превръща сложни функции в абстракции, с които да работят програмистите. Те също помагат за изграждането на стабилна, по-сигурна програма. Най-известните такива са (подредени спрямо вече споменатите езици): Spring MVC, ASP.NET, Express, Laravel, Django, Ruby on Rails и други. За фронт енд се използват: HTML, CSS, JavaScript. Има създадени и фронт енд фреймуърци, от които най-популярни към декември 2020 са React, VueJs, Svelte, Angular, jQuery и други. []

Когато потребител използва дадено приложение, то изпраща заявка до уеб сървър. Сървърът изпълнява тази заявка, която може да включва задействането на скрипт. След приключването на работата му се връща отговор на клиент-машината с резултата от скрипта. Ако в отговора на заявката се съдържа друг скрипт, то той се задейства в браузъра (използвайки JavaScript езика).

Предимствата на уеб приложенията са няколко:

- Могат да бъдат използвани на различни платформи. Не се налага да бъде създадено отделно приложение за всяка операционна система.

- Интерфейсът им не се променя независимо от операционната система.

- Веднъж обновено до по-нова версия върху сървъра, всички клиенти имат достъп до обновеното приложение.

- Тъй като обработката на данните става на сървъра, те могат да бъдат достъпни от различни устройства без да се налага трансфер на файлове.

- Използването на облачни услуги за реализацията на уеб приложения ги прави достъпни денонощно и улеснява мащабирането на проекта.

Някои недостатъци, обаче, са:

- Ограничената производителност, тя зависи от доставчикът на услугата и от скоростта на интернет връзката

- Необходима е непрекъсната връзка с Интернет, иначе не може да се използва даденото приложение.

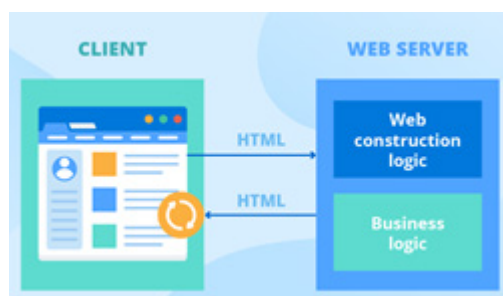
- За разлика от традиционният начин на разпространение и използване на софтуер, при който със закупуването на лиценз, се получава цялата програма и може да се използва неограничено във времето, дори и след фалит на създалата го компания, или след спирането на поддръжката ѝ. При уеб приложенията, това не е така, в случай, че компанията реши да извади програмата от пазара. Обикновено при такава ситуация с предизвестие се приканват клиентите да свалят данните си, преди да бъдат загубени.

Когато говорим за архитектура на уеб приложение, може да се имат предвид две неща – физическата архитектура (начинът, по който е изградено приложението и отделните му компоненти) и логическата архитектура (начинът, по който си общуват фронт енда и бек енда).

Физическата архитектура се фокусира над броя на сървърите и инстанциите на базите данни. От това се влияе бъдещата производителност и устойчивост на приложението. Рядко се използва един и същи сървър за уеб сървър и за съхранение на базата данни. Това е рисковано, защото, ако има проблем с този сървър, цялото приложение става недостъпно. При две инстанции на уеб сървъра и на базата данни се постига сравнителна устойчивост. Такива типове архитектура се наричат монолитни. По-нова концепция представляват микро услугите (microservices) и „безсървърните“ (serverless) приложения. При тях приложението се раздробява на по-малки компоненти, наречени услуги, които могат да работят независимо едни от други. Това улеснява мащабирането на отделни части на приложе-

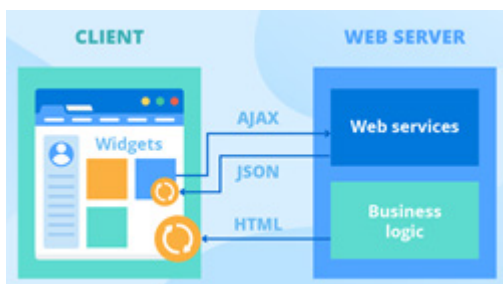
нието, когато се налага без да се множи ненужния код. Намалява се и излишното използване на сървърни ресурси. Наричат се безсървърни, защото обезпечаването на програмите става не от централен сървър в общия смисъл, а от визуализирани такива. Различните части на едно приложение може да се намират на различни физически машини, но да работят като едно цяло.

Според основната логическа архитектура на уеб приложения, сървър, състоящ се от логика за изграждане на уеб страници и бизнес логика, взаимодейства с клиент, като изпраща пълна HTML страница. (фиг. 2.1) За да види актуализация, потребителя трябва да презареди напълно страницата или, с други думи, да накара клиента да изпрати заявка за HTML страница до сървъра и да зареди отново целия си код. Този тип архитектура е силно защитена, тъй като цялата логика, функционалност и данни се съхраняват на сървъра и потребителят няма достъп до тях. Въпреки това, поради постоянното презареждане на съдържанието и тежкия обмен на данни, тази логическа архитектура е по-често използвана за статични уеб сайтове. Този модел е остарял и все по-рядко се използва.



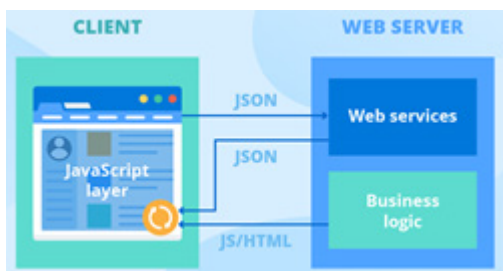
Фиг. 2.1 Архитектура: клиент – сървър [12]

Негов наследник е обектната архитектура. При този тип логиката за изграждане на уеб страница се заменя с уеб услуги и всяка страница на клиента има отделни обекти. (фиг. 2.2) Изпращайки AJAX заявки до уеб услуги, тези обекти могат да получават парчета данни и да ги показват без да презареждат цялата страница. Този тип е по-динамичен, удобен за мобилни устройства. Подобни са и приложения на една страница (SPA - single page application). При тях уеб страницата на приложението се зарежда само веднъж.



Фиг. 2.2 Обектна архитектура клиент-сървър[12]

От страната на клиента тази страница има JavaScript слой, който може свободно да комуникира с уеб услуги на сървъра и използвайки данните от уеб услуги да актуализира видимата информация в реално време. (фиг. 2.3) Парчетата данни, прехвърлени от сървъра към клиента тук, са минимални, особено в сравнение с първия тип. От скоро навлиза и идеята за прогресивни приложения (PWA) - могат да бъдат описани като SPA за мобилни устройства, които въвеждат допълнителни функции като повишена скорост на производителност, напомнящи известия, офлайн функционалност и други. Тези функции имат за цел да подобрят използваемостта на уеб приложенията на мобилни устройства.



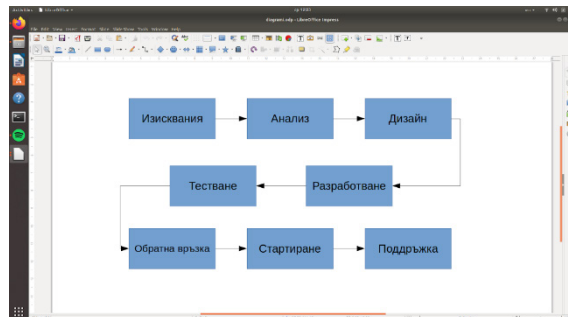
Фиг. 2.3 Архитектура за обмяна на данни клиент - сървър при прогресивни приложения [12]

Процес на изготвяне на уеб базирано приложение

За успешното създаване на уеб приложение трябва да се следват определени стъпки и насоки. (фиг. 3) Това осигурява фокус по време на изпълнението, по-кратки срокове за завършване, по-лесно дебъгване, по-добра организация на кода и отделните модули от програмата. Това е и причината те да са утвърдени в практиката.

По думите на д-р Анджела Ю, част от екипа на TheLondonAppBrewery, първата стъпка на един успешен проект е да има работеща идея, тя да решава даден проблем – било то ежедневен

на задачата е важно още в самото начало. Това поставя границите на проекта, целта, необходимите ресурси за изпълнението. Идеята на проекта трябва да е ясно и конкретно формулирана, защото по-нататък ще послужи за пътеводител на проекта.



Фиг. 3 Схема на процеса на разработка на уеб приложение

Преди писането на код, втората стъпка е да се създаде описание на работния процес и да се измисли оптималният начин за използване на даденото приложение. Това са конкретните стъпки, през които един потребител трябва да мине, за да получи решението на „проблема“ си.

Следваща стъпка е изготвянето на прототип на приложението. Той е макетът, по който ще се изгради логическата част на приложението. На този етап се рамкират дизайнът за потребителския интерфейс – wireframe. С тази рамка може да се изчистят скрити бъдещи проблеми, недостатъци и т.н. С програмата POP - Prototyping on Paper, могат да се създадат интерактивни модели на уеб приложението. Това позволява то да бъде тествано, още преди да е написан кодът за него, както и да бъде представено на потенциални клиенти. Figma, Sketch и Proto.io са други дигитални алтернативи за създаване на потребителски дизайн и прототип.

Четвърта стъпка е свързана със събиране на обратна връзка за идеята и изпълнението ѝ. По този начин се използват и други гледни точки, което помага за успеха на приложението.

Дотук подготовката е стабилна и може спокойно да се започне с избирането на подходящи технологии за проекта. В днешно време има много готови инструменти, които да се имплементират, вместо да се пишат наново. Не само че повечето са безплатни или с отворен код, а и са администрирани от много програмисти по целия свят, които също ги използват. Това гарантира, че при появата на бг

бързо ще се намери решение. Избраните технологии трябва да са съвместими и достатъчни за изпълнението на проекта, както и за бъдещо разширение. Важните технически решения, свързани с бек енда обхващат въпроси като:

- Как да се удостоверяват потребителите?
- Каква база данни да се използва?
- Как ще бъдат интегрирани отделните части?
- Как да бъде качен и пуснат кода на сървър?
- Каква ще е политиката за сигурност?
- Как ще се събират статистически данни за бизнес анализ?

След като се отговори на тези основни въпроси, може да се реши, че най-добрият вариант е използването на бек енд услуга като BaaS (backend as a service). Пример за такава е Firebase от Google. Тя е допълнение към Google Cloud услугите даващи сървърна инфраструктура. Общо казано е SDK (software development kit), който улеснява свързването на фронт енда на приложение към Google Cloud бек енда. Използваните хранилища, бази данни, сървъри и т.н. са организирани по проекти във Firebase. По този начин с един бек енд могат да работят едновременно няколко приложения, включително мобилни.

При избирането на база данни трябва да се вземе предвид вида на данните, които ще се съхраняват и как ще бъдат използвани – дали многократно ще се четат, ще се записват или и двете. Схемата CAP (Consistency, Availability, Partition-Tolerance) (фиг. 4) помага при избора на база данни, тъй като насочва вниманието към различните изисквания, които може да има системата, която изграждаме. Също така е препоръчително да се следва често повтаряният в ИТ средите - KISS подход (Keep It Simple Stupid), защото не винаги се налага използването на база данни за определени задачи.



Фиг. 4 Схемата на силните и слабите страни на три примерни бази данни

Следващата стъпка е самото програмиране и свързване на отделните части от уеб приложението. Бек ендът е най-трудоемката част от процеса. Основната му функция е предоставя на HTTP крайни точки за фронт енда, да удостоверява потребители, да оторизира достъпа до определени данни, да изпраща информация към потребителя и др.

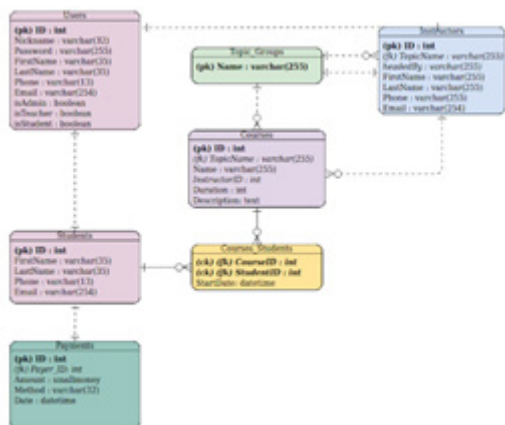
Тестването на уеб приложението е един непрекъснат процес, който се случва по време и след фазата на програмиране. Може да се създадат автоматизирани тестове, вместо ръчни такива. Те включват проверка на функционалността, използваемостта, съвместимостта, тестове за сигурност и производителност на уеб приложението. Обратна връзка от потребители също помага в процеса на изграждане.

Финалната стъпка е хостването на приложението на сървър, така че то да бъде достъпно за потребителите. Най-модерният начин за това е използването на облачни услуги. Така единствената грижа на програмиста е кодът да работи, а за инфраструктурата се грижи доставчикът на услугата. Това е удобен и сигурен начин за споделяне на приложението със света. Другият вариант е да бъде самостоятелно хоствано на частни сървъри. При големи приложения се налага използването на повече сървърна мощ като сървърът с базата данни се отделя. В зависимост от избраната архитектура за приложението може да се наложи и то самото да бъде разбито на микро услуги, които да работят на различни сървъри.

Моделирането на приложението ни предоставя инструменти, с които да хванем пропуски и недостатъци на идеята още преди тя да бъде осъществена. Такива инструменти са ERD диаграмата на базата данни (фиг. 5), клас диаграмата, физическата и логическата схема. За дизайн на приложението се създават редица прототипи на отделните екрани, създава се . Функциите, които се залагат при разработката играят основна роля в създаването на уникална идентичност за уеб приложението за електронно обучение. Всяка функция на приложението трябва да се фокусира върху създаването на безпроблемното му използване на потребителя и решаването на неговия „проблем“.

Разработката на уеб приложения е процесът, свързан с изграждането на уеб приложение, но не само, към него се включва много по-голяма част, която е подготовка и проучване. Той е по-фокусиран върху взаимодействието с

браузъра, отколкото със стандартните инженерни процеси. Повечето случаи на разработване на уеб приложения включват дефиниране на проблема, разработване на решението, проучване на действителни потребители, избор на език, фреймуърк и инструменти и накрая, изграждане и тестване на уеб приложението - в повечето случаи с потребители, които да дават обратна връзка.



Фиг. 5 ERD на базата данни на примерно приложение

Python е прогресивно предпочитан език и широко използван език за програмиране на високо ниво на програмиране с общо предназначение. Често се използва от системни администратори, инженери за машинно обучение, разработчици на десктоп и уеб сайтове и учени по данни. Той е лесно разбираем и същевременно мощен език за разработване на всякакъв тип софтуерна система. Изградена е голяма общност около него, която се грижи за предоставянето на допълнителна подкрепа за програмисти, които търсят помощ. Има много ресурси, които да помогнат на начинаещи, както и на напреднали програмисти.

Многото написани фреймуърци представят програмни библиотеки, които улесняват изграждането на мащабируеми, лесни за поддържане и надеждни уеб приложения чрез предоставяне на код за повторно използване или разширения за редовни операции.

За този проект може да се използва Django за бек енд фреймуърк, защото съдържа всички необходими инструменти като удостоверяване, администриране, логове, връзка с база данни и други. Има вградени опции за защита и сигурност – възпрепятстващи SQL „инжекции“ и други зловредни скриптове. Широко използван е, както за големи проекти, така и за

скалируеми. Той работи с релационни бази данни. Затова към проекта ще се използва PostgreSQL за основна база данни. Не е задължително, но може да се използва фронт енд фреймуърк като React.js, за да се изгради красив и динамичен интерфейс.

Изводи и заключение

Разработката на уеб приложения е много обширна и креативна област от информационните технологии. Тя е също така и бързо развиваща се. Постоянно се създават нови технологии, които да улеснят програмистите и да намалят времето нужно за разработка на уеб приложения.

Използването на Python за уеб приложения е непопулярно в България, но в други технологично развити страни е водещ език за програмиране. Той е гъвкав, мощен и лесен за разбиране. Към него са създадени много фреймуърци, библиотеки, модули, темплейти и т.н. и продължават да бъдат развивани.

Началните стъпки от процеса по създаване на уеб приложение са общи без значение кой език или технология се използва. При тях се набляга на подготовката, планирането и проучването, които са ключ към успеха на даденото приложение. При избора на специфични технологии трябва да се вземе предвид насочеността на проекта и специфичните изисквания и налични ограничения. Python и Django са многопрофилни и пасват на много различни задачи и проекти. Тъй като е популярен език в света, има много хора, които го използват, поддържат и създават учебни материали. Това е особено ползотворно и в помощ на начинаещите.

Уеб приложенията са изключително популярни заради широката си достъпност от всякакви операционни системи и устройства. В Интернет съществуват различни инструменти, които да подпомогнат уеб разработчиците и дизайнерите. Това прави уеб разработката една от най-популярните области за програмисти. Тя изисква знания в различни сфери като бази данни, сървъри, киберсигурност, бек енд, фронт енд, фреймуърци, библиотеки и прочие.

Литература

1. Fielding, Roy Thomas. Architectural Styles and the Design of Network-based Software Architectures. Doctoral dissertation, University of

California, Irvine, 2000
https://www.ics.uci.edu/~fielding/pubs/dissertation/rest_arch_style.htm (последно достъпен на 25.02.2021 г.)

2. Surbhi S, 8.06.2019, Difference between Windows and Web Application
<https://keydifferences.com/difference-between-windows-and-web-application.html> (последно достъпен на 25.02.2021 г.)

3. Software Architecture in Practice- 3rd Edition: <http://amzn.to/2CPO1g6> Pattern-Oriented Software Architecture- Volume1: <http://amzn.to/2BlgTrz>

4. Daniel Nations, 25.06.2020, What Is a Web Application?
<https://www.lifewire.com/what-is-a-web-application-3486637> (последно достъпен на 25.02.2021 г.)

5. Difference Between Web Application and Web Services
<https://anydifferencebetween.com/difference-between-web-application-and-web-services/> (последно достъпен на 25.02.2021 г.)

6. Anastasia Yaskevich, 12.12.2017, Web application framework: What it is, how it works, and why you need it?
<https://www.scnsoft.com/blog/web-application-framework> (последно достъпен на 25.02.2021 г.)

7. Joe Johnston, 23.04.2019, How to build a web app: A beginner's guide (2021)
<https://www.budibase.com/blog/how-to-make-a-web-app/> (последно достъпен на 25.02.2021 г.)

8. ProBytes Software, 15.11.2019, What is a Web Framework?
[https://www.probytes.net/blog/what-is-a-web-](https://www.probytes.net/blog/what-is-a-web-framework/)

[framework/](#) (последно достъпен на 25.02.2021 г.)

9. Kenneth Reitz & Real Python 2011-2021, Web Applications & Frameworks
<https://docs.python-guide.org/scenarios/web/> (последно достъпен на 25.02.2021 г.)

10. Aaron Xie, 15.04.2020, A Complete Guide to Web Development in Python,
<https://www.educative.io/blog/web-development-in-python#web-dev> (последно достъпен на 25.02.2021 г.)

11. Hiren Dhaduk, 5.01.2021, Best Frontend Frameworks of 2021 for Web Development,
<https://www.simform.com/best-frontend-frameworks/> (последно достъпен на 25.02.2021 г.)

12. Anastasia Yaskevich, 10.02.2020, Web application architecture: Components, models and types
<https://www.scnsoft.com/blog/web-application-architecture> (последно достъпен на 25.02.2021 г.)

Божидара Узунска
Висше училище по телекомуникации и пощи
Катедра „Информационни технологии“
София, 1700
ул. „Академик Стефан Младенов“ № 1
e-mail: bojidara_uzunska@abv.bg

Egnar Ozdakililer
Istanbul Technical University, Faculty of Aeronautics
and Astronautics Katar Caddesi, Maslak Kampüsü,
Sarıyer/İstanbul
ORCID ID: 0000-0002-9042-2324
e-mail: ozdakililer@itu.edu.tr



ОПРЕДЕЛЯНЕ НА БЕЛТЪК В ХРАНИ. ПРОТЕИНИТЕ ВАЖНА СЪСТАВКА В РАЦИОНАЛНОТО ХРАНЕНЕ

Галина Григорова

DETERMINATION OF PROTEIN IN FOOD. PROTEIN AN IMPORTANT INGREDIENT IN A BALANCED DIET

Galina Grigorova

ABSTRACT: *This paper presents a physicochemical study to determine of protein in food. Proteins are a basic building material in the food intake of a person, which determines their role in the period of growth and development. Knowing the composition of food is important for shaping formation a rational diet. The study included 26 food products. The protein content is determined and the importance of proteins in the rational diet of a person in analyzed. The date presented can be used to preparing a diet.*

Key words: protein, food, balanced diet

Въведение

Основната функция на белтъците е градивна. Те са най-важна съставна част на протоплазмата, ядрото, органелите и мембраните на клетките, телесните тъкани и течности. Като основна съставка на ензими, хормони, невромедиатори, играят важна функция в жизнените процеси. Белтъците са единствен източник на хранителен азот за организма. При биологичното си окисление 1g белтък отделя енергия в количество 17 kJ (4 kcal). Относителният дял на енергията от белтъци от общия енергиен внос е 10–15% [1]. Аминокиселините са основна структурна единица на белтъците, което обуславя хранителната им стойност [1,2]. В химично отношение белтъците са сложни полимерни съединения, чийто молекули се състоят от полепептидни вериги на алфа –аминокиселини. За храненето на човек значение имат 20 аминокиселини [3]. Всеки източник на белтък има определен състав от тези аминокиселини. Количеството белтък е нужно за да се изгради база данни за състава на храните. Определянето на количеството белтък се базира на стойността на общия азот. Използва се определен фактор на превръщане за разричните групи храни [4]. В практиката най-широко използваният метод за определяне на количество азот в храни е методът на Келдал. Затова той се използва

както в лабораторната практика така и при обучение на студенти. Най – общия метод за определянето съдържанието на белтък е [5]. Всеки хранителен продукт има специфичен фактор за превръщане. За млякото - 6.38. При липса на специфични фактори за храни се прилага универсалният фактор 6.25 [6]. Същността на метода е разлагане на тествата доза с концентрирана сярна киселина в присъствие на катализатори за превръщане на органичен азот в амониев сулфат. Излишък от натриев хидроксид се добавя към охладената проба за освобождаване на свободен амоняк и се дестилира в излишък от разтвор на борна киселина и след това се титрува със стандартен разтвор на солна киселина. Приложение на метод за определяне на общото белтъчно съдържание по Келдал се използва за различни хранителни изделия изделия.

Целта на настоящото проучване е да се определи съдържанието на белтъците в 26 хранителни продукта и да се анализирано значението им в рационалния хранителен режим на човек.

Експеримент

Материали и методи

Методите за определяне на белтъчното съдържание по Келдал са разписани в БДС стандарти. Физикохимичните анализи за определяне съдържание на белтък, са извърше-

ни по следните стандартни методики: Метод за изпитване: БДС ISO 1871 Хранителни и фуражни продукти. Методи за определяне съдържанието на белтък. [5] БДС 6231 Мляко и млечни продукти. Методи за определяне съдържанието на белтък. [7] БДС 15438 Консерви месни. Методи за определяне съдържанието на белтък. [8] БДС 3412 –Хляб и хлебни изделия. Методи за определяне съдържанието на белтък. [9] БДС 9374 Месо и месни продукти. Методи за определяне съдържанието на белтък. [10]

Изисквани технически средства

При извършване на анализите са използвани калибрани технически средства. Везна с неавтоматично действие-електронна, 440-45 N, Kern. Проверка на везната се прави преди работа с еталонни теглилки Kern, Deutschen Akkreditierungsstelle DAkkS, Klasse F1, Система Келдал - инфрачервен нагревател блок InKje 625M, производител Behr Апарат за дестилация по Behr distillation unit S1

Начин на работа

Работи се по верифицирани методики. Принципа се основава на хидролиза (изгаряне) на пробата с концентрирана сярна киселина, с катализатор меден (II) сулфат с цел превръщането на органичния азот в амониен йон. Алкализиране и дестилиране на освободения амоняк в излишък от разтвор на борна киселина. Титриране със солна киселина за определяне на свързания с борната киселина амоняк. Изчисляване на азотното съдържание от количеството на образувания амоняк

Резултати и обсъждане

Получените резултатите от физикохимичните анализи за определяне на белтък в хранителни продукти, са представени на таблица 1. Независимо, че хлебните изделия, не са в списъка на храните – източници на белтъци, получените резултати показват, че в тях се съдържа макар и малко количество белтък. Естествено най-високо е количеството на белтък в храните от групата на мляко и млечните продукти.

Таблица 1. Лабораторно определяне на протеин в 26 хранителни продукта

Вид хранителен продукт	Белтък, % $\pm U$
Мляко и млечни продукти	3,76
Кисело мляко краве	$\pm 0,17$
Кисело мляко овче	$7,13 \pm 0,20$
Сирене краве	$19,0 \pm 0,25$
Сирене биволско	$15,09 \pm 0,18$
Кашкавал краве	$25,27 \pm 0,23$
Кашкавал биволски	$21,2 \pm 0,20$
Кашкавал кози	$27,88 \pm 0,17$
Кашкавал овчи	$27,72 \pm 0,21$
Месо и местни продукти	
Кайма смес	$9,41 \pm 0,31$
Пилешки бут замразен	$20,05 \pm 0,28$
Пилешки дроб	$16,93 \pm 0,26$
Пилешко филе	$21,12 \pm 0,20$
Суджук	$47,02 \pm 0,20$
Хляб и хлебни изделия	
Баница	$9,20 \pm 0,26$
Кифла с мармалад	$7,23 \pm 0,18$
Козуначено руло	$7,86 \pm 0,20$
Рогче	$6,81 \pm 0,17$
Палачинка с месо	$10,76 \pm 0,18$
Палачинка	$4,10 \pm 0,17$
Чийз кейк	$5,55 \pm 0,25$
Тулумбички	$3,03 \pm 0,31$
Еклер	$4,86 \pm 0,28$
Пъдпъдъчи яйца	$11,24 \pm 0,29$
Риба и рибни продукти	
Барбун маринован	$15,57 \pm 0,20$
Хамсия замразена	$14,53 \pm 0,21$
Рапани със сос	$18,22 \pm 0,25$

Рационалното хранене е здравословното и оптимално хранене, което съответства на нуждите на организма от енергия и хранителни вещества с определен количествен и качествен състав, задоволяващ пластичните нужди и растежа. За да бъде рационално едно хранене, то трябва да отговаря на определени принципи. Освен принцип е че храната трябва да съответства на енергийните потребности на организма, друг важен принцип стоящ в основата на рационалното хранене е принципа на балансираността, чрез който се осигурява оптимално задоволяване на организма с хранителни и биологично активни вещества в строго определено количествено и качествено съотношение. В храната трябва да се съдържат балансирани пропорции основни хранителни вещества белтъци (Б), мазнини (М) и въглехидрати (В). При храненето на израсналите индивиди се препоръчва количествено отношение Б:М:В да бъде 1:1:4. При усилен растеж може да се завиши количеството на протеините, при хора извършващи тежка физическа работа може да се повиши дяла на въглехидратите. При хранене на хора в напреднала възраст може да се намалят мазнините. Определянето на хранителната стойност на е основен показател за качеството на хранителните продукти. Чрез информацията на енергийната стойност се представят важни характеристики на произвежданите храни. Необходимостта от енергия за нормалното функциониране на човешкия организъм е различна при всеки отделен индивид. Важни фактори са възрастта, здравословното състояние и физическата активност, което е свързано с регулиране на енергийния прием. Разгледана в този аспект, енергийната стойност се явява един от базовите показатели за определяне на научнообосновани физиологични норми за правилното хранене на населението.

Световната здравна организация СЗО определя здравето, като състояние на пълно физическо, психическо и социално благополучие на индивида и групата, то е способност за реализиране на стремежите и задоволяване потребите ни за живот и хармоничното взаимодействие със заобикалящата среда. Под влияние на динамично променящите си условия в живота на човека, той също се променя. Един от основните фактори, който влияе на

здравето на човека са рационалното хранене и двигателната активност. Храненето е основен физиологичен процес необходимо за благоприятното развитие на организма, както и за поддържането на жизнените му процеси.

Заклучение

Получените данни могат да послужат като доставка на аналитични данни за нутриентите в храната. Изследването на белтък е отличителен белег за фалшификация на храните. Получените данни могат да се използват при оформяне на хранителен режим на подрастващи, които се нуждаят от по-колямо количество белтък.

Литература

1. Попов, Б., П. Николова. Физиология и биохимия на храненето. Хранителни вещества. Антивитамины, Белтъчини. – В: *Хигиена и екология*. Том 1.1. изд.Под ред. на Д. Цветков. София: Знание, 1999, с.145
2. Van J. Camp. Nitrogen, protein and amino acids. EuroFIR Composition course, 2008
3. Нестерова В., *Хигиена на храненето и хранително законодателство* 2014
4. FAO/WHO. Energy and protein requirements. Report of a Joint FAO/WHO Ad Hoc Expert Committee, 1973, FAO Nutrition Meetings Report Series No.52 Rome, FAO
5. БДС 1871 Хранителни и фуражни продукти. Методи за определяне съдържанието на белтък
6. Гюрова, Д., Т. Панев. Съвременни бази данни за химичен състав на храните – необходимост и критерии за изграждане. Науката за хранене, между дискусиите и доказателствата. Състав и безопасност на храните. Оценка на риска. Генно модифицирани храни, 2012, 53–55
7. БДС 6231 Мляко и млечни продукти. Методи за определяне съдържанието на белтък
8. БДС 15438 Консерви месни. Методи за определяне съдържанието на белтък
9. БДС 3412 –т.3.9 Хляб и хлебни изделия. Методи за определяне съдържанието на белтък
10. БДС 9374 Месо и месни продукти. Методи за определяне съдържанието на белтък



ВЪЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВИ ЗА ОПОЛЗОТВОРЯВАНЕ НА ОРГАНИЧНИ ХРАНИТЕЛНИ И НЕХРАНИТЕЛНИ ОТПАДЪЦИ ЗА ПРОИЗВОДСТВО НА БИОГО- РИВА

Галина Йорданова, Добромир Йорданов

OPPORTUNITIES AND PERSPECTIVES FOR RECOVERY OF ORGANIC FOOD AND NON-FOOD WASTES TO BIOFUEL PRODUCTION

Galina Yordanova, Dobromir Yordanov

ABSTRACT: The present study presents a critical literature review of the production of biofuels from different types of biomass, a comparison of the different processes used for pre-treatment of biomass and their effects on biofuel yields. The future of the energy market will include more and more biofuels based on non-food raw materials. The perspectives for production on an industrial scale are the biofuels of the second, third and fourth generation, i.e. microorganisms associated with the development of new strains, producing large quantities of liquid and gaseous biofuels. Another key area of work in the energy sector will be the reduction of carbon dioxide emissions, both through the life cycle of non-food raw materials for biofuels and new strains of microorganisms, and through the global application of technologies to capture major sources of greenhouse gas emissions.

Key words: biofuel, perspectives, biodiesel, biohydrogen, bioethanol

Въведение

Нарастващото население на планетата изисква повече енергийни доставки за подобряване на качеството на живот. Биогоривата могат да бъдат един от източниците за задоволяване на глобалното търсене на енергия. Изкопаемите горива се използват като основен източник на енергия в продължение на много години, използването им обаче е неустойчиво и причинява екологични проблеми, свързани с изгарянето им [1-3]. Следователно това предизвикателство може да позволи конвенционалните горива да бъдат заменени от възобновяемите енергийни източници като биогорива, които са екологични такива [4-5].

Текущото производство на биогорива се основава на хранителни култури (т.е. биогорива от първо поколение), които се конкурират със земеделски земи и биоразнообразни пейзажи. Освен това производството на биогорива е свързано с няколко други влияния върху околната среда, които могат пряко и косвено да окажат въздействие върху биологичното разнообразие. Тези фактори на влияние [6] включват пряка и непряка промяна в земеползването [7], емисии на парникови газове [8], емисии на замърсители (т.е. от

пестициди, торове, производство на биогорива и крайно използване на биогорива) [9], изчерпване на водата [10], деградация и ерозия на почвата [11] и въвеждане на инвазивни видове [12]. Въздействието на биогоривата върху биологичното разнообразие и екосистемите, обаче зависи от вида на системата за производство на биогорива и няколко фактора, свързани с нейното отглеждане и производство [7], включително: конкурентното земеползване и пространствените конфигурации на ландшафтите за отглеждане на биогорива [13], техните технологии за отглеждане и преобразуване [9], техните практики за управление на отглеждането [14], техният потенциал за инвазивност [15] и присъствието на копродукти [16-17].

Технологиите за предварително обработване на суровините за биогорива се развиват едновременно с разработването на методите, използвани за производството на биогоривата [18]. Редица модификации са приложени и в автомобилните двигатели, за да се използват биогорива като биоетанол и биодизел, тъй като те могат да се смесват с конвенционалните течни автомобилни горива (бензин и дизелово гориво) и да подобряват ефективността им. Биеводородът може да се използва и

за работещи превозни средства, но съществуват много проблеми, свързани със съхранението и транспортирането му. За предварителното обработване на различни видове биомаса са използват различни химични и физични методи, изискващи голямо количество скъпи химични реагенти и енергия. Много нови технологии, разработени днес, все още се ограничават до лабораторно получаване на биогорива, в резултат на което е необходимо да се положат още усилия за прилагането им в промишлени условия [19].

Настоящото изследване представлява критичен литературен преглед на производството на биогорива от различни видове биомаса, сравнение на различните процеси, използвани за предварително обработване на биомасата и техните ефекти върху добивите от биогорива.

Биогорива

Биогоривата се определят като органични горива, получени от земеделска биомаса чрез съвременни биологични процеси и могат да се използват за генериране на топлинна енергия чрез изгаряне или чрез използване на друга технология [20]. Според Анселм Айзентраут от Международната енергийна агенция (IEA) [21] понастоящем биогоривата осигуряват приблизително 1,5% от горивата за транспорта в световен мащаб в резултат на бързо нарастващото производство през последното десетилетие. Напоследък, за намаляване на парниковите газове и на отпадъците, се предпочитат производството на биогорива, тъй като те са леки, съдържат по-малко въглерод, и са по-високоенергийни от конвенционалните горива [19].

Биогоривата могат да бъдат класифицирани в три основни категории: биогорива от първо поколение, второ поколение и трето поколение, докато биогоривата от четвърто поколение [22] са още на етап на разработване в лабораторни условия. Биогоривата от първо поколение обикновено се произвеждат от селскостопански култури (захарна тръстика, захарно цвекло, пшеница, ориз, соево масло, слънчоглед и палмово масло и др.) [23]. Обмислянето на използването на растителни култури за храна или за биогориво може да се нарече конфликт „Храна срещу енергия“. Ето защо изследователите са избрали производството на биогорива от второ и трето поколение, които могат да бъдат получени от нехранителни култури, треви, селскостопански и хранителни отпадъци, водорасли и т.н. Про-

изводството на биогорива „второ поколение“ се фокусира главно върху използването на възобновяеми ресурси, които биха могли да помогнат да се сведе до минимум изгарянето на изкопаеми горива и да се намалят драстично емисиите на CO₂, предотвратявайки глобалното затопляне. По този начин, използването на биомаса е един от най-ефективните фактори за защита на нашата околна среда през 21 век [24]. Примери за отпадъци, които могат да се използват за производство на биогорива от второ поколение са твърди битови отпадъци, използвано олио за готвене, промишлени отпадъци, селскостопански отпадъци и утайки от отпадъчни води. От тях могат да се произвеждат биогорива като биодизел, биоетанол, биометанол, биобутанол, биогаз и биоводород [23]. Биогоривата от трето поколение се получават главно от водорасли. Биоетанолът може да бъде произведен от водорасли и е известен като един от най-важните възобновяеми енергийни източници [25]. Биогоривата от „четвърто поколение“, които са предимно фотобиологични горива и електро-горива, се очаква да заемат все по-голям дял от енергоносителите в бъдеще. Производството на тези биогорива (по синтетичен биологичен път) е нова технология, която се основава на директното превръщане на слънчевата енергия в гориво чрез използване на суровини, които са неизчерпаеми, евтини и широко достъпни [22]. Биогоривата от първо, второ и трето поколение се получават от биомаса, докато биогоривата от четвърто поколение са продукт на жизнения цикъл на генномодифицирани микроводорасли и цианобактерии [19, 26-28].

Биоводород

Биоводородът е безопасно и най-чистото биогориво, защото при използването му като гориво в топлинни двигатели или горивни клетки, единственият продукт от изгарянето му е вода [29]. Биоводородът е нетоксичен, безцветен, без вкус и мирис газ, и има способността да произвежда повече енергия в сравнение с всяко друго гориво (около 122 kJ/g) [30], а калоричността му е 143 GJ/тон [29]. Съществуват няколко метода, чрез които може да се получи биоводород, а именно: био-фотолиза на вода, фото-ферментация и ферментация в отсъствие на светлина [31]. Био-фотолизата на водата е двустепенен процес, който включва обратимо редуцируем кофактор и фото-метаболично активни мик-

роорганизми като цианобактерии и зелени микроводорасли [32]. Фотоферментацията е ферментативното превръщане на органичния субстрат в биоводород от разнообразна група фотосинтетични бактерии чрез поредица от биохимични реакции, включващи три етапа, подобни на анаеробното преобразуване [33]. При ферментацията в отсъствие на светлина, хидролизираната биомаса се подлага на ацидогенеза (образуване на $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_2$) и водородът, получен по време на ацидогенезата, се изразходва в метаногенезата, за да образува CH_4 и CO_2 . За да се увеличи добивът на водород, неговата консумация (или образуването на метан) трябва да бъде намалена [34]. Биоводородът може да се произвежда от различни суровини, като твърди битови отпадъци, утайки от отпадъчни води, целулозни отпадъци и промишлени отпадъци [19, 23, 35].

На основата на посочените по-горе методи за получаването на биоводород в настоящия момент се използват два подхода. Първият подход, известен като косвен процес [36-37], прилага потенциала на фотосинтезата за изграждане на биомаса. Натрупаната биомаса, особено въглехидратите, допълнително се превръща в биоводород чрез ферментация и/или фотоферментация. Този подход включва два отделни етапа, които се разделят или чрез пространствена реакция в два различни биореактора, или чрез редуване на фотосинтетичния и ферментационния периоди. Вторият подход се стреми да използва фотосинтезата, за да раздели водата до водород и кислород чрез директни или индиректни процеси на биофотолиза на водата. Получаването на H_2 от зелените водорасли *Scenedesmus obliquus* в светлината на биофотолизата е обект на приложни изследвания и разработки в продължение на няколко десетилетия [38]. Също така се съобщава, че едновременно производство на H_2 и отделянето на O_2 са демонстрирани в нишковидни цианобактерии *Anabaena cylindrica*, отглеждани в аргонова атмосфера [5, 39].

Фотоферментацията и ферментацията в отсъствие на светлина са два полезни метода за производство на H_2 от различни органични субстрати, най-вече въглехидрати и органични киселини. При фотоферментацията фотосинтетичните бактерии използват слънчевата светлина като източник на енергия и превръщат органичните съединения (ацетат, лактат и бутират) във H_2 и CO_2 . За разлика от зеле-

ните водорасли и цианобактериите, лилавите бактерии не могат да разделят водата на двата компонента (водород и кислород). Те обаче са способни да използват светлината в близката инфрачервена област ($> 800 \text{ nm}$). Тези свойства ги правят уникални участници в интегрираната система за пречистване на отпадни води с едновременно производство на H_2 [40]. Приносът на нитрогеназите и хидрогеназите в процеса може да варира в зависимост от експерименталните и физиологичните условия. Лилавите бактерии принадлежат към най-активните азотни фиксатори [41] и по този начин произвеждат H_2 главно чрез нитрогеназната система. Свързването на азотната фиксация с аноксигенната фотосинтеза им позволява да произвеждат H_2 на много високи нива, които се увеличават при липса или дефицит на азот. Редукторите, необходими за производството на H_2 от нитрогеназата се доставят чрез фотоасимилирането на органични киселини [5, 42].

Ферментацията в отсъствие на светлина изисква по-малко енергия в сравнение с фотоферментацията [43]. Процесът протича при факултативни или облигатни анаеробни бактерии, които консумират органично вещество [44]. Установено е, че множество фактори на околната среда, като рН на средата и наличието на метален кофактор оказват влияние върху протичането на процеса [45]. При ферментацията в отсъствие на светлина се получава освен водород и някои други видове биогорива [5, 46, 47].

Биоетанол

В настоящия момент биоетанолът е най-разпространеното биогориво, произвеждано в промишлени условия от царевица и захарна тръстика. Етанолът се смесва с бензин, и в резултат на използването му се намаляват емисиите на парникови газове, неизгорели въглеводороди, канцерогенни вещества и серен диоксид, който е основната причина за киселинните дъждове [48]. Съществува голям потенциал за производство на биоетанол от различни отпадъци и селскостопански остатъци като дървесни суровини, царевица, отпадъци от рапица, захарна тръстика, цитрусова кора, листа и сламки [19]. Предварителното обработване на биомаса с автохидролиза (експлозия с пара) дава най-висок (~84%) добив на биоетанол. Установено е, че киселинното предварително обработване е по-ефективно, тъй като хемицелулозната част от

биомасата се превръща в редуцируеми захари [19].

Водораслите са друг източник на производство на биоетанол, въпреки че могат да се използват за производство на биоводород. Водораслите съдържат около 50% липиди, на основата на които се получава биодизел, както и захари и протеини, които са суровина за биоетанол [5].

Биометанол

В настоящия момент метанолът се произвежда по химичен път, който превръща природния газ в метанол чрез процес на реформинг, синтез и дестилация. Метанолът се получава по-лесно от етанола, тъй като етанолът образува азеотроп с водата, което изисква големи разходи за пречистването му [49]. В литературата е описано производството на биометанол чрез газификация и частично окисление на въглехидратите с O_2 и H_2O [49]. Не само чрез частично окисление на въглехидратите, но и чрез реакция на окисление в биомасата се получава биометанол [5, 50].

Масштабното производство на метанол от природен газ и въглища е добре развита технология. Метанолът е ценно течено гориво и суровина за различни синтетични въглеводородни продукти. Петрохимичната промишленост използва метанол като суровина за производството на различни химикали като метилтретичен бутилов етер (МТБЕ), формалдехид, оцетна киселина и биодизел чрез транс-естерификация. Метанолът е високооктаново течено гориво, което може да се смесва с бензин и етанол, и да се използва в смес на тези компоненти в бензиновия двигател при минимални допълнителни разходи. Днес цените на метанола са конкурентни на въглеводородните горива [19, 51].

За производството на биометанол изборът на подходящи щамове микроорганизми е ключов етап. Микроорганизми от вида на метилотрофите се използват за окисляване на метан при производството на метанол. Метанът може лесно да бъде получен от целулозна биомаса, която след това се окислява до биометанол с помощта на метилотрофите [19].

Биометан

Биометанът е друго силно обещаващо биогориво поради високата си енергийна стойност. Производството на метан от различни биологични или целулозни отпадъци се счита

за перспективно поради неговите икономически и екологични ползи [52]. Получаването на метан чрез анаеробно разграждане е най-ефективният начин за генериране на енергия от биомаса по отношение на съотношението продукция/входна енергия (28,8 MJ / MJ) в сравнение с всички други технологии за производство на енергия по биологични и термохимични пътища [19, 53].

От литературата следва, че сред различните видове предварително обработване на субстрата за производството на биометан, най-често се използва алкалното третиране (с натриева основа). Също така биомасата от микроводорасли и макроводорасли представлява добър потенциал (на субстрат) за производството на биометан [19].

Биобутанол

Промишленото производство на бутанол се счита за неикономично, ако добивът му е под 25% от суровината [54]. Бутанолът може да се използва в двигателя с вътрешно горене като гориво. Тъй като е с по-дълга въглеводородна верига, тя е доста неполярна, тя е по-подобна на бензина в сравнение с тази на етанола. Доказано е, че бутанолът работи в бензинови двигатели, без никакви модификации. Подобно на етанола, върху целулозните материали се прилагат редица методи за предварителна обработка, за да се разгради сложната структура на целулозата и лигнина. Био-бутанолът обикновено се произвежда чрез микробен процес, известен като ацетон-бутанол-етанол (АВЕ) ферментация [54]. Въпреки че са разработени няколко подхода за биопереработка и ферментация, производството на биоалкохол от целулоза все още е ограничено поради икономическата неизползваемост на тези технологии. Това ограничение на разходите може да бъде преодоляно чрез на нови щамове микроорганизми, произвеждащи целулолитични и биоалкохолни напитки, и чрез използването им в консолидирана система за биопереработка (СВР) [55]. Бутанолът се използва като разтворител в козметиката, хидравличните течности, детергентите, лекарствата, антибиотиците, хормоните и витамините и като химично междинно съединение в производството на бутилакрилат и метакрилат. Използва се и като екстрагент при производството на фармацевтични продукти [56]. Ензимната хидролиза е по-ефективна сред различните предварителни

обработки на субстрата, използвани за производството на био-бутанол [19].

Биодизел

Биодизелът е алтернатива на изкопаемите горива през последните десетилетия и все повече получава вниманието в световен мащаб. Той може да бъде произведен от възобновяеми биологични материали и може да замести петролните дизелови горива. Биодизеловите горива се произвеждат чрез трансестерификация на различни животински мазнини и растителни масла, обикновено с метанол или етанол [57]. Най-използваните суровини за производство на биодизел са маслата от рапица и соя. Качеството на биодизела зависи от естествените характеристики на суровините, използвани за производството му. Биодизелът е важен поради няколко причини: (а) той може да осигури евтино и местно гориво за селските икономики; б) той е устойчив и възобновяем; и (в) производството има малко токсични отпадъци с до голяма степен биоразградими входящи и изходящи продукти [5, 58].

Биодизелът е смес от моноалкилни естери на дълговерижни мастни киселини. Поради близки горивни свойства с конвенционалния дизел, биодизелът се счита за многообещаващо гориво на бъдещето. Той може да се смесва с дизеловото гориво във всякакво отношение и да се използва в съществуващата инфраструктура [59, 60].

Използването на хранителни масла за производство на биодизеловите горива не е осъществимо в дългосрочна перспектива поради увеличаващата се пропаст между търсенето и предлагането на такива масла в много страни. Едно от възможните решения за намаляване на използването на ядливи растителни масла за производство на биодизелово гориво е използването на неядливи масла. В търсенето на по-евтини суровини през последните години все по-голямо внимание получават изследванията, свързани с използването на отпадъци от промишлеността, селското, горското стопанство и бита [61]. Една от евтините такива суровини, която е и отпадък, е утайката от кафе [62].

Третото поколение биогорива са микроводораслите, които преодоляват недостатъците на първото и второто поколение биогорива [4, 63, 64]. В днешно време фотосинтетичните микроводорасли изглеждат най-добрият кандидат за посрещане на глобалното енергийно

търсене. Изчислено е, че микроводораслите имат способността да произвеждат биодизел 200 пъти по-ефективно от традиционните култури поради бързия си растеж [4, 65]. Събирането на микроводораслите е по-лесен и бърз процес от този на сухоземните растения за производство на биогорива, а висококачествената земеделска земя не е необходима за производството на биомаса от микроводорасли [66]. Микроводораслите използват светлинна енергия, за да превръщат въглеродния диоксид в органични съединения по-ефективно от висшите растения [67], което предполага, че те са превъзходен източник за производство на биогорива [68]. Процесът на производство на биогорива от микроводорасли е сложен процес. Следва няколко етапа като култивиране, събиране, сушене, разрушаване на клетките, липидна екстракция за производство на биодизел, хидролиза, трансестерификация, ферментационна дестилация за производство на биоетанол [69]. Микроводораслите могат да бъдат разделени на пет основни групи [70]: синьо-зелени водорасли (цианобактерии), зелени водорасли, диатомови водорасли, червени водорасли и кафяви водорасли [5].

Заклучение

Бъдещето на енергийния пазар ще включва все повече и по-голямо количество биогорива на основата на нехранителни суровинни източници.

Перспективите за получаването в промишлен мащаб са на биогоривата от второ, трето и четвърто поколение, т.е. свързаните с разработването на нови щамове микроорганизми, продуциращи в големи количества течни и газообразни биогорива.

Друго основно направление в работата на енергийния сектор ще бъде намаляването на емисиите на въглероден диоксид, както чрез жизнения цикъл на нехранителните суровини за биогорива и новите щамове микроорганизми, така и чрез прилагане в световен мащаб на технологии за улавяне на основните източници на парникови емисии.

Литература

1. Allakhverdiev S.I., V.D. Kreslavski, V. Thavasi, S.K. Zharmukhamedov, V.V. Klimov, T. Nagata, et al, 2009 Hydrogen photoproduction by use of photosynthetic organisms and

- biomimetic systems. *Photochem Photobiol Sci* 8:148-56.
2. Razzak S.A., M.M. Hossain, R.A. Lucky, A.S. Bassi, H. de Lasa. 2013, Integrated CO₂ capture, waste water treatment and biofuel production by microalgae culturing-a review. *Renew Sustain Energy Rev*; 27:622-53.
3. Voloshin R.A., V.D. Kreslavski, S.K. Zharmukhamedov, V.S. Bedbenov, S. Ramakrishna, S.I. Allakhverdiev. 2015 Photoelectrochemical cells based on photosynthetic systems: a review. *Biofuel Res J*; 6:227-35.
4. Dragone G, B. Fernande, A.A. Vicente, J.A. Teixeira. 2010 Third generation biofuels from microalgae. In: Mendez-Vilas A, editor. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. *Formatex*. p. 1355-66.
5. Rodionova, M.V., R.S. Poudyal, I. Tiwari, R.A. Voloshin, S.K. Zharmukhamedov, H.G. Nam, B.K. Zayadan, B.D. Bruce, H.J.M. Hou, S.I. Allakhverdiev. 2017 Biofuel production: Challenges and opportunities. *International Journal of hydrogen energy*. 42, p. 8450-8461.
6. Correa DF., H.L. Beyer, H.P. Possingham, S.R. Thomas-Hall, P.M. Schenk. 2017 Biodiversity impacts of bioenergy production: microalgae vs. first generation biofuels. *Renew Sustain Energy Rev*; 74:1131-46.
7. Immerzeel DJ, Verweij P, Hilst F, Faaij AP. Biodiversity impacts of bioenergy crop production: a state-of-the-art review. *GCB Bioenergy* 2014; 6:183-209.
8. Fargione J., J. Hill, D. Tilman, S. Polasky, P. Hawthorne. 2008. Land clearing and the biofuel carbon debt. *Science* 319:1235-8.
9. Hill J., E. Nelson, D. Tilman, S. Polasky, D. Tiffany. 2006. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc Natl Acad Sci USA*; 103:11206-10.
10. Gerbens-Leenes W., A.Y. Hoekstra, T.H. van der Meer. 2009. The water footprint of bioenergy. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:10219-23.
11. Gregg J.S., R.C. Izaurralde. 2010. Effect of crop residue harvest on long-term crop yield, soil erosion and nutrient balance: trade-offs for a sustainable bioenergy feedstock. *Biofuels*, 1:69-83.
12. Barney J.N., J.M. DiTomaso. 2008. Nonnative species and bioenergy: are we cultivating the next invader? *Bioscience*, 58:64-70.
13. Koh L.P., P. Levang, J. 2009 Ghazoul. Designer landscapes for sustainable biofuels. *Trends Ecol Evol*, 24:431-8.
14. Fargione J.E., T.R. Cooper, D.J. Flaspohler, J. Hill, C. Lehman, D. Tilman, et al. 2009 Bioenergy and wildlife: threats and opportunities for grassland conservation. *BioScience*; 59:767-77.
15. Barney J.N., J.M. DiTomaso. 2011 Global climate niche estimates for bioenergy crops and invasive species of agronomic origin: potential problems and opportunities. *PloSOne*; 6: e17222.
16. Fargione J.E., R.J. Plevin, J.D. Hill. 2010 The ecological impact of biofuels. *Annu Rev Ecol Evol Syst*; 41:351-77.
17. Correa D.F., L. Beyer Hawthorne, E. Fargione Joseph, D. Hill Jason, P. Possingham Hugh, R. Skye. Thomas-Hall, Peer M. Schenk. 2019 Towards the implementation of sustainable biofuel production systems, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107, p. 250-263.
18. Raslavicius L., N. Striugas, M. Felneris. 2018 New insights into algae factories of the future. *Renew Sustain Energy Rev*; 81(1): p. 643-54.
19. Kumari D., Radhika Singh. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical Review, 2018 *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, p. 877-891.
20. Peskett L., R. Slater, C. Stevens, A. Dufey. 2007. Biofuels Agriculture and Poverty Reduction. Natural Resource Perspectives. Published by Overseas Development Institute (ODI), with financial support from the Swedish International Development Cooperation Agency, Sida; ©Overseas Development Institute; ISSN:1356-9228, London www.odi.org.uk/nrp.
21. Anselm E. 2010 Sustainable production of second-generation biofuels potential and perspectives in major economies and developing countries. France: Renewable Energy Division, *International Energy Agency*; [Anselm.Eisentraut@iea.org].
22. Aro Eva Mari. 2016 From first generation biofuels to advanced solar biofuels 45. Netherlands: *Springer*; p. 24-31.
23. Jeihanipour A., R. Bashiri. 2015 Perspectives of biofuels from wastes: a review. Germany: Institute of Chemical Technology and Polymer Chemistry, Department of Chemistry and Biosciences, *Karlsruhe Institute of Technology (KIT)*.
24. Chandra R., H. Takeuchi, T. Hasegawa. 2012 Hydrothermal pretreatment of rice straw biomass: a potential and promising method for

- enhanced methane production. *Appl Energy*; 94: p. 129–40.
25. Stanmore B.R. 2010 Generation of energy from sugarcane bagasse by thermal treatment. *J Waste Biomass Valoriz*; 1: p. 77–89.
26. Hays S.G., D.C. Ducat. 2015 Engineering cyanobacteria as photosynthetic feedstock factories. *Photosynth Res*; 123: p. 285–95.
27. Scaife M.A., G.T.D.T. Nguyen, J. Rico, D. Lambert, K.E. Helliwell, A.G. Smith. 2015 Establishing *Chlamydomonas reinhardtii* as an industrial biotechnology host. *Plant J*; 82: p. 532–46.
28. Naik S.N., V.G. Vaibhav, K.R. Prasant, K.D. Ajay. 2010 Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renew Sustain Energy Rev*; 14: p. 578–97.
29. Show K.Y., D.J. Lee, Z.P. Zhang. 2011 Production of biohydrogen: current perspectives and future prospects. In: Pandey A, Larroche C, Ricke SC, Dussap CG, Gnansounou E, editors. *Biofuels. Amsterdam: Academic Press*, , p. 467–79.
30. Sekoai P., K.E. Gueguim. 2013 A two-stage modelling and optimization of biohydrogen production from a mixture of agro-municipal waste. *Int J Hydrogen Energy*; 38(21): p. 8657–63.
31. Das D., N. Khanna, C.N. Dasgupta. 2014 Biohydrogen production: fundamentals and technology advances. *Boca Raton: CRC Press*.
32. Yu J., P. Takahashi. 2007 Bio photolysis-based hydrogen production by cyanobacteria and green microalgae. In: Méndez-Vilas S, editor. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology. ©FORMATEx*.
33. Redwood M.D., B.M. Paterson, L.E. Macaskie. 2009 Integrating dark and light biohydrogen production strategies: towards the hydrogen economy. *Rev Environ Sci Bio/Technol*; 8(2): p. 149–85.
34. Liu Z., C. Zhang, Y. Lu, X. Wu, L. Wang, L. Wang, et al. 2013. States and challenges for highvalue biohythane production from waste biomass by dark fermentation technology. *Bioresour Technol*; 135: p. 292–303.
35. Singhal Y., S.Kr. Bansal, R. Singh. 2012 Evaluation of biogas production from solid waste using pretreatment method in anaerobic condition. *Int J Emerg Sci*; 2(3): p. 405–14.
36. Benemann J.R. 2000 Hydrogen production by microalgae. *J Appl Phycol*; 12: p. 291–300.
37. Benemann J.R. 1996 Hydrogen biotechnology: progress and prospects. *Nat Biotech*; 14: p. 1101–3.
38. Gaffron H., J. Rubin. 1942 Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *J Gen Physiol*; 26: p. 219–40.
39. Benemann J.R., N.M. Weare. 1974 Hydrogen evolution by nitrogenfixing *Anabaena cylindrica* cultures. *Science*, 184: p. 174–5.
40. Ghirardi M.L., A. Dubini, J. Yu, P.C. Maness. 2009 Photobiological hydrogen-producing systems. *Chem Soc Rev*, 38: p. 52–61.
41. Vignais P.M., A. Colbeau, J.C. Willison, Y. Jouanneau. 1985. Hydrogenase, nitrogenase, and hydrogen metabolism in the photosynthetic bacteria. *Adv Microb Physiol*; 26: p. 155–234.
42. Tsygankov A.A., L.T. Serebryakova, K.K. Rao, D.O. Hall. 1998 Acetylene reduction and hydrogen photo-production by wild type and mutant strains of *Anabaena* at different CO₂ and O₂ concentrations. *FEMS Microbiol Lett*, 167: p. 13–17.
43. Pinto F.A.L., O. Troshima, P. Lindbald. 2002 A brief look at three decades of research on cyanobacterial hydrogen evolution. *Int J Hydrogen Energy*; 27: p. 1209–15.
44. Oey M., A.L. Sawyer, I.L. Ross, B. Hankamer. 2016 Challenges and opportunities for hydrogen production from microalgae. *Plant Biotechnol J*, 14(7), p 1487–1499. <http://dx.doi.org/10.1111/pbi.12516>.
45. Chong M.L., V. Sabaratnam, Y. Shirai, M.A. Hassan. 2009 Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *Int J Hydrogen Energy*, 34: p. 3277–87.
46. Guwy A.J., R.M. Dinsdale, J.R. Kim, J. Massanet-Nicolau, G. Premier. 2011 Fermentative biohydrogen production systems integration. *Bioresour Technol*, 102: p. 8534–42.
47. Nath K., D. Das. 2011 Modeling and optimization of fermentative hydrogen production. *Bioresour Technol*, 102: p. 8569–81.
48. Nigam P.S., A. Singh. 2011 Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog Energy Combust*; 37(1): p. 52–68.
49. Demirbas A. 2008 Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Convers Manag*, 49: p. 2106–16.
50. Sriranjana K., M.E. Pyne, C.P. Chou. 2011 Biochemical and genetic engineering strategies to enhance hydrogen production in photosynthetic algae and cyanobacteria. *Bioresour Technol*, 102: p. 8589–604.

51. Khoshtinat M., N.A.S. Amin, I. Noshadi. 2010 A review of methanol production from methane oxidation via non-thermal plasma reactor. *World Acad Sci Eng Technol*, 38: p. 354.
52. Chandra R., H. Takeuchi, T. Hasegawa. 2012 Hydrothermal pretreatment of rice straw biomass: a potential and promising method for enhanced methane production. *Appl Energy*, 94: p. 129–40.
53. Deublein D., A. Steinhauser. 2008 Biogas from waste and renewable sources: an introduction. Weinheim: *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*.
54. Kumar M., K. Gayen. 2011 Developments in bio-butanol production: new insights. *Appl Energy*; 88(6), p. 1999-12.
55. Sheikh M.M.I., C.H. Kim, H.H. Park, H.G. Nam, G.S. Lee, H.S. Jo, et al. 2015 A synergistic effect of pretreatment on cell wall structural changes in barley straw (*Hordeum vulgare* L) for efficient bioethanol production, *J Sci Food Agric*, 95(4): p. 843–50.
56. Salehi J.Gh., M.J. Taherzadeh. 2015 Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: a comprehensive review. *Biofuel Res J*, 5: p. 152–95.
57. Naik S.N., V.V. Goud, P.K. Rout, A.K. Dalai. 2010 Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review, *Renew Sust Energy Rev*, 14: p. 578-97.
58. Cadenas A., S. Cabezudo. 1998 Biofuels as sustainable technologies: perspectives for less developed countries, *Technol Forecast Soc*, 58: p. 83-103.
59. Hoekman S. K., A. Broch, C. Robbins, E. Cenicerros, M. Natarajan, 2012 “Review of biodiesel composition, properties, and specifications”, *Rewenable and Sustainable Energy Reviews*, 16, pp. 143-149.
60. Mustafa Z., D. Yordanov, R. Milina, 2016 “Gas chromatography analysis of biodiesel blends”, *Oxidation Communications*, 39 (4), pp. 3324-3335.
61. Chapagain B., Y. Yehoshua, Z. Wiesman, 2009 “Desert date (*Balanites aegyptiaca*) as an arid lands sustainable bioresource for biodiesel”, *Bioresour. Technol.*, 100, pp. 1221–1226.
62. Mustafa Z., D. Yordanov, E. Ivanova. 2019 Predicting the properties of biodiesel fuels from their fatty acid methyl esters composition, *Industrial technologies*, 6(1), p. 108-113.
63. Nigam P.S., A. Singh. 2011 Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog Energy Combust Sci*, 37: p. 52-68.
64. Li Y, M. Horsman, N. Wu, C.Q. Lan, N. Dubois-Calero. 2008 Biofuels from microalgae. *Biotechnol Progr*; 24: p. 815-20.
65. Schenk P.M., Thomas- S.R. Hall, E. Stephens, U.C. Marx, J.H. Mussnug, C. Posten, et al. 2008 Second generation biofuels: high efficiency microalgae for biodiesel production. *BioEnergy Res*; 01: p. 20-43.
66. Scott .SA., M.P. Davey, J.S. Dennis, I. Horst, C.J. Howe, D.J. LeaSmith, et al. 2010 Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Curr Opin Biotechnol*, 21: p. 277-86.
67. Carlsson A.S., J.B. van Beilen, R. Mcoller, D. Clayton. In: D. Bowles, editor. 2007 Micro- and macro-algae: utility for industrial applications, outputs from the EPOBIO project. Newbury (UK): University of York: CPL Press; p. 1-82.
68. Wang B., Y. Li, N. Wu, C.Q. Lan. 2008 CO2 bio-mitigation using microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol*; 79: p. 707-18.
69. Alam F., A. Date, R. Rasjedin, S. Mobin, H. Moria, A. Baqui. 2012 Biofuel from algae- is it a viable alternative? *Procedia Eng*, 49: p. 221-7.
70. Bhatt N.C., A. Panwar, T.S. Bisht, S. Tamta. 2014 Coupling of algal biofuel production with wastewater. *Sci World J*:10, 210504. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/210504>.

Гл. ас. д-р Галина Йорданова
 Университет „Проф. д-р Асен Златаров“ – Бургас
 Катедра „Биотехнология“
 Адрес: гр. Бургас, ул. Проф. Якимов 1

e-mail: burdelova@abv.bg

Доц. д-р Добромир Йорданов
 Университет „Проф. д-р Асен Златаров“ – Бургас
 Катедра „Индустрални технологии и мениджмънт“
 Адрес: гр. Бургас, ул. Проф. Якимов 1

e-mail: dobromirj@abv.bg



ИЗСЛЕДВАНЕ НА ГРУПОВИЯ ВЪГЛЕВОДОРОДЕН СЪСТАВ НА СВРЪХ ЛЕКИ, ЛЕКИ, СРЕДНИ, ТЕЖКИ И СВРЪХ ТЕЖКИ ТИПОВЕ НЕФТ, НЕФТЕНИ ПЯСЪЦИ И БИТУМИ

Лиляна Тодорова-Янкова, Добромир Йорданов, Дичо Стратиев, Ивелина Шишкова

STUDY OF THE GROUP HYDROCARBON COMPOSITION OF ULTRALIGHT, LIGHT, MEDIUM, HEAVY AND ULTRA HEAVY TYPES OF CRUDE OIL, CRUDE OIL SANDS AND BITUMEN

Lilyana Todorova-Yankova, Dobromir Yordanov, Dicho Stratiev, Ivelina Shishkova

ABSTRACT: This article presents a study on the various methods for analyzing the group hydrocarbon composition of ultralight, light, medium, heavy and ultra-heavy types of crude oil, crude oil sands and bitumens reported in the scientific literature. 214 oil samples were studied, the group hydrocarbon composition of which was determined by the methods: ASTM D 2007, ASTM D 4124, liquid chromatography, high performance liquid chromatography and thin layer chromatography. Correlation analysis examined the relationships between the contents of the individual hydrocarbon groups analyzed by five different methods. Using the nonlinear least squares method, the derived equation allows predicting the content of aromatic structures in ultralight, light, medium, heavy and ultra heavy types of crude oil, crude oil sands and bitumens, reported in the scientific literature. This equation can be used to verify the correctness of the analysis performed for a group hydrocarbon composition of petroleum. If the deviation is greater than 7.5%, the analysis may be considered incorrect and must be repeated.

Key words: crude oil, group hydrocarbon composition, SARA (saturated, aromatic, resinous and asphaltene components), correlation analysis, non-linear least squares method.

Въведение

През последното столетие икономическия растеж и увеличаването на населението доведоха до увеличаване на потребността от нефт със сегашна консумация от 100 милиона барела на ден, като се очаква допълнително нарастване на търсенето на петрол с около 1 милиона барела на ден за следващото десетилетие [1]. Това се дължи главно на 1) постепенния достът до автомобилен и авиационен транспорт в по-малко развитите региони и 2) разширяването на химическия сектор. В същото време подобренията в ефективността, много важния напредък в генерирането на чиста енергия и строгите екологични норми, заедно със строгия политически контрол се очаква да доведат до значително по-бавен растеж в употребата на горива, получени от нефта във втората половина на това десетилетие и вероятно понижаване на търсенето на петрол след 2030г. [1]. За разлика от горивата, потребността от продукти на нефтохимичния синтез не се очаква да престане непрекъснато

да расте в обозримо бъдеще. В следващите две десетилетия потребността от нефт за целите на нефтохимичния синтез се очаква да нарасне с приблизително 4 милиона барела на ден, достигайки 34% от общия петролен пазар през 2040г. в сравнение със сегашните 15% [2]. Тази промяна в структурата на потреблението на нефта, отчитайки, че досега търсенето на петролни горива формираше сегашната нефтопреработвателна промишленост, доведе до значително увеличена активност в научно изследователската дейност, насочена към развитие на процесите за конвертиране на нефта в по-леки продукти, за сметка на намаляване производството на петролни горива. Независимо от тази промяна, свойствата на нефта си остават единствената самостоятелна променлива, която в най-голяма степен определя резултатите от всеки един нефтопреработвателен процес. Ето защо изследването на химията на нефта продължава да бъде актуална тема за проучване, давайки богати плодове в съвременната химическа промишленост.

Нефтът представлява сложна смес от въглеродородни и невъглеродородни компоненти с брой на въглеродните атоми от 1 до над 100 атома и температури на кипене от -161.6°C (метан) до над 760°C . Чрез използване на разпределителни модели на температурите на кипене на различни типове нефт [3] е установено, че техните крайни температури на кипене могат да варират между 1000 и 2000°C . При брой на въглеродните атоми на 25 (температура на кипене = 402°C) броят на възможните изомери на ациклични алканови изомери възлиза на 36.7×10^6 , докато при брой на въглеродните атоми равен на 100 (температура на кипене = 708°C) броят на възможните изомери на ациклични алканови изомери възлиза на 5920×10^{36} [4]. Действителният брой на компонентите, които влизат в състава на даден нефт е неизвестен, но се предполага, че той надхвърля 10^6 [5]. Така например в най-тежката фракция на нефта, кипяща над 540°C (гудрон) са известни само 5% от изграждащите я компоненти, останалите 95% са неизвестни за човечеството [6]. Анализирането на такава сложна смес е предизвикателство за специалистите, работещи в нефтодобивната, нефтепреработвателната и нефтохимичната промишленост. Разделянето на нефта на фракции на базата на различната летливост на компонентите, които изграждат нефта (фракционна дестилация, ректификация) или на базата на различната разтворимост на компонентите на нефта (наситени, ароматни, смолни и асфаленови компоненти) позволяват да се изследват индивидуалните фракции, като се намали сложността на изходната смес. Различни методи и техники са намерили приложение за фракциониране на нефта на базата на различната летливост на нефтените компоненти, сред които най-разпространените са ИТК (истински температури на кипене) методите, които са стандартизирани (ASTM D 2892, ГОСТ 11011). Разделянето на нефтените смеси на наситени, ароматни, смолни и асфаленови фракции се извършва на основата на полярността на тези фракции чрез използване на различни разтворители, елюенти и адсорбенти. Първата стъпка при SARA фракционирането е утаяването на асфалените от нефтената смес като се използва н-хептан [7, 8] или н-пентан [9]. Деасфалтизираната нефтена смес може по-нататък да бъде изследвана за съдържанието на наситени, ароматни и смолни фракции чрез методите ASTM D2007, ASTM D4124, високо ефективна течна хрома-

тография (HPLC = high performance liquid chromatography) или тънко слойна течна хроматография, свързана с пламъчно йонизационен детектор (TLC-FID; IATROSCAN). Значителни разлики са докладвани между резултатите от групов въглеродороден състав на нефт (SARA), получени чрез ASTM, HPLC или TLC-FID методите [9, 10, 11]. Разликата в методите, природата на елюента и молекулната маса на разтворителите оказват значително влияние върху относителните пропорции на всяка фракция [9, 12]. Резултатите от SARA състава на нефта са използвани от редица изследователи за предсказване на различни нефтени свойства, образуването на кокс, стабилността на асфалените в нефта и други [13-15]. Груповият въглеродороден състав на нефта се използва като входна информация в редица уравнения на състоянието, представляващи основата на термодинамичните модели, предсказващи образуването на седименти в процеса на добиване и преработване на нефта [16-21]. Груповият въглеродороден състав на суровината за конверсия до по-леки високо стойностни продукти в редица конверсионни процеси е показал, че носи ценна информация за действието на тези процеси [22-32]. Ето защо изследването на методите за измерване SARA състава на нефта и нефтените деривати представлява значителен за практиката интерес. Още повече, че различните изследователи прилагат различни аналитични техники за измерване на SARA състава на нефта и нефтените деривати и често тяхното сравняване е невъзможно. Това обуславя целта на настоящото изследване, а именно обобщаване на голям по обем данни, докладвани в литературата за групов въглеродороден състав на свръх леки, леки, средни, тежки, свръх тежки типове нефт, нефтени пясъци и природни битуми, получени от различни методи и търсенето на зависимости между SARA състава, физикохимичните свойства на нефта и различните докладвани в литературата индекси, характеризиращи поведението на нефта в процеса на добиване и преработване.

Експериментална част

216 проби от типове нефт, представители на свръх леки (отн. плътност < 0.8017), леки (отн. плътност = 0.8017–0.855), средни (отн. плътност = 0.8600–0.9220), тежки (отн. плътност > 0.9220 < 1.000) и свръх тежки (отн. плътност > 1.000) са анализирани за SARA

състав в 17 литературни източника [12, 13, 22, 32-45].

Таблица 1 обобщава данните за груповия състав (SARA = HACA), съдържанието на ароматни структури (сумата от всички фракции, които съдържат ароматен въглерод. Това са ароматни, смолни и асфалтенови компо-

ненти и относителната плътност на изследваните 214 проби от нефт. Шест метода са споменати като използвани за анализа на SARA състава на нефта и тяхното процентно разпределение за базата данни от 214 проби от нефт е представена в Таблица 2.

Таблица 1. Групов въглеводороден (SARA) състав на 216 проби от нефт, представители на свръх леки, леки, средни, тежки, свръх тежки типове нефт и нефтени пясъци и природни битуми

№	Обозначение	Отн. плътност	Наситени, мас. %	Ароматни, мас. %	Смоли, мас. %	Асфалтени, мас. %	Ароматни структури, мас. %	Материален баланс, мас.	SARA (HACA) метод
1	A [33]	0,8818	51,5	21,7	25,9	0,9	48,5	100	не е докладван
2	C [33]	0,8839	51,1	23,8	23	2,1	48,9	100	не е докладван
3	D [33]	1,0133	27,2	26,7	32	14,1	72,8	100	не е докладван
4	A [34]	0,8612	51,62	31,35	14,25	2,78	48,38	100	ASTM D2007
5	B [34]	0,8922	43,15	29,95	18,2	8,7	56,85	100	ASTM D2007
6	C [34]	0,8697	32,1	26,34	25,82	15,74	67,9	100	ASTM D2007
7	D [34]	0,9786	25,38	17,04	31,41	26,17	74,62	100	ASTM D2007
8	E [34]	0,9979	20,01	11,36	36,26	32,37	79,99	100	ASTM D2007
9	West Africa [35]	0,9140	47,9	36,5	15,2	0,4	52,1	100	HPLC
10	North Sea [35]	0,9160	48	37,5	14,2	0,3	52	100	HPLC
11	West Africa [35]	0,9160	41,2	36,4	20,4	2,1	58,9	100,1	HPLC
12	North Sea [35]	0,8390	82,7	13,4	3,9	0	17,3	100	HPLC
13	North Sea [35]	0,8440	62,7	23,6	12,2	1,5	37,3	100	HPLC
14	North Sea [35]	0,9450	35,3	36,8	24,5	3,5	64,8	100,1	HPLC
15	North Sea [35]	0,9140	41,8	38,8	18,7	0,6	58,1	99,9	HPLC
16	North Sea [35]	0,8850	50,9	34,6	14	0,5	49,1	100	HPLC
17	West Africa [35]	0,8880	40,6	32,1	20,6	6,6	59,3	99,9	HPLC
18	North Sea [35]	0,7960	79,8	16,5	3,6	0,1	20,2	100	HPLC
19	West Africa [35]	0,8730	57,3	27,9	13,5	1,3	42,7	100	HPLC
20	North Sea [35]	0,8570	60,6	30	9,2	0,2	39,4	100	HPLC
21	West Africa [35]	0,9210	42,4	36,1	20,5	1	57,6	100	HPLC
22	North Sea [35]	0,7960	65	30,7	4,3	0	35	100	HPLC
23	North Sea [35]	0,8980	50,3	31,4	17,5	0,7	49,6	99,9	HPLC
24	North Sea [35]	0,8400	55,4	28,3	12,9	3,4	44,6	100	HPLC
25	West Africa [35]	0,8730	54,5	28,8	14,9	1,8	45,5	100	HPLC
26	France [35]	0,9390	24,4	43,4	19,9	12,4	75,7	100,1	HPLC
27	1 [36]	0,9799	19,3	37,2	28,5	15,3	81	100,3	мод. ASTM D4124
28	2 [36]	0,9509	37,4	27,6	32,3	2,2	62,1	99,5	мод. ASTM D4124
29	3 [36]	0,9334	29,8	38,4	25	13,1	76,5	106,3	мод. ASTM D4124
30	4 [36]	0,9291	35,2	29	22,9	12	63,9	99,1	мод. ASTM D4124
31	5 [36]	0,8860	58,3	21,6	19,4	2,6	43,6	101,9	мод. ASTM D4124
32	6 [36]	0,8844	42,9	26,9	19,6	8,9	55,4	98,3	мод. ASTM D4124
33	7 [36]	0,8639	51,5	24,1	21,4	2,6	48,1	99,6	мод. ASTM D4124
34	8 [36]	0,8576	50,7	27,2	15,2	7,4	49,8	100,5	мод. ASTM D4124

35	9 [36]	0,8555	52,7	23,3	21,9	1	46,2	98,9	мод. ASTM D4124
36	10 [36]	0,8529	50,4	24,9	22,1	0,8	47,8	98,2	мод. ASTM D4124
37	11 [36]	0,8498	46,4	29,8	18,9	4,4	53,1	99,5	мод. ASTM D4124
38	12 [36]	0,8299	55,3	33,9	12,4	0,9	47,2	102,5	мод. ASTM D4124
39	13 [36]	0,8241	73,2	19,4	6,5	0,1	26	99,2	мод. ASTM D4124
40	14 [36]	0,8198	63,9	22,9	9,6	0,5	33	96,9	мод. ASTM D4124
41	15 [36]	0,8022	64,2	17,2	15,1	0,8	33,1	97,3	мод. ASTM D4124
42	A-95 [37]	0,8956	46,2	19,7	18,6	8,8	47,1	93,3	ASTM D2007
43	CLH-99 [37]	0,9161	38,8	23,6	23,9	3,4	50,9	89,7	ASTM D2007
44	C-R-00 [37]	0,8673	68,7	17,4	9,9	1,6	28,9	97,6	ASTM D2007
45	S-Ven-39 [37]	0,8795	45,6	27,8	14,2	6,1	48,1	93,7	ASTM D2007
46	SQ-95 [37]	0,8409	47	19,4	14,7	2,6	36,7	83,7	ASTM D2007
47	Tensleep-99 [37]	0,8685	59	22,9	11,7	3,2	37,8	96,8	ASTM D2007
48	A [38]	0,7932	86,62	8,6	3,15	0,12	11,87	98,49	HPLC
49	B [38]	0,7872	80,55	14,68	3,64	0,15	18,47	99,02	HPLC
50	C [38]	0,8719	71,22	23,76	3,92	0,07	27,75	98,97	HPLC
51	D [38]	0,8310	78,79	15,37	4,18	0,22	19,77	98,56	HPLC
52	Indonesian oil sand [22]	1,0300	14,05	38,23	24,51	23,21	85,95	100	течна хроматография
53	Venezuelan heavy oil [39]	1,077	11,4	37,2	37,3	14,1	88,6	100	течна хроматография
54	Oil sand [40]	1,0100	18,7	34,6	11,1	35,6	81,3	100	течна хроматография
55	Athabasca [25]	1,0231	16,3	39,8	28,5	14,7	83	99,3	ASTM D2007
56	Cold lake [25]	1,0019	19,4	38,1	26,7	15,5	80,3	99,7	ASTM D2007
57	Lloydminster [25]	0,9968	23,1	41,7	19,5	15,3	76,5	99,6	ASTM D2007
58	Venezuela No1 [25]	1,0178	15,4	44,4	25	15,2	84,6	100	ASTM D2007
59	Venezuela No2 [25]	1,0167	20,5	38	19,6	21,8	79,4	99,9	ASTM D2007
60	Russia [41]	0,982	25	31,1	37,1	6,8	75	100	ASTM D2007
61	Indonesia [41]	0,963	23,2	33,9	38,2	4,7	76,8	100	ASTM D2007
62	PO1 [13]	0,9387	48,2	35,2	16	0,6	51,8	100	течна хроматография
63	PO2 [13]	0,9506	44,8	31,3	21,6	2,3	55,2	100	течна хроматография
64	PO3 [13]	0,8986	55,3	26,4	16,5	1,8	44,7	100	течна хроматография
65	PO4 [13]	0,9740	35,7	24,6	32,4	7,3	64,3	100	течна хроматография
66	PO5 [13]	0,9331	41,3	32,9	22,9	2,9	58,7	100	течна хроматография
67	PO6 [13]	0,9017	57,2	26,9	12,9	3,1	42,9	100,1	течна хроматография
68	PO7 [13]	0,7822	84,3	11	4,7	0	15,7	100	течна хроматография
69	PO8 [13]	0,9016	57,8	21,6	20,2	0	41,8	99,6	течна хроматография
70	PO9 [13]	0,8708	67,7	18,1	12,8	1,4	32,3	100	течна хроматография
71	PO10 [13]	0,8560	58,5	29,2	10,6	1,7	41,5	100	течна хроматография
72	PO11 [13]	0,9328	44,2	28,8	18,3	8,8	55,9	100,1	течна хроматография
73	PO12 [13]	0,7967	88,3	7,1	4,5	0	11,6	99,9	течна хроматография
74	PO13 [13]	0,9001	45,2	28,1	23,1	3,5	54,7	99,9	течна хроматография
75	PO14 [13]	0,9759	36,8	30	27	6,2	63,2	100	течна хроматография
76	PO15 [13]	0,8267	87,9	5,8	6,2	0	12	99,9	течна хроматография
77	PO16 [13]	0,9453	45,1	35	18,2	1,7	54,9	100	течна хроматография
78	PO17 [13]	0,8223	75,4	17,7	6,9	0	24,6	100	течна хроматография

79	PO18 [13]	0,9174	54,2	25,6	19,6	0,6	45,8	100	течна хрома- тография
80	PO19 [13]	0,8108	79,6	12,8	7,1	0	19,9	99,5	течна хрома- тография
81	PO20 [13]	0,8237	80,8	12,4	6,8	0	19,2	100	течна хрома- тография
82	PO21 [13]	0,8996	48,3	31	18,8	1,9	51,7	100	течна хрома- тография
83	PO22 [13]	0,9889	39,5	27,5	21,9	11,1	60,5	100	течна хрома- тография
84	PO23 [13]	0,8247	87	7,6	5,4	0	13	100	течна хрома- тография
85	PO24 [13]	0,8855	71,3	18,3	10,4	0	28,7	100	течна хрома- тография
86	PO25 [13]	0,8168	80,2	12,1	7,7	0	19,8	100	течна хрома- тография
87	PO26 [13]	0,8802	75,5	13,7	10,8	0	24,5	100	течна хрома- тография
88	PO27 [13]	0,9690	47,8	27,9	23,3	1	52,2	100	течна хрома- тография
89	PO28 [13]	0,9459	39,6	31,5	20,8	8,2	60,5	100,1	течна хрома- тография
90	PO29 [13]	0,9379	42,6	47,5	6,7	3,2	57,4	100	течна хрома- тография
91	W1-1 [42]	0,7960	87,93	8,73	2,52	0,82	12,07	100	не е докладван
92	W1-2 [42]	0,7970	87,79	10,39	1,27	0,55	12,21	100	не е докладван
93	W1-3 [42]	0,8008	84,56	13,03	1,43	0,7	15,16	99,72	не е докладван
94	W1-10 [42]	0,8004	81,44	9,68	1,82	1,03	12,53	93,97	не е докладван
95	W1-11 [42]	0,7988	84,55	11,04	1,02	0,5	12,56	97,11	не е докладван
96	Alaska [12]	0,9970	23	22	35	18	75	98	течна хрома- тография
97	Canada 1 [12]	1,0140	18	33	30	20	83	101	течна хрома- тография
98	Canada 2 [12]	0,9910	18	27	27	15	69,0	87	течна хрома- тография
99	Canada 3 [12]	1,0030	15	23	19	10	52	67	течна хрома- тография
100	Texas [12]	1,1190	4	17	37	43	97	101	течна хрома- тография
101	Utah [12] Venezuela	1,0000	19	14	46	20	80	99	течна хрома- тография
102	[12]	1,0130	19	32	29	18	79	98	течна хрома- тография
103	[44]	0,847	71,0	26,9	2,1	0,1	29,1	100	ASTM D2007
104	[44]	0,844	79,5	19,6	0,3	0,7	20,6	100	ASTM D2007
105	[44]	0,872	68,3	29,4	1,8	0,5	31,7	100	ASTM D2007
106	[44]	0,857	67,3	31,8	0,3	0,6	32,7	100	ASTM D2007
107	[44]	0,838	82,0	17,9	0,0	0,1	18,0	100	ASTM D2007
108	[44]	0,825	70,3	29,1	0,3	0,3	29,8	100	ASTM D2007
109	[44]	0,859	85,7	14,2	0,0	1,0	15,1	100,8	ASTM D2007
110	[44]	0,857	76,2	22,3	1,1	0,4	23,8	100	ASTM D2007
111	[44]	0,860	71,3	27,0	0,8	0,9	28,7	100	ASTM D2007
112	[44]	0,876	65,2	32,3	2,5	0,0	34,8	100	ASTM D2007
113	[44]	0,883	66,5	30,0	3,3	0,2	33,5	100	ASTM D2007
114	[44]	0,836	80,9	18,8	0,3	0,0	19,1	100	ASTM D2007
115	[44]	0,832	73,1	25,1	1,5	0,3	26,9	100	ASTM D2007
116	[44]	0,877	59,1	33,7	6,8	0,4	40,9	100	ASTM D2007
117	[44]	0,862	67,6	27,9	3,4	1,1	32,4	100	ASTM D2007
118	[44]	0,881	60,0	33,2	4,7	2,2	40,0	100	ASTM D2007
119	[44]	0,879	61,6	38,4	0,0	2,5	41,0	102,54	ASTM D2007
120	[44]	0,816	76,0	23,0	0,7	0,3	24,0	100	ASTM D2007
121	[44]	0,875	83,6	16,2	0,0	1,5	17,7	101,24	ASTM D2007
122	[44]	0,846	71,5	28,2	0,3	0,0	28,5	100	ASTM D2007
123	[44]	0,875	67,0	30,7	0,5	1,8	33,0	100	ASTM D2007
124	[44]	0,856	68,9	28,5	0,6	2,1	31,1	100	ASTM D2007
125	[44]	0,886	63,7	31,9	4,4	0,1	36,3	100	ASTM D2007
126	[44]	0,859	72,1	25,9	0,0	2,0	27,9	100	ASTM D2007
127	[44]	0,849	64,9	31,8	2,7	0,7	35,2	100	ASTM D2007
128	[44]	0,879	65,2	31,0	2,6	1,3	34,8	100	ASTM D2007
129	[44]	0,862	63,5	29,5	5,0	2,0	36,5	100	ASTM D2007
130	[44]	0,886	63,6	31,9	4,1	0,4	36,4	100	ASTM D2007
131	[44]	0,803	77,6	22,6	0,0	0,4	23,0	100,6	ASTM D2007
132	[44]	0,816	77,0	22,6	0,3	0,1	23,0	100	ASTM D2007
133	[44]	0,856	75,6	24,0	0,0	0,6	24,6	100,2	ASTM D2007
134	[44]	0,847	65,0	33,8	0,8	0,5	35,0	100	ASTM D2007
135	[44]	0,794	79,2	20,5	0,3	0,0	20,8	100	ASTM D2007

136	[44]	0,873	68,7	27,9	3,2	0,2	31,3	100	ASTM D2007
137	[44]	0,844	72,0	26,5	1,4	0,1	28,0	100	ASTM D2007
138	[44]	0,863	72,9	25,7	0,7	0,7	27,1	100	ASTM D2007
139	[44]	0,838	82,5	16,2	0,6	0,7	17,5	100	ASTM D2007
140	[44]	0,860	70,9	27,4	1,2	0,6	29,2	100	ASTM D2007
141	[44]	0,864	65,8	31,7	0,9	1,6	34,2	100	ASTM D2007
142	[44]	0,878	72,0	27,7	0,0	3,1	30,7	102,8	ASTM D2007
143	[44]	0,836	72,9	25,5	1,1	0,5	27,1	100	ASTM D2007
144	[44]	0,858	74,0	24,6	0,8	0,6	26,0	100	ASTM D2007
145	[44]	0,864	63,2	33,9	-2,0	4,9	36,8	100	ASTM D2007
146	[44]	0,853	71,1	27,3	1,0	0,6	28,9	100	ASTM D2007
147	[44]	0,862	77,7	20,0	2,1	0,2	22,3	100	ASTM D2007
148	[44]	0,866	67,6	32,2	0,0	1,7	33,9	101,5	ASTM D2007
149	[44]	0,820	76,5	23,8	0,0	0,0	23,9	100,4	ASTM D2007
150	[44]	0,849	76,9	21,9	1,1	0,0	23,1	100	ASTM D2007
151	[44]	0,822	82,5	17,5	0,0	0,1	17,6	100,1	ASTM D2007
152	[44]	0,872	68,3	30,6	0,0	1,3	31,9	100,2	ASTM D2007
153	[44]	0,841	74,0	24,7	0,8	0,5	26,1	100	ASTM D2007
154	[44]	0,847	77,5	21,3	0,0	1,1	22,5	100	ASTM D2007
155	[44]	0,834	66,5	28,8	4,1	0,5	33,5	100	ASTM D2007
156	[44]	0,840	71,4	27,9	0,3	0,5	28,6	100	ASTM D2007
157	[44]	0,847	67,1	32,5	0,5	0,0	32,9	100	ASTM D2007
158	[44]	0,859	65,2	29,6	2,7	2,6	34,8	100	ASTM D2007
159	[44]	0,879	60,2	33,1	4,5	2,3	39,8	100	ASTM D2007
160	[44]	0,867	82,3	13,6	3,8	0,3	17,7	100	ASTM D2007
161	[44]	0,847	88,9	11,0	0,1	0,0	11,1	100	ASTM D2007
162	[44]	0,862	63,7	30,9	5,0	0,4	36,3	100	ASTM D2007
163	[44]	0,858	65,1	29,7	3,0	2,2	34,9	100	ASTM D2007
164	[44]	0,863	64,6	30,0	3,7	1,8	35,4	100	ASTM D2007
165	[44]	0,873	69,5	30,2	0,0	0,9	31,2	100,6	ASTM D2007
166	[44]	0,814	76,4	24,0	0,0	0,9	24,9	101,4	ASTM D2007
167	[44]	0,814	77,2	23,1	0,0	0,1	23,2	100,3	ASTM D2007
168	[44]	0,877	63,7	32,8	1,8	1,7	36,3	100	ASTM D2007
169	[44]	0,826	74,8	23,8	1,0	0,4	25,3	100	ASTM D2007
170	[44]	0,849	78,1	21,8	0,1	0,0	21,9	100	ASTM D2007
171	[44]	0,843	74,8	24,8	0,1	0,4	25,3	100	ASTM D2007
172	[44]	0,799	78,7	21,1	0,2	0,0	21,3	100	ASTM D2007
173	[44]	0,823	77,6	21,7	0,7	0,0	22,5	100	ASTM D2007
174	[44]	0,876	64,2	35,8	0,0	1,9	37,6	102	ASTM D2007
175	[44]	0,851	71,1	27,9	1,0	0,0	29,0	100	ASTM D2007
176	[44]	0,878	52,0	48,0	0,0	2,0	50,0	102,0	ASTM D2007
177	[44]	0,817	74,6	26,3	0,0	0,0	26,3	101	ASTM D2007
178	[44]	0,853	69,9	30,0	0,0	0,3	30,3	100	ASTM D2007
179	[44]	0,817	77,6	22,5	0,0	0,1	22,6	100	ASTM D2007
180	[44]	0,826	77,1	23,2	0,0	0,1	23,3	100	ASTM D2007
181	[44]	0,853	72,3	26,2	0,9	0,6	27,7	100	ASTM D2007
182	[44]	0,809	83,3	16,2	0,5	0,1	16,8	100	ASTM D2007
183	[44]	0,845	72,6	25,5	1,3	0,6	27,4	100	ASTM D2007
184	[44]	0,827	70,2	25,3	4,3	0,2	29,8	100	ASTM D2007
185	[44]	0,870	77,8	21,6	0,4	0,2	22,2	100	ASTM D2007
186	[44]	0,858	69,3	28,1	1,8	0,8	30,7	100	ASTM D2007
187	[44]	0,843	73,1	25,6	0,8	0,6	26,9	100	ASTM D2007
188	[28]	0,910	17,8	58,1	19,9	4,3	82,3	100,1	TLC-FID (latroscan)
189	[43]	0,940	23,7	43,7	24,9	7,8	76,4	100,1	TLC-FID (latroscan)
190	[43]	0,900	18,5	57,2	21,1	3,2	81,5	100	TLC-FID (latroscan)
191	[43]	0,920	20,2	56,6	19,5	3,7	79,8	100	TLC-FID (latroscan)
192	[43]	0,930	16,4	46	30,1	7,4	83,5	99,9	TLC-FID (latroscan)
193	[43]	0,900	13,5	53,6	20,4	12,5	86,5	100	TLC-FID (latroscan)
194	[43]	0,920	15	56,4	21,6	7	85,0	100	TLC-FID (latroscan)
195	[43]	0,890	23,5	51,8	19,4	5,4	76,6	100,1	TLC-FID (latroscan)
196	[43]	0,920	15,3	39,8	31,2	13,7	84,7	100	TLC-FID (latroscan)
197	[43]	0,920	17,1	46,6	27,8	8,4	82,8	99,9	TLC-FID (latroscan)
198	[43]	0,880	20,5	59,6	17,8	2,1	79,5	100	TLC-FID (latroscan)
199	[43]	0,830	42,3	27,1	29,6	0,9	57,6	99,9	TLC-FID (latroscan)

200	[43]	0,940	9,7	55,9	31,8	2,6	90,3	100	TLC-FID (Iatroscan)
201	[43]	0,940	56,5	17,2	26,2	0,1	43,5	100	TLC-FID (Iatroscan)
202	[43]	0,860	37,1	39,1	22,7	1,1	62,9	100	TLC-FID (Iatroscan)
203	[43]	0,870	41,1	39	16	3,8	58,8	99,9	TLC-FID (Iatroscan)
204	[43]	0,830	54,9	21,2	23,8	0,2	45,2	100,1	TLC-FID (Iatroscan)
205	[43]	0,900	19,9	49	27,6	3,4	80,0	99,9	TLC-FID (Iatroscan)
206	[43]	0,880	13,2	54,1	27,2	5,5	86,8	100	TLC-FID (Iatroscan)
207	[43]	0,910	39,4	28,6	28,3	3,7	60,6	100	TLC-FID (Iatroscan)
208	[43]	0,870	30,3	36,4	31	2,3	69,7	100	TLC-FID (Iatroscan)
209	[43]	0,860	7,3	59	27,7	6,1	92,8	100,1	TLC-FID (Iatroscan)
210	[43]	0,900	42,7	50,6	6,6	0,2	57,4	100,1	TLC-FID (Iatroscan)
211	[43]	0,850	26,6	56,4	14,5	2,6	73,5	100,1	TLC-FID (Iatroscan)
212	[43]	0,880	27,1	46,2	20,2	6,4	72,8	99,9	TLC-FID (Iatroscan)
213	[43]	0,840	36,2	33,5	30	0,3	63,8	100	TLC-FID (Iatroscan)
214	[43]	0,840	51,1	27,6	0,1	21,3	49,0	100,1	TLC-FID (Iatroscan)
215	Heavy crude [45] Aguacate field, Tierra Blanca Veracruz, México [32]	0,986	13,0	36,3	29,4	21,3	87,0	100	течна хрома- тография
216		0,995	10,7	3,4	62,6	23,3	89,3	100	ASTM D4124

Таблица 2. Разпределение на използваните методи за анализ на групов (SARA) състав на 214 проби от нефт със свойства, посочени в Таблица 1.

Методи за анализ на групов състав на нефт	% от общо изследваните типове нефт
ASTM D2007	48,1
Неизвестен метод	3,7
Течна хроматография	18,2
HPLC	10,3
TLC-FID (Iatroscan)	12,6
мод. ASTM D4124	7,0

Резултати и обсъждане

Данните в Таблица 2. показват, че най-широко приложение за анализ на SARA състав на нефт е намерил метода ASTM D2007. Той е прилаган за анализ на груповия въглеводороден състав на всички групи нефт: свръх леки, леки, средни, тежки, свръх тежки типове нефт и нефтени пясъци и природни битуми. Следващият най-разпространен метод, но почти с три пъти по-малко приложение от метода ASTM D2007, е течната хроматография. Тя също е намерила приложение за определяне на SARA състав на всички групи нефт. Следващият по степен на използваемост метод е тънко слойната хроматография TLC-FID (Iatroscan).

Той е намерил приложение за SARA анализ на леки, средни и тежки типове нефт. На предпоследно място по приложимост се намира модифицирания ASTM D4124 метод. Той също е намерил приложение за SARA анализ на леки, средни и тежки типове нефт. Недокладваният (неизвестен) метод за анализ на групов състав на нефт, който най-вероятно се отнася до течната хроматография е използван за анализ на свръх леки, средни и свръх тежки типове нефт.

За да се изследват взаимовръзките между SARA фракциите, измерени чрез петте използвани метода за анализ на групов въглеводороден състав на нефт бяха съставени корелационни матрици за всички методи и те са представени в Таблица 3-7.

Таблица 3. Корелационна матрица на SARA фракциите и относителна плътност на изследваните типове нефт чрез метода ASTM D 2007 (103 броя нефтени проби)

	SG	Sat	Aro	Res	Asp	ARO str.	%Aro in ARO str.	%Res in ARO str.	%Asp. in ARO str.	CII
SG (отн.плътност)	1,00									
Sat	-0,88	1,00								
Aro	0,44	-0,51	1,00							
Res	0,81	-0,91	0,16	1,00						
Asp	0,80	-0,83	0,14	0,80	1,00					
ARO str.	0,90	-0,99	0,54	0,89	0,84	1,00				
%Aro in ARO str.	-0,78	0,89	-0,10	-0,96	-0,84	-0,85	1,00			
%Res in ARO str.	0,69	-0,83	0,08	0,94	0,67	0,78	-0,96	1,00		
%Asp. in ARO str.	0,76	-0,79	0,11	0,76	0,97	0,80	-0,85	0,66	1,00	
CII	-0,62	0,81	-0,73	-0,61	-0,50	-0,81	0,61	-0,60	-0,49	1,00

CII = индекс на колоидна нестабилност (Colloidal instability index)
Saturates+Asphaltenes

Aromatics+Resins

*Маркираните с плътен шрифт числа се отнасят до статистически значими стойности. При $R \geq 0.75$ между отделните параметри се счита, че има статистически значима връзка. При $R \geq 0.75 \leq 0.85$ се счита, че връзката е статистически значима и слаба. При $R > 0.85 < 0.95$ връзката е средна статистически

значима. При $R \geq 0.95$ връзката е силна статистически значима. (R = коефициент на корелация).

ARO str. = ароматни структури = ароматни + смоли + асфалтени; Sat = наситени; Aro = ароматни; Res = смоли; Asp = асфалтени.

%Aro in ARO str. = % ароматни компоненти в ароматните структури; %Res in ARO str. = % смоли в ароматните структур; %Asp in ARO str. = % асфалтени в ароматните структури.

Таблица 4. Корелационна матрица на SARA фракциите и относителна плътност на изследваните типове нефт чрез метода тънкослойна хроматография (Iatroscan) (27 броя нефтени проби)

	SG	Sat	Aro	Res	Asp	ARO str.	%Aro in ARO str.	%Res in ARO str.	%Asp. in ARO str.	CII
SG	1,00									
Sat	-0,43	1,00								
Aro	0,29	-0,84	1,00							
Res	0,25	-0,34	-0,11	1,00						
Asp	0,10	-0,21	0,04	-0,31	1,00					
ARO str.	0,43	-1,00	0,84	0,33	0,21	1,00				
%Aro in ARO str.	0,02	-0,34	0,78	-0,58	-0,12	0,34	1,00			
%Res in ARO str.	0,02	0,27	-0,59	0,79	-0,52	-0,27	-0,76	1,00		
%Asp. in ARO str.	-0,06	0,03	-0,11	-0,47	0,95	-0,02	-0,12	-0,55	1,00	
CII	-0,38	0,80	-0,71	-0,54	0,35	-0,80	-0,33	-0,10	0,59	1,00

Таблица 5. Корелационна матрица на SARA фракциите и относителна плътност на изследваните типове нефт чрез метода високо ефективна течна хроматография (HPLC) (22 броя нефтени проби)

	SG	Sat	Aro	Res	Asp	ARO str.	%Aro in ARO str.	%Res in ARO str.	%Asp. in ARO str.	CII
SG	1,00									
Sat	-0,89	1,00								
Aro	0,85	-0,95	1,00							
Res	0,88	-0,94	0,83	1,00						
Asp	0,44	-0,63	0,46	0,53	1,00					
ARO str.	0,89	-1,00	0,95	0,94	0,63	1,00				
%Aro in ARO str.	-0,67	0,76	-0,55	-0,88	-0,64	-0,76	1,00			
%Res in ARO str.	0,66	-0,65	0,49	0,86	0,28	0,65	-0,91	1,00		
%Asp. in ARO str.	0,39	-0,60	0,41	0,53	0,98	0,60	-0,70	0,35	1,00	
CII	-0,78	0,89	-0,93	-0,81	-0,38	-0,89	0,55	-0,51	-0,37	1,00

Таблица 6. Корелационна матрица на SARA фракциите и относителна плътност на изследваните типове нефт чрез метода ASTM D 4124 (15 броя нефтени проби)

	SG	Sat	Aro	Res	Asp	ARO str.	%Aro in ARO str.	M	%Asp. in ARO str.	СП
SG	1,00									
Sat	-0,90	1,00								
Aro	0,66	-0,82	1,00							
Res	0,84	-0,83	0,48	1,00						
Asp	0,76	-0,85	0,73	0,50	1,00					
ARO str.	0,90	-0,99	0,86	0,81	0,85	1,00				
%Aro in ARO str.	-0,68	0,68	-0,20	-0,87	-0,51	-0,65	1,00			
%Res in ARO str.	0,21	-0,13	-0,31	0,64	-0,23	0,09	-0,70	1,00		
%Asp. in ARO str.	0,69	-0,78	0,64	0,43	0,97	0,78	-0,53	-0,23	1,00	
СП	-0,77	0,90	-0,75	-0,87	-0,61	-0,90	0,71	-0,34	-0,57	1,00

От данните, представени в Таблица 3-6 се вижда, че всички методи за SARA анализ на нефт, с изключение на тънкослойната хроматография показват статистически значима връзка между съдържанието на наситени компоненти и ароматни структури с относителната плътност на нефта. Методите ASTM D 2007, ASTM D 4124 и високо ефективната течна хроматография показват средна статистически значима връзка между съдържанието на наситени компоненти и ароматни структури с относителната плътност на нефта, а методът на течната хроматография демонстрира силна статистически значима връзка между тези показатели на нефта. Подобна връзка между плътността и съдържанието на наситени компоненти и ароматни структури беше установена и в нашето скорошно изследване за вакуумни остатъци, получени от всички групи типове нефт [46]. От тук може да се направи извода, че плътността на нефта и нефтените деривати е основен показател, характеризиращ химическата природа на нефта. Чрез използване на нелинейния метод на най-малките квадрати беше изведена математична зависимост, свързваща плътността на нефта със съдържанието на ароматни структури. Тази зависимост е показана чрез уравнение 1 и на Фиг.1.

$$ARO\ str. = \frac{100}{0.2748 + 5.198e^{-4.787SG}} - 239 \quad (1)$$

където,

ARO str. = съдържание на ароматни структури, мас. %

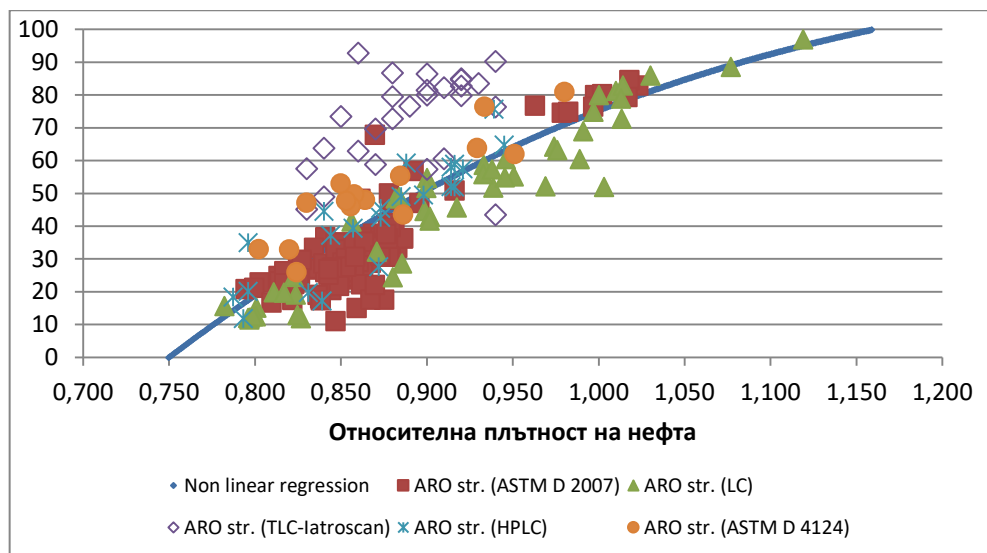
SG = относителна плътност

Средното абсолютно отклонение на предсказаните по уравнение 1 стойности на съдържанието на ароматни структури в нефта

от тези на измерените стойности, като бъдат изключените данните от Iatroscan анализа

възлиза на 7.5%. Нашите предишни изследвания [46] показаха, че когато отклонението на предсказаните от измерените стойности на съдържанието на ароматни структури е по-голямо от средното абсолютно отклонение това предполага некоректно извършен анализ и той трябва да се повтори. Не подчиняването на тази зависимост за данните от SARA анализа, извършен чрез метода на тънкослойна хроматография (TLC, Iatroscan) показва несъгласие на този метод за анализ с останалите методи, факт, който вече е коментиран в други изследвания, изразяващи недоверие в резултатите от този анализ поради големите грешки, извършвани при повторно извършване на анализ на една и съща проба [48]. Причината за неточния SARA анализ чрез метода на тънкослойна хроматография (TLC, Iatroscan) се преписва на проблема със силно адсорбираните асфалтени, които не мигрират по дължината на хроматографския прът [47].

Извършеният от нас анализ на данните за груповия състав на свръх леки, леки, средни, тежки, свръх тежки типове нефт, нефтени пясъци и природни битуми, публикувани в литературата, както и нашите изследвания с различни методи за определяне на SARA състава на вакуумни остатъци от различни типове нефт потвърждават значителното отклонение на зависимостите между SARA фракции, наблюдавани при останалите четири метода за SARA анализ ASTM D 2007, ASTM D 4124, HPLC, и течна хроматография (LC) и метода Iatroscan. От тук може да се направи извода, че резултатите от тънко слойната хроматография са несравними с останалите методи за анализ и, че този метод за анализ се отличава с висока погрешност според изследванията на Youtcheff [47].



Фиг. 1. Зависимост на съдържанието на ароматни структури в нефта от неговата плътност

От данните в Таблица 3-6 може да се види, че с повишаването на съдържанието на ароматни структури и плътността на нефта нараства относителния дял на смолно-асфалтовите компоненти. С други думи повишаването на плътността е свързана не само с увеличаване на ароматните структури в нефта, но и с повишаване на относителния дял на смолно-асфалтовите компоненти за сметка на намаляване на относителния дял на ароматните компоненти. Също така може да се отбележи, че увеличаването на съдържанието на наситени компоненти статистически значимо корелира с повишаване на стойността на индекса на колоидна нестабилност, което предполага, че типовете нефт, които имат по-високо съдържание на наситени компоненти могат да бъдат колоидно нестабилни и да способстват за повишаване на скоростта на седиментообразуване при добиването и преработването им. Този факт също е потвърден в изследванията на Xiong и колектив [42], докладващи, че проблемите с образуването на седименти в процеса на добив на нефт се наблюдават значително по-често при леките типове отколкото при останалите типове нефт.

Заклучение

Извършен е анализ на значителен по обем литературни данни за групов въглеродороден състав на свръх леки, леки, средни, тежки и свръх тежки типове нефт, нефтени пясъци и битуми. Установено е, че най-използваният метод за SARA анализ на нефт е ASTM D 2007, следван от метода на течната хромато-

графия. Значително по-малко приложение са намерили методите на високо ефективна течна хроматография (HPLC) и модифицирания метод ASTM D 4124, който е разработен за анализиране на битуми и тежки нефтени остатъци. Методът на тънкослойната хроматография (TLC, Iatroscan) докладва резултати, значително отличаващи се от тези на останалите четири метода. За този метод също се съобщава в научната литература, че се отличава с по-висока неточност [47].

Изведено е уравнение, което предсказва съдържанието на ароматни структури в нефта от неговата плътност със средно абсолютно отклонение от 7.5%. Увеличаването на плътността на нефта е свързано не само с повишаване съдържанието на ароматни структури, но и с увеличаване на относителния дял на смолно-асфалтови компоненти в тези ароматни структури.

Типовете нефт с по-високо съдържание на наситени компоненти имат по-висок индекс на колоидна нестабилност, което предполага по-голяма склонност към образуване на седименти в процеса на техния доби и преработка.

Литература

1. Alabdullah, M.A., R. Gomez, Alberto, V., Jullian, Bendjeriou-Sedjerari, A., Wei Xu, Abba, Ibrahim A. Gascon, J. (2020). A Viewpoint on the Refinery of the Future: Catalyst and Process Challenges. ACS Catal, 10, 15, 8131–8140, <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c02209>.

2. World Oil Outlook 2040. The Organization of the Petroleum Exporting Countries (2019).
3. Stratiev, D. S., Dinkov, R. K., Shishkova, I. K., Nedelchev, A., Tsaneva, T., Nikolaychuk, E., Sharafutdinov, I., Rudnev, N., Nenov, S., Mitkova, M., Skumov, M., Yordanov, D., (2015). "Investigation on feasibility to simulate distribution of boiling point and molecular weight of heavy oils". *Petroleum Science and Technology*, 33:527–541, DOI: 10.1080/10916466.2014.999945.
4. Boduszynski, M. M. (1988). Composition of heavy petroleums. 2. Molecular characterization. *Energy Fuels* 2:597–613.
5. Hsu, C.S. (2017). "Springer Handbook of Petroleum Technology", Paul R. Robinson.
6. Redelius, P., Soenen, H. (2015). Relation between bitumen chemistry and performance. *Fuels*;140:34–43.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.09.044>.
7. Le Guern, M., Chailleux, E., Farcas, F., Dreessen, S., Mabilie, I. (2010). Physico-chemical analysis of five hard bitumens: identification of chemical species and molecular organization before and after artificial aging. *Fuels* 89:3330–9.
8. Lesueur, D. (2009). The colloidal structure of bitumen: consequences on the rheology and on the mechanisms of bitumen modification. *Adv Colloid Interface Sci* 145:42–82.
9. Keshmirizadeh, E., Shobeirian, S., Memariani, M. (2013). Determination of saturates, aromatics, resins and asphaltenes (SARA) fractions in Iran crude oil sample with chromatography methods: study of the geochemical parameters. *J. Appl. Chem. Res.* 7:15–24.
10. Kharrat, A. M., Zacharia, J., Cherian, V. J., Anyatonwu, A. (2007). Issues with comparing SARA methodologies. *Energy Fuels* 21:3618–21.
11. Fan, T., Buckley, J. S., (2002). Rapid and accurate SARA analysis of medium gravity crude oils. *Energy Fuels*, 16, p. 1571–5.
12. Hinkle, A., Shin, E.-J., Liberatore, M. W., Herring, A. M., Batzle, M. (2008). Correlating the chemical and physical properties of a set of heavy oils from around the world. *Fuel*, 87, p. 3065–70.
13. Guzmán, R., Ancheyta, J., Trejo, F., Rodríguez, S. (2017). Methods for determining asphaltene stability in crude oils. *Fuel*, 188, p. 530–43.
14. Reyes-Gonzalez, D., Ramirez-Jaramillo, E., Manero, O., Lira-Galeana, C., del Rio, J. (2016). Estimation of the SARA composition of crude oils from bubblepoint pressure data. *Energy Fuels*, 30, p. 6913–22.
15. Rudyk, Sv. (2018). Relationships between SARA fractions of conventional oil, heavy oil, natural bitumen and residues, *Fuel*, 216, p. 330–340.
16. Abutaiya, M., Sisco, C. J., Khemka, Y., Safa, M. A., Ghloum, E. F., Rashed, A. M., Gharbi, R., Santhanagopalan, S., Al-Qahtani, M., Al-Kandari, E., Vargas, F.M., (2020). Accurate Modeling of Asphaltene Onset Pressure in Crude Oils Under Gas Injection Using Peng–Robinson Equation of Stat. *Energy Fuels*, 34, p. 4055–4070.
17. David Ting, P., Hirasaki, G. J., Chapman, W. G. (2003). Modeling of Asphaltene Phase Behavior with the SAFT Equation of State. *Pet. Sci. Technol.*, 21 (3–4), p. 647–661.
18. Panuganti, S. R., Vargas, F. M., Gonzalez, D. L., Kurup, A. S., Chapman, W. G. (2012). PC-SAFT characterization of crude oils and modeling of asphaltene phase behavior. *Fuel*, 93, p. 658–669.
19. Punnapala, S., Vargas, F. M. (2013). Revisiting the PC-SAFT characterization procedure for an improved asphaltene precipitation prediction. *Fuel*, 108, p. 417–429.
20. Abutaiya, M., Sisco, C. J., Wang, J., Vargas, F. M. (2019). Systematic Investigation of Asphaltene Deposition in the Wellbore and Near-Wellbore Region of a Deepwater Oil Reservoir Under Gas Injection. Part 1: Thermodynamic Modeling of the Phase Behavior of Poly-disperse Asphaltenes. *Energy Fuels*, 33, p. 3632–3644.
21. Sisco, C. J., Abutaiya, M. I. L., Wang, F., Zhang, J., Tavakkoli, M., Vargas, F. M. (2018). Asphaltene Precipitation Modeling. In *Asphaltene Deposition: Fundamentals, Prediction, Prevention, and Remediation*, 1st ed. CRC Press: Boca Raton, FL, p. 111–159.
22. Hao, J., Che, Y., Tian, Y., Li, D., Zhang, J., Qiao, Y. (2017). Thermal cracking characteristics and kinetics of oil sand bitumen and its SARA fractions by TG–FTIR. *Energy Fuels*, 31, p. 1295–309.
23. Xu, C., Gao, J., Zhao, S., Lin, S. (2005). Correlation between feedstock SARA components and FCC product yields. *Fuel*, 84, p. 669–674 <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2004.08.009>.
24. Fukuyama, H. & Terai, S. (2007). Kinetic Study on the Hydrocracking Reaction of Vacuum

Residue Using a Lumping Model. *Petroleum Science and Technology*, 25 (1-2), p. 277-287.

25. Hao, Junhui, Che, Yuanjun, Tian, Yuanyu*, Li, Dawei, Zhang, Jinhong and Qiao, Yingyun (2017). Thermal Cracking Characteristics and Kinetics of Oil Sand Bitumen and Its SARA Fractions by TG-FTIR. *Energy Fuels* 31, 2, p. 1295-1309, <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.6b02598>.

26. Fals, Jayson, Rafael García, Juan, Falco, Marisa, Sedran, Ulises (2018). Impact on Y zeolite acidity and physical properties. Coke from SARA fractions in VGO. *Fuel* (225), p. 26-34, <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.02.180>.

27. Pujro, R., Falco, M., Devard, A., Sedran, U. (2014). Reactivity of the saturated, aromatic and resin fractions of ATR resids under FCC conditions. *Fuel* (119), p. 219-225. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.11.052>.

28. Stratiev, D., Minkov, D., Haas, A. (1997). Removal of coke precursors – influence on FCC yield distribution. *Erdol Erdgas Kohle* (113), p. 436-439.

29. Hauser, A., Alhumaidan, F., Al-Rabiah, H., Absi Halabi, M. (2014). Study on thermal cracking of Kuwaiti heavy oil (vacuum residue) and Its SARA fractions by NMR spectroscopy. *Energy Fuels* (28), p. 4321-4332. <https://doi.org/10.1021/ef401476j>.

30. Haitao, S., Guofeng, J., Xinyi, Z., Xiang, Z., Yuxia, Z., Zhijian, D. (2013). Hydrocarbon composition of different VGO feedstocks and its correlation with FCC product distribution. *CHINA PET PROCESS PE*. (15), p. 32-39.

31. Fortain, P.D. (2010). Étude de la réactivité des résidus pétroliers en hydroconversion. PhD thesis. l'Université Bordeaux 1.

32. Félix, Guillermo, Ancheyta, Jorge (2019). Comparison of hydrocracking kinetic models based on SARA fractions obtained in slurry-phase reactor. *Fuel* (241), p. 495-505 <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.11.153>.

33. David, C., Santos, Sofia D., Filipakis, Marlus P., Rolemberg, Eduardo R. A., Lima, Márcio L., Paredes. (2017). Asphaltene flocculation parameter in Brazilian crude oils and synthetic polar and nonpolar mixtures. Experimental and modeling, *Fuel* (199), p. 606-615.

34. Sanchez-Minero, Felipe, Ancheyta, Jorge, Silva-Oliver, Guadalupe, Flores-Valle, Sergio (2012). Predicting SARA composition of crude oil by means of NMR. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2012.10.027>.

35. Aske, Narve, Kallevik, Harald, and Sjöblom, Johan (2001). Determination of Saturate, Aromatic, Resin, and Asphaltenic (SARA) Components in Crude Oils by Means of Infrared and Near-Infrared Spectroscopy. *Energy Fuels* (15), p. 1304-1312.

36. Vincent J., Sieben, Alexander J. , Stickel, Collins, Obiosa-Maife, Rowbotham, Jacalyn, Afzal, Memon, Nejib, Hamed, Ratulowski, John and Mostowfi, Farshid (2017). Optical Measurement of Saturates, Aromatics, Resins, And Asphaltenes in Crude Oil. *Energy Fuels* DOI: 10.1021/acs.energyfuels.6b03274.

37. Tianguang, Fan, Wang, Jianxin, Jill, S. (2002). Buckley. Evaluating Crude Oils by SARA Analysis. Society of Petroleum Engineers, SPE-75228-MS, <https://doi.org/10.2118/75228-MS>.

38. Mohan Sinnathambi, Chandra and Mohamad Nor, Norhusna (2012). Relationship Between SARA Fractions and Crude Oil Fouling. *Journal of Applied Sciences*, (12), p. 2479-2483. DOI: 10.3923/jas.2012.2479.2483.

39. Gateau, I. Hénaut, Barré, L. and Argillier, J. F. , (2004). Heavy Oil Dilution. *Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP*, Vol. 59 (5), p. 503-509.

40. Brough, Sarah A., Riley, Sandra H. , Sean McGrady, G., Tanhawiriyakul, Supaporn, Romero-Zero'n, Laura and Willson, Christopher D. (2010). Low temperature extraction and upgrading of oil sands and bitumen in supercritical fluid mixtures. *Chem. Commun.* (46), p. 4923-4925.

41. Akbarzadeh, Kamran, Dhillon, Amandeep , Svrcek, William, Y. and Yarranton, Harvey W.(2004). Methodology for the Characterization and Modeling of Asphaltene Precipitation from Heavy Oils Diluted with n-Alkanes. *Energy Fuels* (18), p. 1434-1441.

42. Xiong, R., Guo, J., Kiyangi, W., Feng, H., Sun, T., Yang, X., Li, Q. (2020). Method for Judging the Stability of Asphaltenes in Crude Oil. *ACS Omega* (5), 34, p. 21420-21427.

43. Abeed, Qusay, Leythaeuser, Detlev, Littke, Ralf (2012). Geochemistry, origin and correlation of crude oils in Lower Cretaceous sedimentary sequences of the southern Mesopotamian Basin, southern Iraq. *Organic Geochemistry* (46), p. 113-126.

44. Rajeev, Kumar, Maheshwari, Sonal, Ravi, Kumar Voolapalli, Sreedevi, Upadhyayula (2021). Investigation of Physical Parameters of Crude Oils and Their Impact on Kinematic Viscosity, of Vacuum Residue and Heavy

Product Blends for Crude Oil Selectionp. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.

45. M.A. Coronel-García, A.I. Reyes de la Torre, J.M. Domínguez-Esquivel, J.A. Melo-Banda, A.L. Martínez-Salazar. (2021) Heavy oil hydrocracking kinetics with nano-nickel dispersed in PEG300 as slurry phase catalyst using batch reactor. Fuel (283), p. 495–505

46. Stratiev, D., Shishkova, I., Dinkov, R., Yordanov, D., Ilchev, I., Toteva, V. (2020). Effect of H-Oil HCVR Quality Variation on the feasibility to produce road asphalt thereof. Oxidation communications, 43 (3), p. 545.

47. Youtcheff, J. Automated High-Performance Liquid Chromatography Saturate, Aromatic, Resin, and Asphaltene Separation Technical Report FHWA-HRT-15-055.

Лиляна Георгиева Тодорова – Янкова

e-mail: litoian@abv.bg

Доц. д-р Добромир Иванов Йорданов
Зам. Декан на Факултет по обществени науки,
Университет „Проф. д-р Асен Златаров“, Бургас

e-mail: dobromirj@abv.bg

Ст.н.с. II ст. д-р Дичо Стоянов Стратиев
Главен технолог на „Лукойл Нефтохим Бургас“ АД

e-mail: stratiev.dicho@neftochim.bg

Д-р инж. Ивелина Костова Шишкова
„Лукойл Нефтохим Бургас“ АД

e-mail: shishkova.ivelina.k@neftochim.bg



ИЗСЛЕДВАНЕ НА ГРУПОВИЯ ВЪГЛЕВОДОРОДЕН СЪСТАВ НА ВАКУУМНИ ОСТАТЪЦИ ОТ РАЗЛИЧНИ ТИПОВЕ НЕФТ, НЕФТЕНИ ПЯСЪЦИ И БИТУМИ

Лиляна Тодорова-Янкова, Добромир Йорданов, Дичо Стратиев, Ивелина Шишкова

INVESTIGATION OF THE GROUP HYDROCARBON COMPOSITION OF VACUUM RESIDUES FROM DIFFERENT TYPES OF CRUDE OIL, CRUDE OIL SANDS AND BITUMENS

Lilyana Todorova-Yankova, Dobromir Yordanov, Dicho Stratiev, Ivelina Shishkova

ABSTRACT: This article presents a study on the various methods for analyzing the group hydrocarbon composition of vacuum residues obtained by vacuum distillation of ultralight, light, medium, heavy and ultra heavy types of oil, oil sands and bitumens reported in the scientific literature. 175 samples of vacuum residue were studied, the group hydrocarbon composition of which was determined by the methods: ASTM D 2007, ASTM D 4124, liquid chromatography, high performance liquid chromatography and thin layer chromatography. Correlation analysis examined the relationships between the contents of the individual hydrocarbon groups analyzed by the five different methods. Using the nonlinear least squares method, the derived equation allows predicting the content of aromatic structures in vacuum residue of ultralight, light, medium, heavy and ultra heavy types of crude oil, crude oil sands and bitumens reported in the scientific literature. This equation can be used to verify the correctness of the analysis performed for a group hydrocarbon composition of crude oil. If the deviation is greater than 4%, the analysis may be considered incorrect and should be repeated.

Key words: petroleum vacuum residue, group hydrocarbon composition, saturates, aromatics, resins, asphaltenes

Въведение

Вакуумният остатък (гудрон), получаван при вакуумната дестилация на атмосферния остатък, получен при атмосферна дестилация на нефт е най-ниско стойностния нефтен дериват. Причината за ниската стойност на този нефтопродукт се дължи на ограниченото му приложение. Той може да се използва като суровина за получаване на пътни битуми, компонент за производството на тежко котелно гориво, чието приложение значително се ограничи след влизане от 01.01.2020г. на спецификацията IMO 2020 [1], и като суровина за конверсионните процеси термичен крекинг (висбрейкинг и коксуване [2, 3]), и хидропреработване (хидрокрекинг, хидротретирание [4, 5]). Гудронът е най-широката нефтена фракция с интервал на кипене над 540°C и край на кипене между 1000 и 2000°C [6]. Над 95% от молекулите, които влизат в състава на един гудрон никога не са били изолирани или идентифицирани

и следователно могат да се считат неизвестни за човечеството [7]. Ето защо един от основните методи за охарактеризиране на гудрони е неговото фракциониране на наситени (saturates), ароматни (aromatics), смоли (resins) и асфалтени (asphaltenes) = SARA [8, 9]. Груповият въглеводороден състав на гудрона, известен с абревиатурата SARA, е важна характеристика на вакуумния остатък при използването му като суровина за различни конверсионни процеси [10-17]. Неговото извършване позволява да се намали сложността на сместа от компоненти, които изграждат гудрона и да се приложат съвременни инструментални методи за анализ, които да анализират отделните SARA фракции [19, 20]. Както и при SARA анализа на нефта, така и при анализа на гудрона се използват различни техники, които могат да бъдат квалифицирани в пет основни метода: ASTM D 2007, ASTM D 4124, течна хроматография (LC), високо ефективна течна хроматография (HPLC), и тънко слойна хроматография [21]. Имайки предвид, че оценката на действието на различните процеси за пре-

работване на вакуумни остатъци зависи от информацията, която SARA анализа дава и факта, че различните методи могат да докладват различни резултати представлява интерес зависимостите между съдържанието на индивидуалните въглеводородни групи и метода, по който тяхното съдържание се определя.

Това обуславя целта на настоящото изследване, а именно обобщаване на голям по обем данни, докладвани в литературата за групов въглеводороден състав на вакуумни остатъци, получени от различни типове нефт, получени от различни методи и търсенето на зависимости между SARA състава, физико-химичните свойства на гудрона. и различните докладвани в литературата характеристични индекси.

Експериментална част

Таблица 1 Групов въглеводороден (SARA) състав на 175 проби от гудрон, получени при вакуумна дестилация на свръх леки, леки, средни, тежки, свръх тежки типове нефт и нефтени пясъци и природни битуми

Nr		Отн. плътност	Наситени, мас. %	Ароматни, мас. %	Смоли, мас. %	Асфалтени, мас. %	Ароматни структури, мас. %	Материален баланс, мас.	SARA (НАСА) метод
1	Daqing [22]	0,9392	41,9	32,7	25,4	0	58,1	100,0	течна хроматография
2	Shengli [22]	0,9724	16,1	30,6	51,1	2,2	83,9	100,0	течна хроматография
3	Saudi light [22]	1,0045	16,5	49,5	26,8	7,3	83,6	100,1	течна хроматография
4	Saudi medium [22]	1,0258	15,9	40	33,7	9,3	83	98,9	течна хроматография
5	Iranian light [22]	1,0057	18,5	44,8	30,6	6,1	81,5	100,0	течна хроматография
6	Iranian heavy [22]	1,0222	12,6	46,6	29,9	10,8	87,3	99,9	течна хроматография
7	Oman [22]	0,9637	26,3	40,6	31,2	2	73,8	100,1	течна хроматография
8	Athabasca bitumen [22]	1,0596	6,3	33	29,4	31,4	93,8	100,1	течна хроматография
9	REBCO [23]	0,9984	24	62,7	10,2	3,2	76,1	100,1	течна хроматография
10	MVBF [24]	1,015	14,76	67,9	6,4	10,5	84,8	99,6	течна хроматография
11	HRA [24]	1,0516	5,63	68,1	11,9	13,7	93,7	99,3	течна хроматография
12	BHSR [24]	0,9608	32,89	59,8	4,23	4,5	68,53	101,4	течна хроматография
13	Dagang [22]	0,979	30	32,2	37,3	0,5	70	100,0	течна хроматография
14	Gudao [22]	0,9945	17,3	31	48,4	3,3	82,7	100,0	течна хроматография
15	SQVR [22]	1,0173	19,7	60	20,3	0	80,3	100,0	течна хроматография
16	SZVR [22]	1,0209	15,7	52,7	31,6	0	84,3	100,0	течна хроматография
17	Resid A [25]	1,0546	10,8	48,4	11,1	29,2	88,7	99,5	течна хроматография

175 проби от вакуумни остатъци, получени от свръх леки, леки, средни, тежки, свръх тежки типове нефт, нефтени пясъци и природни битуми са анализирани за SARA състав в 25 [22-46]. Табл.1 обобщава данните за груповия състав (SARA = НАСА), съдържанието на ароматни структури (сумата от всички фракции, които съдържат ароматен въглерод. Това са ароматни, смолни и асфалтенови компоненти) и относителната плътност на изследваните 175 проби от гудрони. Пет метода са споменати като използвани за анализа на SARA състава на вакуумните остатъци и тяхното процентно разпределение за базата данни от 175 проби от гудрон е представена в Табл. 2.

18	Resid B [25]	1,0706	11,8	45	11,4	32,4	88,8	100,6	течна хроматография
19	Resid D [25]	1,0316	18,9	61,2	12,2	8,6	82	100,9	течна хроматография
20	Resid E [25]	0,9936	27,5	54,7	14,9	4,4	74	101,5	течна хроматография
21	Resid F [25]	1,0456	6,3	47,1	37,4	12	96,5	102,8	течна хроматография
22	Columbian VR1 [26]	0,9968	16,1	41,1	36,4	6,3	83,8	99,9	течна хроматография
23	Columbian VR2 [26]	1,0118	14,6	42,3	37,2	5,8	85,3	99,9	ASTM D2007
24	Columbian VR3 [26]	1,0273	12,1	55,1	18,4	14,4	87,9	100,0	ASTM D2007
25	Columbian VR4 [26]	1,0155	6,3	53,3	29	11,4	93,7	100,0	ASTM D2007
26	Columbian VR5 [26]	1,0319	13,4	36,1	30,7	19,8	86,6	100,0	ASTM D2007
27	Columbian VR6 [26]	1,0046	17,5	38,4	33,6	10,4	82,4	99,9	ASTM D2007
28	Columbian VR7 [26]	0,9926	22,5	44,2	27	6,3	77,5	100,0	ASTM D2007
29	Columbian VR8 [26]	0,9961	20,8	41,9	32,7	4,6	79,2	100,0	ASTM D2007
30	Columbian VR9 [26]	0,9849	17,5	39,9	30,8	11,8	82,5	100,0	ASTM D2007
31	Athabasca [27]	1,0231	16,3	39,8	28,5	14,7	83	99,3	ASTM D2007M
32	Cold lake [27]	1,0019	19,4	38,1	26,7	15,5	80,3	99,7	ASTM D2007M
33	Lloydminster[27]	0,9968	23,1	41,7	19,5	15,3	76,5	99,6	ASTM D2007M
34	Peace River [27]	1,003	20,8	41,1	22,1	16	79,2	100,0	ASTM D2007M
35	Venezuela 1 [27]	1,0176	15,4	44,4	25	15	84,4	99,8	ASTM D2007M
36	Venezuela 2 [27]	1,0167	20,5	38	19,6	21,8	79,4	99,9	ASTM D2007M
37	Russia [27]	0,9822	25	31,1	37,1	6,8	75	100,0	ASTM D2007M
38	Indonesia [27]	0,9629	23,2	33,9	38,2	4,7	76,8	100,0	ASTM D2007M
39	Ural straight-run vacuum residue [28]	1,0029	12,4	45,1	35,9	4,7	85,7	98,1	течна хроматография
40	30 % DAO from Daqing VR [29]	0,9071	67,4	23,9	8,7	0	32,6	100,0	течна хроматография
41	40 % DAO from Daqing VR [29]	0,9103	66,5	24,7	8,8	0	33,5	100,0	течна хроматография
42	50 % DAO from Daqing VR [29]	0,9121	63,4	25,6	11	0	36,6	100,0	течна хроматография
43	60 % DAO from Daqing VR [29]	0,9137	60,9	28	11,1	0	39,1	100,0	течна хроматография
44	50 % DAO from Shengli VR [29]	0,9459	45,2	36,2	18,7	0	54,9	100,1	течна хроматография
45	60 % DAO from Shengli VR [29]	0,9514	39	39,7	21,3	0	61	100,0	течна хроматография
46	30 % DAO from GudaoVR [29]	0,9446	44,3	41,5	14,2	0	55,7	100,0	течна хроматография
47	40 % DAO from Gudao VR [29]	0,949	42,4	42,1	15,6	0	57,7	100,1	течна хроматография
48	50 % DAO from Gudao VR [29]	0,9537	35,8	46,1	18,2	0	64,3	100,1	течна хроматография
49	60 % DAO from Gudao VR [29]	0,9588	32,2	47,4	20,4	0	67,8	100,0	течна хроматография

50	30 % DAO from DagangVR [29]	0,9291	57,9	29,3	12,9	0	42,2	100,1	течна хроматография
51	40 % DAO from Dagang VR [29]	0,9328	57,5	30,9	12	0	42,9	100,4	течна хроматография
52	50 % DAO from Dagang VR [29]	0,9359	51,5	34,6	13,9	0	48,5	100,0	течна хроматография
53	60 % DAO from Dagang VR [29]	0,9386	49,2	35,5	15,3	0	50,8	100,0	течна хроматография
54	30 % DAO from Huabei VR [29]	0,9197	64,8	25	10,2	0	35,2	100,0	течна хроматография
55	40 % DAO from Huabei VR [29]	0,9201	64,5	24,8	10,7	0	35,5	100,0	течна хроматография
56	50 % DAO from Huabei VR [29]	0,9236	60,4	27,4	12,2	0	39,6	100,0	течна хроматография
57	60 % DAO from Huabei VR [29]	0,9295	56,7	29,2	14,1	0	43,3	100,0	течна хроматография
58	30 % DAO from Liaohe VR [29]	0,9543	44,8	35,4	19,8	0	55,2	100,0	течна хроматография
59	40 % DAO from Liaohe VR [29]	0,9589	43,5	35,7	20,8	0	56,5	100,0	течна хроматография
60	50 % DAO from Liaohe VR [29]	0,962	38	38,1	23,9	0	62	100,0	течна хроматография
61	60 % DAO from Liaohe VR [29]	0,9667	35,2	39,7	25,1	0	64,8	100,0	течна хроматография
62	Gudao residual oil [30]	0,9969	15,5	33,3	48,1	3,1	84,5	100,0	течна хроматография
63	Cold lake VR [31]	1,0365	11	38,7	32,6	17,7	89	100,0	течна хроматография
64	Forties VB [23]	1,0364	14,5	59,94	16,35	9,1	85,39	99,9	течна хроматография
65	Cold Lake vacuum bottoms [32]	1,0364	11,12	46,28	18,22	24,4	88,9	100,0	течна хроматография
66	Venezuela Orinoco Vacuum Residue [33]	1,0388	12,51	42,69	33,56	11,24	87,49	100,0	течна хроматография
67	Daqing VR [34]	0,9289	43,38	37,52	18,9	0,2	56,62	100,0	течна хроматография
68	KaramayVR [34]	0,984	22,03	28,05	49,37	0,55	77,97	100,0	течна хроматография
69	LiaoheVR [34]	1,0034	11,18	36,83	47,65	4,34	88,82	100,0	течна хроматография
70	VenezuelaVR [34]	1,0532	8,52	40,34	33,66	17,48	91,48	100,0	течна хроматография
71	REF [35]	1,0395	0,9	62,8	36,3	0	99,1	100,0	ASTM D2007
72	Dagang atmospheric residue SFEF7 [36]	0,9103	58,3	35,57	6,12	0	41,69	100,0	течна хроматография
73	Dagang atmospheric residue SFEF8 [12]	0,9267	49,7	40,67	9,62	0	50,29	100,0	течна хроматография
74	Saudi light VR1 [36]	0,9432	46,89	47,96	5,16	0	53,12	100,0	течна хроматография
75	Saudi light VR2 [36]	0,9559	40,91	52,73	6,35	0	59,08	100,0	течна хроматография
76	Saudi light VR3 [36]	0,9634	32,34	58,88	8,78	0	67,66	100,0	течна хроматография
77	Saudi light VR4 [36]	0,9714	28,89	62,18	8,93	0	71,11	100,0	течна хроматография
78	Saudi light VR5 [36]	0,9789	24,02	66,82	9,16	0	75,98	100,0	течна хроматография
79	Saudi light VR6 [36]	0,9947	15,41	71,1	13,48	0	84,58	100,0	течна хроматография
80	Saudi light VR7 [36]	1,0232	5,56	73,65	20,8	0	94,45	100,0	течна хроматография
81	Saudi light VR8 [36]	1,0606	1,22	72,46	26,31	0	98,77	100,0	течна хроматография

82	Saudi medium VR2 [36]	0,9484	40,82	51,35	7,92	0	59,27	100,1	течна хроматография
83	Saudi medium VR3 [36]	0,961	31	59	9,9	0	68,9	99,9	течна хроматография
84	Saudi medium VR4 [36]	0,974	24,89	62,8	12,31	0	75,11	100,0	течна хроматография
85	Saudi medium VR5 [36]	0,9937	8,67	76,68	14,64	0	91,32	100,0	течна хроматография
86	Saudi medium VR6 [36]	1,0056	2,49	74,68	22,83	0	97,51	100,0	течна хроматография
87	Saudi medium VR7 [36]	1,032	0	72,92	27,07	0	99,99	100,0	течна хроматография
88	A3[37]	1,038	9,2	39,9	35,7	15,2	90,8	100,0	течна хроматография
89	B1[37]	0,9814	18,8	33,7	45,7	1,8	81,2	100,0	течна хроматография
90	B2 [37]	0,9998	14,5	34,8	47,2	3,5	85,5	100,0	течна хроматография
91	B3 [37]	0,9835	22,1	38,7	35,9	3,3	77,9	100,0	течна хроматография
92	C1[37]	0,9718	30,9	38,5	29,5	1,1	69,1	100,0	течна хроматография
93	C3 [37]	1,0364	6,3	3,5	84,6	5,6	93,7	100,0	течна хроматография
94	C4 [37]	1,0146	21,5	19,1	56	3,4	78,5	100,0	течна хроматография
95	D1[37]	0,9538	39,8	30,1	29,3	0,8	60,2	100,0	течна хроматография
96	D2 [37]	0,9629	34,1	32	33,1	0,8	65,9	100,0	течна хроматография
97	D3 [37]	0,9881	19,4	35	44,7	0,9	80,6	100,0	течна хроматография
98	Texas [38]	1,119	4	17	37	43	97	101,0	течна хроматография
99	Alaska [38]	0,997	23	22	35	18	75	98,0	течна хроматография
100	Canada 1 [38]	1,014	18	33	30	20	83	101,0	течна хроматография
101	Utah [38]	1	19	14	46	20	80	99,0	течна хроматография
102	Venezuela [38]	1,013	19	32	29	18	79	98,0	течна хроматография
103	Tempa Rossa [39]	1,12	2	48,8	12,4	36,8	98	100,0	течна хроматография
104	Urals1 [40]	1,00	14	36,2	43	6,8	86	100,0	ASTM D4124
105	ME, [40]	1,05	8	39,2	44	8,8	92	100,0	ASTM D4124
106	LSCO, [40]	0,99	15,5	38	41	5,5	84,5	100,0	ASTM D4124
107	85%Ur/15% ME, [40]	1,00	13,7	36,3	43,4	6,6	86,3	100,0	ASTM D4124
108	80%Ur/20% ME, [40]	1,01	13,3	39,9	40,3	6,5	86,7	100,0	ASTM D4124
109	70%Ur/30% ME, [40]	1,01	11,7	36,8	43,7	7,8	88,3	100,0	ASTM D4124
110	14%Ur/36%LSCO/50%ME [40]	1,02	10,1	39,1	42,7	8,1	89,9	100,0	ASTM D4124
111	Madero [41]	1,05	8,4	23,2	41,5	26,8	91,5	99,9	ASTM D4124
112	Tula [41]	1,05	7,2	28,2	42	21,6	91,8	99,0	ASTM D4124
113	Salina Cruz [41]	1,03	9,5	30,2	41,2	18,5	89,9	99,4	ASTM D4124

114	Salamanca [41]	1,03	8,5	29,6	40	18,3	87,9	96,4	ASTM D4124
115	Minatitlán [41]	1,03	11	32,4	37,7	18,2	88,3	99,3	ASTM D4124
116	VR 1 [42]	1,00	29,1	41,6	23,4	5,9	70,9	100,0	ASTM D2007
117	VR 2 [42]	1,06	5,5	39,1	26,1	29,3	94,5	100,0	ASTM D2007
118	VR 3 [42]	1,07	3,5	38,1	29,2	29,2	96,5	100,0	ASTM D2007
119	VR 4 [42]	1,06	7,3	37,5	24,9	30,3	92,7	100,0	ASTM D2007
120	VR 5 [42]	1,03	13,2	44,4	31,6	10,8	86,8	100,0	ASTM D2007
121	VR 6 [42]	1,05	11,9	47,3	17,3	23,5	88,1	100,0	ASTM D2007
122	VR 7 [42]	1,07	4,2	34,1	32,9	28,8	95,8	100,0	ASTM D2007
123	VR 8 [42]	1,06	7,3	37,5	24,5	30,3	92,3	99,6	ASTM D2007
124	VR 9 [42]	1,07	2,8	36,4	28,2	32,6	97,2	100,0	ASTM D2007
125	Crude1 [43]	0,973	35,8	30,3	32,1	1,8	64,2	100,0	ASTM D2007
126	Crude2 [43]	0,997	27,9	31,7	32,1	7,3	71,1	99,0	ASTM D2007
127	Crude3 [43]	1,024	16	37,5	29,4	15,0	81,9	97,9	ASTM D2007
128	Crude4 [43]	0,995	20,5	39,2	36,5	3,6	79,3	99,8	ASTM D2007
129	Blend [43]	1,026	11,6	41,6	34,2	10,6	86,4	98,0	ASTM D2007
130	Crude6 [43]	1,071	5,8	28,6	32,8	30,3	91,7	97,5	ASTM D2007
131	Urals1 [44]	1,014	12,7	42,4	40,6	4,1	87,1	99,8	течна хроматография
132	Maya [44]	1,040	18	17	40	25,0	82	100,0	течна хроматография
133	Athabasca [44]	1,061	6,2	26,4	47,8	19,3	93,5	99,7	течна хроматография
134	Morichal [44]	1,040	10,5	30	43,6	15,8	89,4	99,9	течна хроматография
135	Arabian Heavy [44]	1,045	7,2	38,2	37,1	16,8	92,1	99,3	течна хроматография
136	Athabasca [45]	1,044	6,8	31,2	47,9	14,1	93,2	100,0	течна хроматография
137	Urals [45]	1,003	11,7	46,1	37,6	4,6	88,3	100,0	течна хроматография
138	Duri [45]	0,964	21	28,6	44,7	5,7	79	100,0	течна хроматография
139	Arab Light [45]	1,022	11,6	48,6	32,1	7,7	88,4	100,0	течна хроматография
140	Rhem [39]	1,039	15	49,8	12	23,2	85	100,0	течна хроматография
141	VRO-1 [39]	1,071	0,8	51,6	38,2	9,4	99,2	100,0	TLC-FID (Iatroscan)
142	VRO-2 [39]	1,056	8	49,4	31,8	10,8	92	100,0	TLC-FID (Iatroscan)
143	VRO-3 [39]	1,076	5	36,6	41,6	16,8	95	100,0	TLC-FID (Iatroscan)
144	VRO-4 [39]	1,010	19,4	51	17,6	12	80,6	100,0	TLC-FID (Iatroscan)

145	VRO-5 [39]	1,010	20,3	47,3	20,2	12,2	79,7	100,0	TLC-FID (Iatroscan)
146	VRO-6 [39]	1,056	5,7	46	34,8	13,5	94,3	100,0	TLC-FID (Iatroscan)
147	VRO-7 [39]	1,010	6,5	55	25,8	12,7	93,5	100,0	TLC-FID (Iatroscan)
148	VRO-8 [39]	1,056	2,3	41,1	43,9	12,7	97,7	100,0	TLC-FID (Iatroscan)
149	VRO-9 (Deasphalted VRO) [39]	1,076	0,8	54,5	34,1	10,6	99,2	100,0	TLC-FID (Iatroscan)
150	VRO 9 [39]	1,010	11,6	58,6	25,9	3,9	88,4	100,0	TLC-FID (Iatroscan)
151	VRO-11 [39]	1,010	18	38	27	16	81	99,0	TLC-FID (Iatroscan)
152	VRO-12 [39]	1,010	20	36	30	11	77	97,0	TLC-FID (Iatroscan)
153	100% Urals [39]	0,996	19,8	62,9	11,7	5,7	80,3	100,0	HPLC
154	100% Urals [39]	0,995	18,2	60,8	14,0	6,9	81,7	100,0	HPLC
155	80% Ur./20%ME [39]	1,007	17,8	64,5	11,0	6,7	82,2	100,0	HPLC
156	70%Ur./30%ME [39]	1,012	15,9	66,6	10,9	6,6	84,1	100,0	HPLC
157	50%Ur./50%ME [39]	1,023	14,0	69,8	9,4	6,9	86,0	100,0	HPLC
158	Urals1 [46]	0,996	25,6	52,5	7,8	14,1	74,4	100,0	течна хроматография
159	Urals2 [46]	0,995	22,4	66,5	4,9	6,3	77,7	100,1	течна хроматография
160	Arab Medium [46]	1,030	11,8	68,3	5,3	14,6	88,2	100,0	течна хроматография
161	Arab Heavy1 [46]	1,040	12,4	61,9	4,4	21,3	87,6	100,0	течна хроматография
162	Arab Heavy2 [46]	1,047	12,0	62,2	6,1	19,9	88,2	100,2	течна хроматография
163	Val'Dagri [46]	1,052	11,7	73,5	6,4	8,5	88,3	100,0	течна хроматография
164	Basrah Light1 [46]	1,051	12,3	64,8	4,9	18,0	87,7	100,0	течна хроматография
165	Basrah Heavy [46]	1,070	12,3	54,1	5,8	27,7	87,7	100,0	течна хроматография
166	Kirkuk [46]	1,053	15,2	55,4	5,0	24,3	84,8	100,0	течна хроматография
167	Iranian Heavy [46]	1,049	17,0	52,6	5,0	25,4	83,0	100,0	течна хроматография
168	Kuwait Export Blend [46]	1,036	15,0	64,2	4,2	16,6	85,0	100,0	течна хроматография
169	El Bourri [46]	1,049	12,0	57,9	12,6	17,5	88,0	100,0	течна хроматография
170	Kazakh Heavy [46]	0,989	33,0	50,2	5,7	11,1	67,0	100,0	течна хроматография
171	ISAB Residual Blend [46]	1,042	16,9	57,6	5,9	19,6	83,1	100,0	течна хроматография
172	Kazakh Heavy [46]	0,973	36,9	44,9	5,8	12,3	63,1	100,0	течна хроматография
173	Kazakh Heavy [46]	0,967	44,5	42,7	9,8	3,0	55,5	100,0	течна хроматография
174	CPC1 [46]	0,956	44,4	46,2	3,8	5,6	55,6	100,0	течна хроматография
175	LSCO1 [46]	0,992	25,0	61,1	6,1	7,8	75,0	100,0	течна хроматография

Таблица 2 Разпределение на използваните методи за анализ на групов (SARA) състав на 175 проби от гудрон със свойства, посочени в Табл.1

Методи за анализ на групов състав на нефт	% от общо изследваните типове нефт
ASTM D2007	18
Течна хроматография	65.1
Високо ефективна течна хроматография (HPLC)	2.9
Тънко слойна хроматография (TLC–FID (Iatroscan))	6.9
ASTM D4124	6.9

Резултати и обсъждане

Данните в Табл.2 показват, че най-широко приложение за анализ на SARA състав на гудрон е намерил метода на течната хроматография, следван от стандартизираните методи ASTM D 2007 и ASTM D 4124, тънкослойната хроматография и на последно място заема метода на високо ефективната течна хроматография. Тук трябва да се отбележи, че докато стандартизираните методи предполагат извършване на фракционирането на гудрона на наситени, ароматни, смолни и асфалтенови компоненти следвайки една и съща методика, то метода на течната хроматография се прилага от различните изследователи, следвайки различни методики. Така например Стратиев и колектив [47] сравнявайки два метода на течна хроматография: метода на ЛУКОЙЛ Нефтохим Бургас (ЛНБ) [48] и метода на Френския Институт по петрола (IFP 9305) при анализирането на едни и същи гудронови проби установяват, че докато при съдържанието на наситени и асфалтенови компоненти има сравнително добро съответствие, то при съдържанието на ароматни и смолни компоненти разликите са много големи. Основната причина за това различие в съдържанието на ароматни и смолни компоненти по двете различни методики на течната хроматография се дължи на различните елюенти, използвани за елюиране на адсорбираните ароматни и смолни компоненти върху пълнежа от адсорбент на хромаграфската колона. Методът на ЛНБ използва толуен за елюиране на ароматните компоненти и смес от толуен и етанол в съотношение 50/50 за елюиране на смолните компоненти [48]. Методът IFP 9305 използва смес от нормален хептан и толуен в съотношение 2/1 за елюиране на ароматните компоненти и смес от толуен, дихлорметан и метанол в съотношение 1/1/1 за елюиране на смолните компоненти. Методът на ЛНБ използва като адсорбент силикагел, докато методът IFP 9305 използва като адсорбент силициев диоксид и двуалу-

миниев триоксид в съотношение 20/35. Въпреки тези различия в използваните адсорбенти двата метода докладват съпоставими стойности на съдържанието на наситени компоненти. Очевидно използването на различните елюенти от двата метода на течната хроматография се явяват причината за докладваните значително различаващите се стойности за съдържанието на ароматни и смолни компоненти.

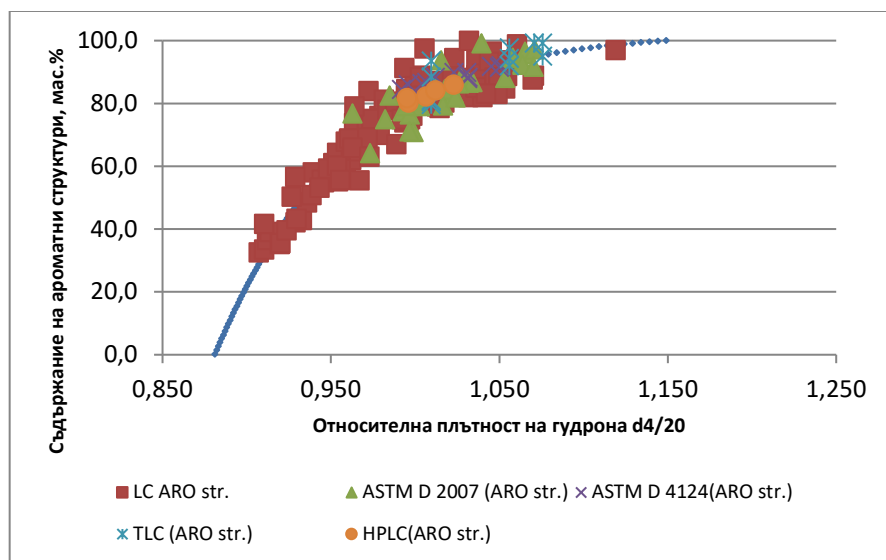
Подобно на констатацията от нашето предишно изследване [21] за несъвместимостта на резултатите от четирите метода за SARA анализ на нефт (ASTM D 2007, ASTM D 4124, течна хроматография и високо ефективна течна хроматография) с резултатите за SARA анализ на нефт по метода на тънкослойната хроматография Стратиев и колектив [47] също докладват за значително различие на резултатите от SARA анализ на едни и същи проби от гудрон по метода на тънкослойната хроматография и двата метода течна хроматография (ЛНБ и IFP 9305) и метода на тънкослойната хроматография. Тези факти показват, че методът на тънкослойната хроматография докладва резултати несъвместими с останалите методи за определяне на SARA състава както на нефт, така и на гудрон. Интересно е да се отбележи, че подобно на установената статистически значима зависимост между съдържанието на ароматни структури (това са въглеводородните структури в състава на гудрона, които съдържат ароматен въглерод) и плътността на нефта се потвърждава и при гудрона както се вижда от данните на Фигура 1. Използвайки нелинейния метод на най-малките квадрати и данните за SARA състава на 175 изследвани гудрони беше изведено следното уравнение:

$$ARO = \frac{100}{0.14784226 + 9167.6983e^{-14.481246d}} - 573.92613 \quad (1)$$

Където

ARO = съдържание на ароматни структури в гудрона, мас. %

d = относителна плътност на гудрона d_4^{20}



Фиг. 1 Зависимост между относителната плътност на гудрона и съдържанието на ароматни структури в него (малките сини точки са стойностите на съдържанието на ароматни структури, изчислени чрез уравнение 1)

Уравнение 1 беше изведено приемайки, че функцията ARO е монотонно растяща. Съществува точка d_0 в интервала $[0.8, 0.9]$, за която $ARO = f(d_0) = 0$ (съдържание на ароматни структури = 0). Този интервал беше дефиниран от стойностите за плътността на различните SARA фракции, докладвани в изследванията [26, 49-51].

$ARO(d) < 100$ за всички стойности на $d \in [d_0, \infty]$.

Функцията апроксимира данните d , ARO от данните в Табл.1. Като модел на функцията $ARO(d)$ ние разглеждаме логистичната функция във вида

$$f_i(x; a_i, b_i, c_i, l_i) = \frac{100}{c_i + a_i \exp(-b_i x)} - d_i, i = 1, 2, 3. \quad (2)$$

Тук a_i , b_i , c_i , and l_i са константи. Нека приемем, че d_0 е кое да е реално число

$$l_i = \frac{100}{c_i + a_i \exp(-b_i x_0)}, i = 1, 2, 3. \quad (3)$$

Тогава, очевидно $f_i(x_0) = 0$.

Следователно трябва да се реши следния минимизационен (min-min) проблем

$$\begin{aligned} \min_{x_0} \{ & \min_{a_1, b_1, c_1} \left\{ \sum_{i=1}^{107} (y_i - f_1(x_i))^2 \right\} \\ & + \min_{a_2, b_2, c_2} \left\{ \sum_{i=1}^{21} (y_i - f_2(x_i))^2 \right\} \\ & + \min_{a_3, b_3, c_3} \left\{ \sum_{i=1}^{20} (y_i - f_3(x_i))^2 \right\} \} \end{aligned} \quad (4)$$

Беше използвана компютърна алгебрична система Maple (и Global Optimization Toolbox) за числено решаване на получения нелинеен минимизационен (min-min) проблем. Като алгоритъм за търсене на глобалния минимум беше използван диференциалния еволюционен метод, описан в [52] и в литературата, цитирана там.

За всички SARA методи с изключение на тънкослойната хроматография средното абсолютно отклонение на предсказаното чрез уравнение 1 от измереното съдържание на ароматни структури в гудроните възлиза на 3.6%. Средното абсолютно отклонение за метода на тънкослойната хроматография е пренебрежимо по-високо от това на останалите методи и възлиза на 4.0%. В резултат на този анализ на данните може да се направи извода, че при отклонение на измереното съдържание на ароматни структури от предсказаното от уравнение 1 се препоръчва да се повтори SARA анализа на гудрона. Подобен случай е дискутиран в нашето неотдавнашно изследване [39].

Таблица 3 показва данните от корелационния анализ на зависимостите между отделните SARA фракции, относителната плътност и индекса на колоидна нестабилност за изследваните 175 проби от вакуумни остатъци на различни типове нефт. И тук, както и в предишното наше изследване върху груповия

въглеродороден състав на различни типове нефт се забелязват едни и същи закономерности. Колоидната стабилност намалява с

увеличаване съдържанието на наситени компоненти.

Таблица 3 Корелационна матрица на SARA фракциите и отн. плътност на 175 изследвани проби от вакуумни остатъци на различни типове нефт чрез методите (ASTM D 2007, ASTM D 4124, течна хроматография, високо ефективна течна хроматография и тънкослойна хроматография).

	SG	Sat	Aro	Res.	Asp.	ARO str.	%Aro in ARO str.	%Res in ARO str.	%Asp. in ARO str.	СИ
SG	1,00									
Sat	0,90	1,00								
Aro	0,20	0,29	1,00							
Res.	0,28	0,44	0,57	1,00						
Asp.	0,78	0,57	0,11	0,06	1,00					
ARO str.	0,90	1,00	0,29	0,44	0,56	1,00				
%Aro in ARO str.	0,44	0,45	0,72	0,86	-0,48	-0,45	1,00			
%Res in ARO str.	0,01	0,14	0,73	0,94	-0,13	0,13	-0,80	1,00		
%Asp. in ARO str.	0,75	0,55	0,11	0,03	0,99	0,54	-0,47	-0,15	1,00	
СИ	0,58	0,83	0,41	0,47	-0,08	-0,83	0,24	-0,22	-0,07	1,00

СИ = индекс на колоидна нестабилност (Colloidal instability index)

$\frac{\text{Saturates+Asphaltenes}}{\text{Aromatics+Resins}}$

*Маркираните с плътен шрифт числа се отнасят до статистически значими стойности. При $R \geq 0.75$ между отделните параметри се счита, че има статистически значима връзка. При $R \geq 0.75 \leq 0.85$ се счита, че връзката е статистически значима и слаба. При $R > 0.85 < 0.95$ връзката е средна статистически значима. При $R \geq 0.95$ връзката е силна статистически значима. (R = коефициент на корелация).

ARO str. = ароматни структури = ароматни + смоли + асфалтени; Sat = наситени; Aro = ароматни; Res = смоли; Asp = асфалтени.

%Aro in ARO str. = % ароматни компоненти в ароматните структури; %Res in ARO str. = % смоли в ароматните структури; %Asp in ARO str. = % асфалтени в ароматните структури.

Увеличаването на плътността на гудрона е свързано не само с увеличаване на съдържанието на ароматни структури, но и с увеличаване на относителния дял асфалтенови компоненти в тези структури. Abutaiya [53] е извел емпирична зависимост, позволяваща да се определи броя на ароматните ядра в полициклената ароматна структура на нефтения дериват. Тази зависимост е посочена чрез

уравнение 5 и е обозначена като ARI (Aromatic ring index).

$$ARI = f(MW, F_{RI}) = \frac{2 \left[\frac{MW}{F_{RI}} - (3.5149MW + 73.1858) \right]}{(3.5074MW - 91.972 - (3.5149MW + 73.1858))} \quad (5) \quad [53]$$

където

MW = молекулна маса на нефтения дериват, g/mol;

FRI20 = функция на индекса на рефракция

$$F_{RI,20} = \frac{n_{D20}^2 - 1}{n_{D20}^2 + 2} \quad (6)$$

[53]

където, n_{D20} = индекса на рефракция при 20°C

Таблица 4 представя данни за молекулната маса, относителната плътност, индекса на рефракция и броя на ароматните пръстени (ARI) във SARA фракциите, съдържащи ароматен въглерод (ароматни структури) на пет от изследваните 175 гудронови фракции. Тези данни показват, че средният брой на ароматните ядра в средната въглеродородна структура на ароматните компоненти е около 5. Броят на ароматните ядра в средната въглеродородна структура на смолните компоненти е около 8, а в асфалтените е около 16.

Проведеното от нас изследване показва, че с увеличаване на плътността на гудроните от различните типове нефт нараства съдържанието на ароматни структури и броят на аро-

матните ядра в тези структури, тъй като се увеличава относителния дял на смолно асфалтовите компоненти, които имат по-голям

брой на ароматните ядра в техните средни въглеводородни структури.

Таблица 4 Данни за молекулната маса, относителната плътност, индекса на рефракция и броя на ароматните пръстени (ARI) във SARA фракциите, съдържащи ароматен въглерод (ароматни структури)

Вакуумен остатък	Гудрон		Ароматни				Смоли				Асфалтени			
Получен от нефт	d ₄ ²⁰	MW	d ₄ ²⁰	MW	n _{D20}	ARI	d ₄ ²⁰	MW	n _{D20}	ARI	d ₄ ²⁰	MW	n _{D20}	ARI
Resid E	0,9823	766	1,014	718	1,5905	5,5	1,056	1000	1,6232	8,7	1,118	1500	1,672	15,2
Daqing	0,9396	1120	0,963	1080	1,5509	5,6	1,028	1200	1,6011	9,1				
Columbian VR9	0,9849	708	0,9894	640	1,5713	4,4	1,055	798	1,6224	7,2	1,096	1718	1,654	16,0
Gudao	1,0185	1030	1,005	760	1,5836	5,5	1,056	1000	1,6232	8,7	1,177	2000	1,717	22,5
Columbian VR3	1,0273	663	0,9941	600	1,5750	4,3	1,015	784	1,5914	6,0	1,089	1107	1,649	10,7

Заклучение

Обобщена е информацията за въглеводородния състав на вакуумни остатъци, получени от свръх леки, леки, средни, тежки и свръх тежки типове нефт, нефтени пясъци и природни битуми. Както и при SARA анализа на нефа, така и при вакуумните остатъци се използват същите пет метода за анализ ASTM D 2007, ASTM D 4124, течна хроматография, високо ефективна течна хроматография и тънкослойна хроматография. Съдържанието на ароматни структури във вакуумните остатъци статистически значимо корелира с плътността на гудрона. Тази зависимост може да се моделира чрез използване на нелинейния метод на най-малките квадрати и да се използва като критерий за коректността на извършения SARA анализ. Средното абсолютно отклонение на предсказването на съдържанието на ароматни структури от плътността е 3.6%, което е 2 пъти по-малко от това на предсказването на съдържанието на ароматни структури в нефта. Тази разлика може да се обясни с факта, че използваните методи за SARA анализ са разработени за тежки нефтени масла, кипящи над 300°C и затова дават по-коректни резултати, когато се анализират високо кипящи нефтени фракции.

Чрез използване на зависимостта, изведена в дисертацията на Abutaiya [53] са изчислени броя на ароматните пръстени в средната въглеводородна структура на ароматните, смолните и асфалтенови фракции от различни гудрони. Установено е, че броят на пръстените в ароматните фракции е около 5, в смолите около 8 и в асфалтените около 16. Този брой на ароматни пръстени може да варира в зависимост от произхода на суровия петрол, от който е получен вакуумния остатък.

Литература

1. Odey F., Lacey M.: IMO 2020 – Short-term implications for the oil market. August 2018, <https://www.schroders.com/getfundeddocument/?oid=1.9.3060731>.
2. Joshi, J. B., A. B. Pandit, K. L. Kataria, R. P. Kulkarni, A. N. Sawarkar, D. Tandon, Y. Ram, M. M. Kumar. Petroleum Residue Upgradation via Visbreaking: A Review. Ind. Eng. Chem. Res., 47 (2008) 8960-8988.
3. Sawarkar, A. N., A. B. Pandit, S. D. Samant, J. B. Joshi. Petroleum Residue Upgrading Via Delayed Coking: A Review. Can. J. Chem. Eng., 85 (2007) 1-24.
4. Rana, M. S., V. Samano, J. Ancheyta, J. A. I. Diaz. A review of recent advances on process technologies for upgrading of heavy oils and residua. Fuel, 86 (2007) 1216-1231.
5. Ravindra Prajapati a,*, Kirtika Kohli b, Samir K. Maity, Slurry phase hydrocracking of heavy oil and residue to produce lighter fuels: An experimental review, Fuel, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119686>.
6. D. S. Stratiev, R. K. Dinkov, I. K. Shishkova, A. Nedelchev, T. Tsaneva, E. Nikolaychuk, I. Sharafutdinov, N. Rudnev, S. Nenov, M. Mitkova, M. Skumov, D. Yordanov, "Investigation on feasibility to simulate distribution of boiling point and molecular weight of heavy oils", Petroleum Science and Technology, 33:527–541, 2015, DOI: 10.1080/10916466.2014.999945
7. Redelius, P., Soenen, H. Relation between bitumen chemistry and performance. Fuel. 140 (2015) 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.09.044>.
8. Fuhr, B. J., Hawrelecho, C., Holloway, L. R., Huang, H. Comparison of Bitumen

Fractionation Methods, *Energy & Fuels* 2005, 19, 1327-1329.

9. Adan-Yovani León Martha-Josefina Parra, Determination of molecular weight of vacuum residue and their SARA fractions, *CT&F - Ciencia, Tecnología y Futuro* - Vol. 4 Num. 2 Dec. 2010

10. N.P. Freitag, D.R. Exelby, A SARA-Based Model for Simulating the Pyrolysis Reactions That Occur in High-Temperature EOR Processes, *Petroleum Society's Canadian International Petroleum Conference* 2002, Calgary, Alberta, Canada, June 11 – 13, 2002.

11. Guillermo Félix, Jorge Ancheyta, Comparison of hydrocracking kinetic models based on SARA fractions obtained in slurry-phase reactor, *Fuel* 241 (2019) 495–505, <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.11.153>

12. G. Alonso-Ramirez, R. Cuevas-Garcia, F. Sanchez-Minero, J. Ramirez, M. Moreno-Montiel, J. Ancheyta, R. Carbajal-Vielman, Catalytic hydrocracking of a Mexican heavy oil on a MoS₂/Al₂O₃ catalyst: I. Study of the transformation of isolated saturates fraction obtained from SARA analysis, *Catal. Tod*, 2020, **353**, 15, 153-162, <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2019.07.031>.

13. E. Alvarez, G. Marroquín, F. Trejo, G. Centeno, J. Ancheyta, J.A.I. Díaz, Pyrolysis kinetics of atmospheric residue and its SARA fractions, *Fuel* 90 (2011) 3602–3607.

14. Mustafa Versan Kok, Kiymet Gizem Gul, Thermal characteristics and kinetics of crude oils and SARA fractions, *Thermochimica Acta* 569 (2013) 66– 70.

15. B. Verkoczy, Factors Affecting Coking in Heavy Oil Cores, *Oils and SARA Fractions Under Thermal Stress*, *J Can Pet Technol* 32 (07): 25–33. Paper Number: PETSOC-93-07-02, <https://doi.org/10.2118/93-07-02>.

16. Elena Alvarez a, Gustavo Marroquin b, Fernando Trejo a,†, Guillermo Centeno b, Jorge Ancheyta b, Jose A.I. Diaz, Pyrolysis kinetics of atmospheric residue and its SARA fractions, *Fuel* 90 (2011) 3602–3607.

17. P. Danial-Fortain, T. Gauthier, I. Merdrignac, J. Verstraete, H. Budzinski, Reactivity of Athabasca Residue and of Its SARA Fractions during Residue Hydroconversion, 5th NCUT, Upgrading and Refining Conference, September 14-16, 2009, Edmonton, Alberta, Canada.

18. Yunju Cho,† Young Hwan Kim,‡,^ and Sunghwan Kim, Planar Limit-Assisted Structural Interpretation of

Saturates/Aromatics/Resins/Asphaltenes

Fractionated Crude Oil Compounds Observed by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 2011, 83, 6068–6073

19. Geoffrey C. Klein,† Annelie Angstrom,‡ Ryan P. Rodgers,† and Alan G. Marshall, Use of Saturates/Aromatics/Resins/Asphaltenes (SARA) Fractionation To Determine Matrix Effects in Crude Oil Analysis by Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron, *Energy & Fuels* 2006, 20, 668-672.

20. Liu, P.; Shi, Q.; Chung, K. H.; Zhang, Y. H.; Pan, N.; Zhao, S. Q.; Xu, C. M. Molecular characterization of sulfur compounds in venezuela crude oil and its SARA fractions by electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Energy Fuels* 2010, 24, 5089–5096.

21. Zhao, S.; Xu, Z.; Xu, C.; Chung, K.H. Feedstock Characteristic Index and Critical Properties of Heavy Crudes and Petroleum Residua; *J. Pet. Sci. Eng.* 2004, 41, 233– 242.

22. Stratiev, D.; Petkov, K. Residue Upgrading – Challenges and Perspectives; *Hydrocarb Process* 2009, Sept., 93-97.

23. Singh, J.; Kumar, M. M.; Saxena, A. K.; Kumar, S. Studies on Thermal Cracking Behavior of Residual Feedstocks in a Batch Reactor; *Chem. Eng. Sci.* 2004, 59, 4505 – 4515.

24. Schabron, J. F.; Gardner, G. W.; Hart, J. K.; Niss, N. D. The Characterization of Petroleum Residua; Western Research Institute, August 1993.

25. León, A.Y.; Parra, M.; Grosso, J.L. Estimation of Critical Properties of Typically Colombian Vacuum Residue SARA Fractions; *CT&F - Ciencia, Tecnología y Futuro* 2008, 3, 129-142.

26. Akbarzadeh, K.; Alboudwarej, H. A Generalized Regular Solution Model for Asphaltene Precipitation from n-Alkane Diluted Heavy Oils and Bitumens; *Fluid Phase Equilib.* 2005, 232, 159–170.

27. Marques, J.; Maget, S.; Verstraete, J. J. Improvement of Ebullated Bed Effluent Stability at High Conversion Operation; *Energy Fuels* 2011, 25, 3867–3874.

28. Xu, C.; Gao, J.; Zhao, S.; Lin, S. Correlation Between Feedstock SARA Components and FCC Product Yields; *Fuel* 2005, 84, 669–674.

29. Liu, C.; Zhou, J.; Clue, G.; Liang, W.; Zhu, Y. Hydrocracking of Gudao Residue with

- Dispersed-Phase Mo Catalyst; *Fuel* 1994, 73, 9, 1544-1550.
30. Rezaei, H.; Liu, X.; Ardakani, Sh. J.; Smith, K. J.; Bricker, M. A study of Cold Lake Vacuum Residue Hydroconversion in Batch and Semi-Batch Reactors Using Unsupported MoS₂ Catalysts; *Catal. Today* 2010, 150, 244-254.
 31. Parviz, M. R.; Gentzis, Th. The Chemistry of Bitumen and Heavy Oil Processing; Chapter 19, *Practical Advances in Petroleum Processing*, Springer, 2006, 597-634.
 32. Wang, H.; Wang, G.; Shen, B.; Xu, Ch.; Gao, J. Upgrading Residue by Carbon Rejection in a Fluidized-Bed Reactor and Its Multiple Lump Kinetic Model; *Ind. Eng. Chem. Res.* 2011, 50, 12501-12511.
 33. Chen, K.; Wang, Z.; Liu, H.; Guo, A. Study on Thermal Performance of Heavy Oils by Using Differential Scanning Calorimetry; *Fuel Process Technol* 2012, 99, 82-89.
 34. Hong, E.; Watkinson, P. A Study of Asphaltene Solubility and Precipitation; *Fuel* 2004, 83, 1881-1887.
 35. Yang, C.; Du, F.; Zheng, H.; Chung, K.H. Hydroconversion Characteristics and Kinetics of Residue Narrow Fractions; *Fuel* 2005, 84, 675-684.
 36. Guo, A.; Zhang, X.; Zhang, H.; Wang, Zh.; Wang, Z. Aromatization of Naphthenic Ring Structures and Relationships between Feed Composition and Coke Formation during Heavy Oil Carbonization; *Energy Fuels* 2010, 24, 525-532.
 37. Hinkle, A.; Shin, E.-J.; Liberatore, M. W.; Herring, A. M.; Batzlea, M. Correlating the Chemical and Physical Properties of a Set of Heavy Oils from Around the World; *Fuel* 2008, 87, 3065-3070.
 38. D. Stratiev, S. Nenov, I. Shishkova, B. Georgiev, G. Argirov, R. Dinkov et al.; Commercial Investigation of the Ebullated-Bed Vacuum Residue Hydrocracking in the Conversion Range of 55-93%, *ACS Omega*, 51 (5), 33290 (2020).
 39. D. Stratiev, I. Shishkova, I. Kolev, D. Yordanov, V. Toteva, Petroleum crude slate effect on H-Oil performance, *Int. J. Oil Gas, Coal Technol.*, article in press, 2021.
 40. M. V. Peralta-Martínez, M. E. García-Trujillo, E. M. Palacios-Lozano & G. Blass-Amador (2011) The Effect of SARA Fractions on Viscosity for Five Mexican Vacuum Residues, *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 33:10, 920-924, DOI: 10.1080/15567030903289825.
 41. D. Stratiev, I. Shishkova, I. Kolev, D. Yordanov, V. Toteva, Petroleum crude slate effect on H-Oil performance, *Int. J. Oil Gas, Coal Technol.*, article in press, 2020
 42. Molina, D.; Uribe, U. N.; Murgich, J. Correlations Between SARA Fractions and Physicochemical Properties with ¹H NMR Spectra of Vacuum Residues from Colombian Crude Oils; *Fuel* 2010, 89, 185-192.
 43. Mitkova, M.; Stratiev, D.; Shishkova, I.; Dobrev, D. Thermal and Thermo-Catalytic Processes for Heavy Oil Conversion; Professor Marin Drinov Publishing House of Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria, 2017.
 44. Fortain, D. Étude de la Réactivité des Résidus Pétroliers en Hydroconversion; PhD thesis, l'Université Bordeaux, 18th October 2010.
 45. Stratiev, D.; Shishkova, I.; Nikolaychuk, E.; Atanasova, V.; Atanasov, K. Investigation of Relations of Properties of Straight Run and H-Oil Unconverted Vacuum Residual Oils; *Pet Coal* 2019, 61, 4, 763-776.
 46. Stratiev, D.; Shishkova, I.; Tankov, I.; Pavlova, A. Challenges in Characterization of Residual Oils. A review; *J. Pet. Sci. Eng.* 2019, 178, 227-250.
 47. Stratiev, D.; Shishkova, I.; Nikolova, R.; Tsaneva, T.; Mitkova, M.; Yordanov, D. Investigation on Precision of Determination of SARA Analysis of Vacuum Residual Oils from Different Origin; *Pet. Coal* 2016; 58, 109-19.
 48. León, A.-Y.; Guzmán, A.; Picón, H.; Laverde, D.; Molina, D. Reactivity of Vacuum Residues by Thermogravimetric Analysis and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy; *Energy Fuels* 2020, 34, 8, 9231-9242
 49. Nikookar, M.; Omidkhah, M. R.; Pazuki, G. R. Prediction of Density and Solubility Parameter of Heavy Oils and SARA Fractions Using Cubic Equations of State; *Pet. Sci. Technol.* 2008, 26, 16, 1904-1912.
 50. Powers, D. P. Characterization and Asphaltene Precipitation Modeling of Native and Reacted Crude Oils; PhD thesis, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada, September 2014.
 51. Greaves, M.; Ayatollahi, S.; Moshfeghian, M.; Alboudwarej, H.; Yarranton, H.W. Estimation of SARA Fraction Properties With the SRK EOS; *J. Can. Pet. Technol.* 2004, 43, 9.
 52. Das, S.; Suganthan, P. N. Differential Evolution: A Survey of the State-of-the-Art; *IEEE Trans. Evol. Comput.* 2011, 15, 4-31.

53. M. Abutaiya, Advances in Thermodynamic Modeling of Nonpolar Hydrocarbons and Asphaltene Precipitation in Crude Oils, PhD Thesis, Rice University, (Houston) 2019.

Лиляна Георгиева Тодорова – Янкова
e-mail: litoian@abv.bg

Доц. д-р Добромир Иванов Йорданов

Зам. Декан на факултет по обществени науки,
Университет „Проф. д-р Асен Златаров“,
Бургас
e-mail: dobromirj@abv.bg

Ст.н.с. II ст. д-р Дичо Стоянов Стратиев
Главен технолог на „Лукойл Нефтохим
Бургас“ АД
e-mail: stratiev.dicho@neftochim.bg

Д-р инж. Ивелина Костова Шишкова
„Лукойл Нефтохим Бургас“ АД
e-mail: shishkova.ivelina.k@neftochim.bg



5-ХИДРОКСИМЕТИЛФУРФУРАЛ В ХРАНИТЕ. ПОТЕНЦИАЛНИ ВРЕДИ ЗА ЧОВЕШКИЯ ОРГАНИЗЪМ И СТРАТЕГИИ ЗА НАМАЛЯВАНЕ НА КОЛИЧЕСТВАТА МУ В ХРАНИТЕ

Иван Георгиев Иванов

5-HYDROXYMETHYLFURFURAL IN FOODS. POTENTIAL DAMAGE TO THE HUMAN BODY AND STRATEGIES FOR REDUCING ITS QUANTITIES IN FOOD

Ivan Georgiev Ivanov

ABSTRACT: Новоформираните замърсители са съединения, които се образуват по време на процесите на нагряване или при съхранение на храните. Те могат да проявяват възможни вредни ефекти върху човешкото здраве. 5-Хидроксиметилфурфурал (ХМФ) привличат вниманието на научната общност през последните години. ХМФ се счита за потенциално канцерогенен за хората поради възможността да се метаболизира от човешкия организъм до съединения с потенциално канцерогенно действие. ХМФ се образува главно чрез реакция на Майяр при топлинната обработка на храната. ХМФ може да се превръща *in vivo* в човешкия организъм в 5 сулфоксиметилфурфурол (СМФ), който е определен като токсично съединение. Хранителният прием на ХМФ е от порядъка на mg/kg, много по-висок от този на други хранителни токсични вещества. В тази статия са разгледани налични данни в научната литература за съдържание на ХМФ с акцент върху наличните стратегии за намаляване на концентрациите в храните, метаболизма, експозицията на храната и токсичността му.

Key words: 5-Хидроксиметилфурфурал, храни

Въведение

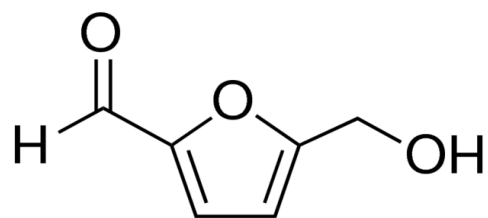
Термичните процеси често се използват в производството на храни за получаване на безопасни продукти с удължен срок на годност и имат силно въздействие върху крайното органолептично качество на храните. Печенето, препичането, пърженето, стерилизацията водят до желани и нежелани ефекти, дължащи се на различни химични реакции, като реакция на Майяр, карамелизация и липидно окисление. Една от целите на термичната обработка на храната е да се подобрят сензорните ѝ характеристики, също така вкусовите качества, както и да се разшири гамата от цветове, вкусове, аромати и текстури в храните. Нагряването също така разрушава ензимите и микроорганизмите и намалява водната активност на храната, като по този начин съхранява храните и повишава срока им на годност. От друга страна, е добре известно, че някои вещества, продуцирани при процесите на нагряване, могат да играят положителна роля за човешкото здраве. Много новообразувани съединения, които се откриват в термично обработени храни, показват

антиоксидантна, антимикробна и антиалергична активност (Borrelli & Fogliano, 2005; Lindermeier & Hofmann, 2004; Van Boekel et al., 2010). Някои от новополучените съединения при топлинните процеси трябва да бъдат внимателно оценени по отношение на техните вредни ефекти върху човешкото здраве. Загубата на термолабилни съединения, като витамини, както и незаменими аминокиселини (лизин, триптофан) и / или образуването на нежелани вкусове и неприятни миризми са добре установени явления, водещи до загуба на хранителна стойност и сензорно качество на нагнетите храни. Основният проблем, произтичащ от процесите на нагряване, е свързан с образуването на съединения, които естествено не присъстват в храните, но могат да се образуват по време на процесите на загряване или съхранение и да покажат вредни ефекти, като мутагенни, канцерогенни и цитотоксични активности (новоформираните замърсители). Добре известни примери за тези съединения са хетероциклически амини, нитрозамини и полициклически ароматни въглеводороди (Knize et al., 1999; Skog et al., 1998). Напоследък един от нежеланите продукти от термичната

обработка на храната, явяващ се замърсител, придоби голям интерес поради потенциално високия си токсикологичен ефект и широкото му разпространение в храните – 5-хидроксиметилфурфурал. По-специално акриламидът и ХМФ могат да се разглеждат като най-важните замърсители, пролучени при топлинната обработка на храната, които се срещат в хляба и хлебните продукти. В тази работа са прегледани последните данни за появата, стратегиите за намаляване количеството на ХМФ в храната, и потенциалните му токсични ефекти върху човека.

Синтез в храните

5-хидроксиметилфурфуралът (5- (хидроксиметил) фуран-2-карбалдехид, ХМФ) (Фигура 1) е фураново съединение, което се образува като междинно съединение в реакцията на Майяр (МР) (Ames, 1992). Това съединение се формира и от директна дехидратация на захари в киселинни условия (карамелизиране) при термичната обработка, приложена към храните (Kroh, 1994). 3-Деоксизозон е известен като ключов междинен продукт при образуването на ХМФ. Той се формира от 1,2-енолизацията и дехидратацията на глюкозата или фруктозата. По-нататъшното дехидратиране и циклизация на 3-деоксиозона дава 5-хидроксиметилфурфурал. В кисели условия ХМФ може да се образува дори при ниски температури (Lee & Nagy, 1990), въпреки че неговите концентрации драстично се увеличават при повишаване на температурите при термично обработване на храните. При сухи и пиролитични условия е предложен алтернативен път за образуване на ХМФ от фруктоза и захароза. Той включва образуването на високо реактивен фруктофуранозилов катион, който по-бързо може да бъде директно превърнат в ХМФ (Perez-Locas & Yauayan, 2008). Освен температурата скоростта на образуване на ХМФ в храните зависи от вида на захарта (Lee & Nagy, 1990), от рН (Gökmen et al., 2007), от водната активност (Gökmen et al., 2008; Kroh, 1994) и концентрацията на двувалентни катиони в храните (Gökmen & Senyuva, 2006).



Фигура 1. 5-Хидроксиметилфурфурал - структура

Появата и хранителния прием

Количеството ХМФ, което може да се открие в храните, е пряко свързано с продължителността и вида на топлинната обработка, прилагана върху храните, богати на въглехидрати. Друг източник на ХМФ е добавянето на ingredienti, използвани в състава на храните, като карамелови разтвори или пчелен мед. Концентрациите на ХМФ в храните могат да варират до голяма степен и понякога да надвишат 1 g/kg в някои сушени плодове и карамелизирани продукти (Akkan et al., 2001; Ibarz et al., 2000; Rada-Mendoza et al., 2004). ХМФ се открива и в хлебни изделия, малц, плодови сокове, кафе и балсамов оцет. Обобщено концентрациите на ХМФ в храните е представено в Таблица 1. Като цяло, ХМФ може да се използва като маркер за качество на широк спектър от преработени плодове (Rada-Mendoza et al., 2004; Rada-Mendoza et al., 2002), кафе (Dauberte et al., 1990) мед (Fallico et al., 2004; Tosi et al., 2002) и мляко (Morales & Jiménez-Pérez, 2001). Количеството на ХМФ се явява качествен показател за мониторинг на процесите на нагряване, прилагани при зърнени продукти, като например сушене на паста (Resmini et al., 1993), печене на хляб (Ramírez-Jiménez et al., 2000a; Ramírez-Jiménez, 2000b), както и екструзия на бешки и зърнени храни (Ramírez-Jiménez et al., 2003) и производство на зърнени закуски (García-Villanova et al., 1993).

Таблица 1. Концентрации на ХМФ в храните

Хранителен продукт	ХМФ, mg/kg
Кафе	100–1900
Инстантно кафе	400-4100
Базкофеиново кафе	430-494
Заместител на кафето	200-22500

произведено от цикория

Малц	100-6300
Мед	10-59
Бира	3-9
Сладка	6-38
Плодови сокове	2-22
Червено вино	1-2
Бисквити	0.5-74
Бял хляб	3-68
Бляб тип тост	11-87
Снаксове	2-10
Зърнени закуски	7-240
Храна за бебета базирана на млечни продукти	0.2-0.3
Храна за бебета базирана на зърнени култури	0-57
Сушени плодове	25-2900
Винен оцет	0-22
Оцет балсамико	316-35251

Въпреки че концентрациите в някои хранителни продукти, като сушени плодове, карамел и балсамов оцет са изключително високи, хлябът и кафето са най-важните хранителни продукти, които допринасят за ежедневния хранителен прием на ХМФ (Murkovic & Pichler, 2006). По-ранните оценки за ежедневния прием на ХМФ варират от 30 до 150 mg на човек (Janzowski et al., 2000; Ulbricht et al., 1984). В едно неотдавнашно проучване на Rufian-Henares and de la Cueva (2008) оценяват дневния прием на храна за ХМФ в испанското население. Авторите съобщават за среден дневен хранителен прием е от 2 mg, до 23 mg. Тези резултати съответстват на тези, докладвани от други автори, но са далеч под оценките от Ulbricht et al. (1984). Неотдавна в едно проучване на 53 норвежки доброволци Husøy et al. (2008) оценяват хранителния прием на ХМФ. Авторите съобщават, че средният дневен прием за ХМФ е 5,6 mg / човек, а количеството в урината на 5-хидроксиметилфурфуронова киселина, основният метаболит на ХМФ при хора,

е съответно 12,4 mg / човек, което предполага алтернативен източник на ХМФ освен храната. Фармацевтичните препарати и цигареният дим трябва да се разглеждат също като допълнителни източници на ХМФ (Crump & Gardner, 1989). Все пак данните за количеството на хранителния прием на ХМФ са много ограничени. Следователно са необходими допълнителни проучвания за оценка на средния и максималния прием на различни популации и сегменти от населението. За точна оценка на хранителния прием са необходими данни за концентрациите на ХМФ в храните, когато те се консумират. Както е отбелязано за други хранителни токсични вещества, условията за съхранение и готвене в домашни условия могат силно да повлияят действителното излагане на ХМФ.

Стратегии за намаляване на концентрациите на ХМФ в храните

Досега не съществуват конкретни стратегии, насочени към намаляване на съдържанието на ХМФ в храните. Целта е предизвикателна поради естеството на неговите прекурсори и пътищата за формирането му. ХМФ се образува чрез реакция на Майяр и карамелизиране, които допринасят най-вече за желания цвят, вкус и аромат на топлинно обработена храна от потребителите. За съжаление, образуването на ХМФ следва същите пътища, водещи до кафяви и ароматични съединения. Например многократно се съобщава за висока корелация между съдържанието на ХМФ и развитието на потъмняване (Caruano et al., 2008, 2009), така че моделирането на профила на температурата чрез намаляване на времето за нагряване и / или температурата вероятно ще намали концентрациите на ХМФ и в същото време ще доведе до намаляване на потъмняването, което от своя страна потенциално може да компрометира качеството и приемливостта на крайните продукти от потребителите. Същото се случва, когато се прилагат стратегии за намаляване на концентрациите, основаващи се на промени в рецептите, например чрез заместване на редуциращите захари с нередуциращи захари или полиоли. Също така се съобщава, че замяната на глюкоза или фруктоза със захароза (нередуцираща захар) в бисквити води до по-високи концентрации на ХМФ, когато се пече при температура над 250 °C (Ait-Ameur et al., 2007). Предполага се, че високоактивен фрук-

тофуранозилов катион се образува от захароза при висока температура, което води до формиране на ХМФ много бързо (Perez-Locas & Yauayan, 2008). Изследванията за образуването на НМФ са много ограничени и се основават главно на емпирични модели, описващи образуването на ХМФ (Ait-Ameur et al., 2007; Caruano et al., 2008). Докладвано е и влиянието на рН на тестото върху образуването на ХМФ. Като цяло повишаването на рН на тестото води до понижено количество на ХМФ в хлебните продукти (Gökmen et al., 2007). Всъщност ниското рН, както и наличието на киселинен катализатор, спомагат за топлинно индуцирано разлагане на фуранови производни (Lee & Nagy, 1990).

Здравословни рискове от наличието на ХМФ в храните

Доказано е, че ХМФ при високи концентрации е цитотоксичен, дразнещ очите, горните дихателни пътища, кожата и лигавиците. Ulbricht et al. (1984) изчисляват орален LD50 от 3,1 g / kg телесно тегло при плъхове. В друг експеримент при плъхове, US EPA (1992) оценяват остра орална LD50 от 2.5 g / kg и между 2.5 и 5.0 g / kg съответно за мъже и жени. Канцерогенната активност на ХМФ е проучвана в изследвания върху гризачи. Показано е, че ХМФ индуцира и промотира аберацни промени и формиране на пренеопластични лезии в дебелото черво на плъх (Archer et al., 1992; Bruce et al., 1993). Surh et al. (1994) описват индуцирането на кожни папиломи след локално приложение на 10-25 mmol ХМФ на мишки. Обратно, Miyakawa et al. (1991) не съобщават за значително увеличение на скоростта на туморите на кожата след третиране с ХМФ. Наскоро проведено проучване съобщава, че ХМФ е слаб канцероген при мишки, като значително увеличава броя на аденомите в тънките черва (Svendsen et al., 2009). Освен това в 2-годишно проучване със сонда, проведено от Националната програма по токсикология, е установено, че ХМФ увеличава честотата на хепатоцелуларните аденоми при женски B6C3F1 мишки, на които са приложени 188 - 375 mg / kg ХМФ (NTP, 2008). Мутагенният и генотоксичният потенциал на ХМФ е тестван *in vitro* в бактериални тест системи, както със, така и без метаболитна активация. Като цяло резултатите от тези проучвания показват нисък или никакъв мутагенен ефект на ХМФ. За разлика от

това, за ХМФ е установено, че е мутагенен за *S. typhimurium* TA104, когато съединението е тествано в присъствието на чернодробна сулфотрансфераза при плъх (SULT) и също така е показано, че ХМФ е мутагенен в щам *S. typhimurium* TA100, експресиращ човешки SULT1A1 протеин (Sommer et al., 2003), както и в клетки-мишени на бозайници, проектирани за експресия на човешки SULT1A1 протеин (Glatt & Sommer, 2006). НМФ се превръща *in vitro* и *in vivo* от SULTs в сулфоксиметил-фурфурал (СМФ) – съединение, за което се съобщава, че е мутагенно в конвенционален тест на Ames и инициира тумори в кожата на мишки (Surh & Tannenbaum, 1994). СМФ, за разлика от ХМФ, образува ДНК адукти в безклетъчни системи и е мутагенен за бактериални клетки и клетки на бозайници (Glatt & Sommer, 2006; Surh & Tannenbaum, 1994). В едно проучване е установено, че СМФ е силно нефротоксичен при мишки *in vivo* (Bakhiya et al., 2009). Хистопатологичните анализи показват, че СМФ предизвиква умерено увреждане на черния дроб и силни увреждания в бъбреците, особено в проксималните тубули.

Въз основа на данните, докладвани в литературата, не е ясно дали експозицията на човека на ХМФ представлява потенциален риск за здравето. Janzowski et al. (2000) заключават, че ХМФ не представлява сериозен риск за здравето, въпреки че най-високите концентрации в специфични храни се доближават до биологично ефективния диапазон на концентрация в клетъчните системи. Научната група по хранителни добавки, ароматизанти, помощни материали за обработка и материали, които са в контакт с храни, изчисли хранителния прием на ХМФ от 1,6 mg / човек дневно (EFSA, 2005). Тази оценка е далеч над прага на загриженост от 540 mg / човек / ден, получен от голяма база данни, съдържаща информация за субхронични и хронични проучвания върху животни (JECFA, 1996). Наличните понастоящем оценки на хранителния прием са далеч под тази стойност. Основният проблем за съдържанието на ХМФ е свързана с превръщането му в СМФ. В становището си относно производните на фурана EFSA заключи, че въз основа на мутагенност на СМФ има достатъчно до-

казателства, които да предизвикват загриженост относно генотоксичния му потенциал. Съответно процедурата за оценка на последствията от приема на ХМФ върху човешкото здраве не е била приложена в очакване на нови данни за генотоксичността (EFSA, 2005). Monien et al. (2009) откриват СМФ в кръвта на FVB / N мишки след интравенозно приложение на ХМФ. Това е първият път, когато СМФ е бил открит в експерименти за биотрансформация, проведени върху ХМФ при хора и животни *in vivo*. Човешките SULTs са по-активни от тези, изразени от гризачи (Glatt & Sommer, 2006). Освен това, хората експресират SULTs в екстрахепаталните тъкани повече от гризачите и следователно могат да бъдат по-чувствителни към ХМФ (Glatt et al., 2005; Teubner et al., 2007). Това предполага, че рискът, свързан с експозицията на ХМФ от храна, може да бъде по-висок за хората от този, посочен от експерименти при гризачи. Всъщност, тъй като приемът на ХМФ е много висок, дори и ограниченото преобразуване би изложило хората на достатъчно количество СМФ, което може да има отрицателно въздействие върху здравето им.

Пропуски и бъдещи нужди. Оценка на риска

ХМФ е широко разпространен топлинно индуциран новоформиран замърсител, чийто хранителен прием е с няколко порядъка по-висок от този, докладван за други хранителни токсични вещества, като акриламид или фуран. В светлината на констатациите за ХМФ потенциалът за генотоксичност, значението на понижаването на съдържанието на ХМФ в загритите храни и от своя страна хранителната експозиция трябва внимателно да се преоценят.

Оценката на риска за ХМФ трябва да бъде подобрена. Степента на биотрансформация на ХМФ към СМФ трябва да бъде допълнително проучена. Необходими са и допълнителни проучвания за канцерогенност и генотоксични механизми

на СМФ. Освен това, няма епидемиологични данни за връзката между хранителната експозиция на ХМФ и повишения риск от рак.

Данните за хранителната експозиция са много ограничени. Следователно са необходими допълнителни проучвания за оценка на средния и максималния прием на различни популации и сегменти от населението. Трябва да се изгради широка база данни за появата на ХМФ в различните храни, която да помогне за идентифициране на храни, които допринасят най-вече за експозицията на храни и да насочват бъдещите изследвания на потенциалните и подходящи стратегии за смекчаване, които да се прилагат към храните.

Заклучение

Досега не съществуват конкретни стратегии за смекчаване, насочени към намаляване на съдържанието на ХМФ в храните. Целта е предизвикателна поради естеството на неговите прекурсори и пътища на образуване: преместването на реакционните пътища на Майяр от генерирането на ХМФ в същото време, като се запази качеството на храните, е много трудно постижимо, отколкото други хранителни токсични вещества като акриламид.

Литература

1. Ait-Ameur, L., Mathieu, O., Lalanne, V., Trystram, G., & Birlouez-Aragon, I. (2007). Comparison of the effects of sucrose and hexose on furfural formation and browning in cookies baked at different temperatures. *Food Chemistry*, 101, 1424-1433.
2. Akkan, A. A., Özdemir, Y., & Ekiz, H. L. (2001). Derivative spectrophotometric determination of 5(hydroxymethyl)-2-furaldehyde HMF and furfural in Locust an extract. *Nahrung/Food*, 45(1), 43-46.
3. Ames, J. M. (1992). The Maillard reaction. In B. J. F. Hudson (Ed.), *Biochemistry of food proteins* (pp. 99-153). London: Elsevier.
4. Archer, M. C., Bruce, W. R., Chan, C. C., Corpet, D. E., Medline, A., Roncucci, L., et al. (1992). Aberrant crypt foci and microadenoma as markers for colon cancer. *Environmental Health Perspectives*, 98, 195-197.

5. Borrelli, R. C., & Fogliano, V. (2005). Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49, 673-678.
6. Capuano, E., Ferrigno, A., Acampa, I., Ait-Ameur, L., & Fogliano, V. (2008). Characterization of Maillard reaction in bread crisps. *European Food Research and Technology*, 228, 311-319.
7. Capuano, E., Ferrigno, A., Acampa, I., Serpen, A., Açar, Ö.Ç., Gökmen, V., et al. (2009). Effect of flour type on Maillard reaction and acrylamide formation during toasting of bread crisp model systems and mitigation strategies. *Food Research International*, 42, 1295-1302.
8. Crump, D. R., & Gardner, D. (1989). Sources and concentrations of aldehydes and ketones in indoor environments in the UK. *Environment International*, 15, 455-462.
9. EFSA. (2005). Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the commission related to flavouring group evaluation 13: furfuryl and furan derivatives with and without additional side-chain substituents and heteroatoms from chemical group 14. *EFSA Journal*, 215, 1-73.
10. EFSA. (2005). Opinion of EFSA scientific committee on a request of the efsa related to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. *EFSA Journal*, 282, 1-30.
11. Fallico, B., Zappalà, M., Arena, E., & Verzera, A. (2004). Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chemistry*, 85(2), 305-313.
12. García-Villanova, B., Guerra-Hernández, E., Martínez Gómez, E., & Montilla, J. (1993). Liquid chromatography for the determination of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde in breakfast cereals. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 41, 1254-1255.
13. Glatt, H., Scheneider, H., & Yungang, L. (2005). V79-h-CYP2E1SULT1A1, a cell line for the sensitive detection of genotoxic effects induced by carbohydrate pyrolysis products and other food-borne chemicals. *Mutation Research*, 580, 41-52.
14. Glatt, H. R., & Sommer, Y. (2006). Health risks by 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and related compounds. In K. Skog, & J. Alexander (Eds.), *Acrylamide and other health hazardous compounds in heat-treated foods* (pp. 328-357). Cambridge: Woodhead Publishing.
15. Gökmen, V., Açar, Ö. C., Köksel, H., & Açar, J. (2007). Effects of dough formula and baking conditions on acrylamide and hydroxymethylfurfural formation in cookies. *Food Chemistry*, 104, 1136-1142.
16. Gökmen, V., Açar, Ö. C., Serpen, A., & Morales, F. J. (2008). Effect of leavening agents and sugars on the formation of hydroxymethylfurfural in cookies during baking. *European Food Research and Technology*, 226, 1031-1037.
17. Husøy, T., Haugen, M., Murkovic, M., Jöbstl, D., Stølen, L. H., Bjellaas, T., et al. (2008). Dietary exposure to 5-hydroxymethylfurfural from Norwegian food and correlations with urine metabolites of short-term exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3697-3702.
18. Ibarz, A., Pagán, J., & Garza, S. (2000). Kinetic models of nonenzymatic browning in apple puree. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(8), 1162-1168.
19. Janzowski, C., Glaab, V., Samimi, E., Schlatter, J., & Eisenbrand, G. (2000). 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 801-809.
20. JECFA. (1996). Toxicological evaluation of certain food additives. The forty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and contaminants. In WHO Food Additives Series, Vol. 35. Geneva: IFCS, WHO.
21. Knize, M. G., Salmon, C. P., Pais, P., & Felton, J. S. (1999). Food heating and the formation of heterocyclic aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbon mutagens/carcinogens. In L. S. Jackson, M. G. Knize, & J. N. Morgan (Eds.), *Impact of processing on food safety* (pp. 179-193). New York: Springer.
22. Kroh, L. W. (1994). Caramelisation in food and beverages. *Food Chemistry*, 51, 373-379.
23. Lee, H. S., & Nagy, S. (1990). Relative reactivities of sugars in the formation of 5-hydroxymethyl furfural in sugar-catalyst model systems. *Journal of Food Processing and Preservation*, 14, 171-178.
24. Lindermeier, M., & Hofmann, T. (2004). Influence of baking conditions and precursor supplementation on the amounts of the antioxidant pronyl-l-lysine in bakery products. *J Agric Food Chemistry*, 52, 350-354.
25. Monien, B. H., Frank, H., Seidel, A., & Glatt, H. (2009). Conversion of the common food constituent 5-hydroxymethylfurfural into a mutagenic and carcinogenic sulfuric acid ester in the mouse in vivo. *Chemical Research in Toxicology*, 22, 1123-1128.
26. Morales, F. J., & Jiménez-Pérez, S. (2001). Hydroxymethylfurfural determination in infant milk-based formulas by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chemistry*, 72(4), 525-531.
27. Murkovic, M., & Pichler, N. (2006). Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in coffee, dried fruits and urine. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50, 842-846.
28. Perez-Locas, C., & Yaylayan, V. A. (2008). Isotope labeling studies on the formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) from sucrose by pyrolysis-GC/MS. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 6717-6723.

29. Rada-Mendoza, M., Luz Sanz, M., Olano, A., & Villamiel, M. (2004). Formation of hydroxymethylfurfural and furosine during the storage of jams and fruit-based infant foods. *Food Chemistry*, 85, 605-609.
30. Rada-Mendoza, M., Olano, A., & Villamiel, M. (2002). Determination of hydroxymethylfurfural in commercial jams and in fruit-based infant foods. *Food Chemistry*, 79, 513-516.
31. Ramírez-Jiménez, A., García-Villanova, B., & Guerra-Hernández, E. (2000a). Hydroxymethylfurfural and methylfurfural content of selected bakery products. *Food Research International*, 33(6), 833-838.
32. Ramírez-Jiménez, A., Guerra-Hernández, E., & García-Villanova, B. (2000b). Browning indicators in bread. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 4176-4181.
33. Ramírez-Jiménez, A., Guerra-Hernández, E., & García-Villanova, B. (2003). Evolution of non enzymatic browning during storage of infant rice cereal. *Food Chemistry*, 3(2), 219-225.
34. Resmini, P., Pellegrino, L., Pagani, M. A., & De Noni, I. (1993). Formation of 2-acetyl-3-D-glucopyranosylfuran (glucosylisomaltol) from nonenzymatic browning in pasta drying. *Italian Journal of Food Science*, 4, 341-353.
35. Rufian-Henares, J. A., & de la Cueva, S. P. (2008). Assessment of hydroxymethylfurfural intake in the Spanish diet. *Food Additives and Contaminants*, 25, 1306-1312.
36. Skog, K. I., Johansson, M. A. E., & Jägerstad, M. I. (1998). Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 879-896.
37. Sommer, Y., Hollnagel, H., Schneider, H., & Glatt, H. (2003). Metabolism of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) to the mutagen 5-sulfoxymethyl-2-furfural (SMF) by individual sulfotransferases. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 367, 166.
38. Surh, Y. J., Liem, A., Miller, J. A., & Tannenbaum, S. R. (1994). 5-Sulfoxymethylfurfural as a possible ultimate mutagenic and carcinogenic metabolite of the Maillard reaction product, 5-hydroxymethylfurfural. *Carcinogenesis*, 15, 2375-2377.
39. Surh, Y. J., & Tannenbaum, S. R. (1994). Activation of the Maillard reaction product 5-(hydroxymethyl)furfural to strong mutagens via allylic sulfonation and chlorination. *Chemical Research in Toxicology*, 7, 313-318.
40. Svendsen, C., Husøy, T., Glatt, H., Paulsen, J. E., & Alexander, J. (2009). 5-Hydroxymethylfurfural and 5-sulfoxymethylfurfural increase adenoma and flat ACF number in the intestine of Min/p mice. *Anticancer Research*, 29(6), 1921e-926.
41. Teubner, W., Meinel, W., Florian, S., Kretzschmar, M., & Glatt, H. (2007). Identification and localization of soluble sulfotransferases in the human gastrointestinal tract. *Biochemical Journal*, 404(2), 207-215.
42. Tosi, E., Ciappini, M., Ré, E., & Lucero, H. (2002). Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. *Food Chemistry*, 77(1), 71-74.
43. US EPA. (1992). Initial submission: Acute oral LD50 study with 5-hydroxymethylfurfural in rats. Cover letter dated 073192, EPA/OTS. Doc. #88-920005429, Chicago, Illinois, USA.
44. Ulbricht, R. J., Northup, S. J., & Thomas, J. A. (1984). A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundamental and Applied Toxicology*, 4, 843-853.
45. Van Boekel, M., Fogliano, V., Pellegrini, N., Stanton, C., Scholz, G., Lalljie, S., et al. (2010). A review on the beneficial aspects of food processing. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54, 1215-1247.

Иван Георгиев Иванов
 Университет по хранителни технологии
 Катедра „Органична химия и неорганична химия“
 Адрес: гр. Пловдив, бил. Марица 26

e-mail: ivanov_ivan.1979@yahoo.com



АКРИЛАМИД В ХРАНИТЕ. ПОТЕНЦИАЛНИ ВРЕДИ ЗА ЧОВЕШКИЯ ОРГАНИЗЪМ И СТРАТЕГИИ ЗА НАМАЛЯВАНЕ НА КОЛИЧЕСТВАТА МУ В ХРАНИТЕ

Иван Георгиев Иванов

ACRYLAMIDE IN FOOD. POTENTIAL DAMAGE TO THE HUMAN ORGANISM AND STRATEGIES FOR REDUCING ITS QUANTITIES IN FOOD

Ivan Georgiev Ivanov

ABSTRACT: Акриламидът, или 2-пропенамидът, се образува в някои храни, богати на въглехидрати по време на термичната им обработка, особено много при печене и пържене. Доказано е, че акриламидът е канцерогенен при животните и е вероятен канцероген и за човека. Образува се главно при нагряване на храните в условия на висока температура и ниска влажност от аминокиселината аспарагин в присъствието на редуциращи захари (глюкоза, фруктоза и др), като част от реакцията на Майяр. Основната цел на този обзор е да обобщи резултатите от академичните и промишлените изследвания за синтез и наличност в храни на акриламид, а също така да представи механизма на образуване и мерките за намаляване на концентрацията му в хранителните продукти.

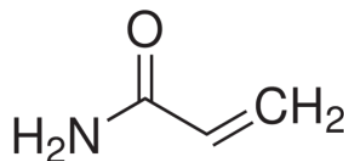
Acrylamide, or 2-propenamide, is formed in some foods rich in carbohydrates during heat treatment, especially during baking and frying. Acrylamide has been shown to be carcinogenic for animals and as well as toxic and likely carcinogenic for human. It is formed mainly by thermal heating of food in conditions of high temperature and low humidity from the amino acid asparagine in the presence of reducing sugars (glucose, fructose, etc.), as part of the Maillard's reaction. The main purpose of this review is to summarize the results of academic and industrial researches on the synthesis and availability of acrylamide in food, as well as to present the mechanism of its formation and measures to reduce acrylamide in food products.

Key words: акриламид, хранителни продукти, стратегии за намаляване концентрациите на акриламид

Въведение

Акриламидът (C_3H_5NO ; 2-пропенамидът) (Фиг. 1) е безцветно, нелетливо кристално твърдо вещество, разтворимо във вода и има молекулна маса от 71.08 kDa (Eriksson 2005). Промислено се произвежда чрез хидролизирание на акрилонитрил. Предимно се използва за производство на полиакриламидни полимери, които намират широко приложение като коагуланти в пречистването на отпадни води и избистряне на питейната вода, като фугиращи вещества за изграждане на фундаменти и тунели на язовири и като електрофорезни гелове. През 1994 г. Международната агенция за изследване на рака (IARC) класифицира акриламида като потенциален канцероген при хората (група 2A) въз основа на неговата канцерогенност при гризачи. Тази класификация е одобрена от СЗО през 2002 г. Неотдавна се установи, че единичната (мономерна) форма на акриламид присъства в храната и той е токсичен за нервната система.

Акриламидът е канцероген при гризачи и потенциален карциноген при хора, като може да причини мутации на ген или гени и да доведе до увреждане на ДНК (Friedman et al., 1995, Rosen and Hellenas 2002, Tareke et al., 2002, Rice 2005). Вероятно винаги е присъствал в готвените храни и цигарения дим. Въпреки това присъствието на акриламид в храните за първи път е докладвано от Шведската национална администрация по храните (SNFA) през 2002 г. Той се счита за важен замърсител, произлизащ от процесите на термична обработка на храната, най-вече при картофени, зърнени и хлебни изделия.



Фигура 1. Структура на акриламид

Поява и диетичен прием на акриламид с храната

В зависимост от диетата хората са изложени на различни количества акриламид. Появата на акриламид в храните се изследва интензивно след първоначалното съобщение за високите му концентрации в храните, които са подложени на високотемпературна обработка (Tareke et al., 2002). Акриламидът се открива предимно в растителни храни, особено термично обработените нишесте съдържащи храни, като картофени, зърнени и хлебни продукти (Svensson et al., 2003, Borda and Alexe, 2011, Riboldi et al., 2014). Акриламид не се намира в храни, които са приготвени чрез варене или микровълнова обработка, а в храни, които са приготвени чрез пържене или печене (Eriksson, 2005; Törnqvist, 2005). Открива се в много ниски концентрации в хранителни продукти от животински произход, като месото и рибата. Към днешна дата в световен мащаб няма установени ограничения за консумация на акриламид в диетата. Проучванията показват, че количеството на акриламида е изключително високо в продуктите от пържени картофи (като пържени картофи и картофен чипс), последвани от зърнени храни, хрупкави хлябове, бисквити и други хлебни изделия (Таблица 1). Концентрацията на акриламида в храната зависи от методите на приготвяне (Konings et al., 2003, Dybing and Sanner 2003, Capuano and Fogliano, 2011). Факторите, които оказват съществено влияние върху концентрацията са високата температура (повече от 120 °C), големите количества въглехидрати, количеството на свободния аспарагин, количеството на редуциращите захари, рН, водното съдържание, амониевият бикарбонат и високата концентрация на конкурентни аминокиселини (Matthäus et al., 2004, Taubert et al., 2004, Deryck 2007, Medeiros et al., 2012). Приемането на акриламид може да повиши риска от рак на бъбреците и гърдата (Olesen et al., 2008, Hogervorst et al., 2008). Дневният прием на акриламид в диетата при хората се оценява на 0,3 до 0,8 µg на kg телесно тегло (World Health Organization (WHO), 2002). При нормални условия средният общ дневен прием на акриламид е около 0,85 µg на kg телесно тегло (Schettgen et al., 2002). Общият макро- и микрохранителен състав на храната се получава главно от храни, съдържащи акриламид (Wilson et al., 2006). Храните, които доприна-

сят най-много за приемането на акриламид с храната, се различават в различните страни (Medeiros et al., 2012). Храните с високо съдържание на акриламид допринасят за приема на 38% от дневните калории, 36% от фибрите и повече от 25% от микроелементите (Petersen and Tran, 2005). Като цяло по-тъмен е цветът на хранителния продукт, в който съдържанието на акриламид е по-високо. Образоването на акриламид се увеличава драстично към края на процеса на пържене и печене (Xu et al., 2014). Количествата на акриламида в различните храни и хранителни групи са обобщени в Таблица 1.

Таблица 1 Количества акриламид, открити в хранителни продукти.

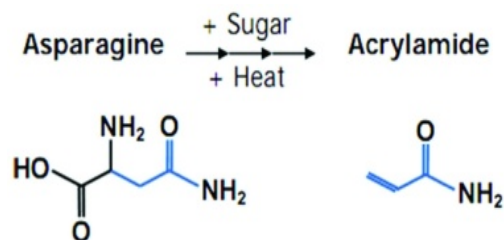
Хранителен продукт	Съдържание на акриламид, µg/kg
Хлебни изделия и бисквити	18-3324
Хляб	10-3200
Зърнени закуски	10-1649
Шоколадови продукти	2-826
Заместители на кафе	80-5399
Млечни продукти	10-130
Пържени картофи / чипс	59-5200
Месото	10-116
Печено кафе	45-9359

Образуване на акриламида в храните. Механизми на формиране

Акриламид не е вещество, което се добавя към храната, а се образува в храната по време на топлинната ѝ обработка. Изследванията показват, че загаряването на храната може да бъде важен източник на образуване на акриламид. Акриламидът се образува в голямо количество при храни, богати на въглехидрати (редуциращи захари), приготвени при температура над 120 °C при пържене и печене (Becalski et al., 2003, David et al., 2012).

Основният път, водещ до образуване на акриламид в храните, е част от реакцията на Майяр - от свободни аминокиселини (аспарагин) и редуциращи захари (главно глюкоза и фруктоза) (Stadler et al., 2002, Friedman, 2003, Yaylayan and Stadler, 2005) (Фиг 2.). Реакцията на Майяр е неензимна реакция на покафеничване, която се появява в храните по време на печене или пържене. Аспарагинът е свободната аминокиселина, съдържаща се в картофите в концентрации от около 93,6 mg на 100 g (Martin and Ames, 2001). Потенциалът за образуването на акриламид е силно зависим не само от концентрациите на аспарагин,

но и от количеството на редуциращите захари, като глюкоза и фруктоза (Pedreschi et al., 2006). Концентрацията на свободен аспарагин е основният определящ фактор за образуването на акриламид в хранителни продукти, произведени от ръжено и пшенично брашно (Hamlet et al., 2008, Curtis et al., 2010). Изследванията показват, че количествата на редуциращите захари са основните ограничаващи фактори за продукцията на акриламид в картофените изделия (De Wilde et al., 2004, Sanny et al., 2012).



Фигура 2. Образуване на акриламид в храните

Стратегии за намаляване на акриламида в храните

Разработени са подходящи стратегии за намаляване на акриламида в храните. Намаляването на съдържанието на акриламид в храните, приготвени в домакинствата и в промишлеността, създава предпоставки за изготвяне на безопасни храни. Налични са редица стратегии прилагането на които води до намаляване концентрациите на образувания акриламид в различните етапи от производството на храни.

Влияние на суровините

Количествата на редуциращите захари оказват съществено влияние върху формирането на акриламид при картофите и зърнените култури. Наличието на редуциращи захари силно се влияе от сорта, реколтата, условията на торене и съхранение (De Wijde et al., 2005, Muttucumaru et al., 2008, Truong et al., 2013). Установено е, че количеството на редуциращите захари при картофите варира при различните сортове. Количеството на синтезирания акриламид в картофените продукти е в пряка зависимост от концентрациите на редуциращите захари в изходните суровини (Fiselier and Grob, 2005, Torres and Parreño, 2009). Следователно контролирането на редуциращи захари и аспарагин в изходните суровини може да доведе до намаляване на

акриламида в картофените и зърнените продукти (David et al., 2012). Необходимо е да се използват и селектират нови сортове картофи, които имат ниски концентрации на редуциращи захари, и да се използват като ефективен начин за намаляване на концентрацията на акриламид в хранителните продукти, произведени от тях (Lindsay and Jang, 2005, Sanny et al., 2012). Климатичните условия оказват значително въздействие върху количествата на аспарагина и редуциращите захари в картофите. Редуциращите захари в картофите не се променят значително, когато картофите се съхраняват при температура от 8 °C (De Wilde et al., 2002, CIAA, 2009). Температурата на съхранение не оказва съществено влияние върху съдържанието на аспарагин в картофите, то е сортово зависимо (De Wilde et al., 2002, Kumar et al., 2004, Ciesarová et al., 2006, CIAA 2009).

Влияние на хранителните добавки

Добавянето на ензима аспарагиназа, който превръща прекурсора (аспарагин) в амонак и аспаранова киселина, също може да намали образуването на акриламид в храните. Ензимът се произвежда от *Aspergillus niger* или от *Aspergillus oryzae* и се прилага при производството на картофени и зърнени продукти (Kumar et al., 2004, Pederschi et al., 2008, Henderiksen et al., 2009).

Добавянето на аминокиселини или богати на белтъчини продукти също намаляват съдържанието на акриламид в храните (Rydberg et al., 2003). Аминокиселини, като глицин, цистеин, метионин, глутатион и лизин, оказват негативно влияние върху образуването на акриламид (Brathen and Knutsen, 2005, Chaeys et al., 2005, Anese et al., 2009). Образуването на акриламид намалява с 50% при добавяне на цистеин и метионин в зърнени и картофени продукти (Levine et al., 2009)

Установено е, че добавянето на антиоксиданти влияе върху реакцията на Майяр, която води до образуване на акриламид (Fernandez et al., 2003, Summa et al., 2006, Zhang et al., 2007, Zhu et al., 2010, Ou et al., 2010). Антиоксидантите, присъстващи в екстрактите от розмарин, бамбукови листа и екстракт от зелен чай, могат ефективно да намалят присъствието на акриламид в различни храни (Zhang et al., 2005, Zhang et al., 2008). Точният механизъм за инхибиране образуването на акриламид все още не е изяснен напълно, но се

предлага взаимодействие на антиоксидантите с активни алдехиди, което води до блокиране окислението на акролеина (Totlani and Peterson, 2006, Granby et al., 2008). Освен това повечето от тези проучвания се основават на условия *in vitro* или в малък мащаб; необходимо е да се проведат експерименти в промишлени условия.

Моно- и двувалентните катиони (Na^+ и Ca^{2+} или Mg^{2+}), добавени към тестото, показват забележителен ефект върху редуцията в концентрациите на акриламида. В допълнение поливалентните катиони също са способни да намалят образуването на акриламид по време на нагряване (Elden et al., 2004, Tomoda et al., 2004). Тези йони могат да взаимодействат с аспарагина, така че да се предотврати образуването на междинна форма на шифови бази и по този начин да предотвратят образуването на акриламид (Gokmen et al., 2007, Levine et al., 2009, Pedreschi et al., 2010). Образуването на акриламид в картофени ивици се редуцира при използване на хидроколоидни покрития от алгиновата киселина и пектин. Но покрития, съдържащи галактоманан от рожков, карагенанът или ксантановата гума стимулират образуването на акриламид в продуктите (Zeng et al., 2010).

Влияние на условията на обработка на храната

Повечето от предложените стратегии за намаляване на акриламида са фокусирани върху различни етапи от обработката на храните. Важни фактори, които влияят на процеса на образуване на акриламид, са температурата и времето на загряване, бланширането и пърженето (Ciesarová et al., 2006). Проведени са изследвания за влиянието на температурата на печене, времето на печене и образуването на акриламид в готовите продукти. Установена е силна корелация между температурата на печене и времето (Ahrne et al., 2007, Lukas et al., 2007). Най-благоприятна комбинация, при която са отчетени най-ниските концентрации акриламид в готовите продукти, е температура 260 °C и време на изпичане 20 минути. При оптимизация условията на изпичане (температурата, относителната влажност и време) могат да доведат до 50% намаляване на количествата акриламид. Комбинацията от конвенционално и диелектрично (микровълново) нагряване на продуктите е по-подходяща за редукция на акриламид в

хлебни изделия в сравнение с конвекционното нагряване. Изпичането при висока относителна влажност (с използване на пара) се оказва ефективно за намаляване на акриламида в хлебни изделия (Vleeschouwer et al., 2007, Anese et al., 2010). Образуването на акриламид се наблюдава повече във външната кора, отколкото във вътрешната част на кората на хляба, докато в средината акриламидът се появява само в следови концентрации (Sadd and Hamlet, 2005, Sadd et al., 2008).

Бланширането е важна операция за намаляване на акриламида в производството на пържени картофи. Количеството на образувания акриламид намалява главно поради извличането на прекурсори (редуциращи захари) преди пържене на картофите (Pedreschi and Moyano 2005, Pedreschi et al., 2009, Samir et al., 2013). Условията на бланширане (температура и време) могат да се променят, за да се запазят постоянните характеристики на крайния продукт. Бланширане при 70 °C в продължение на 10 до 15 минути, намалява образуването на акриламид съответно с 65% и 96% за пържени картофи и картофен чипс. Пърженето се използва както в хранителната промишленост така и в домашни условия. В края на процеса на пържене се образува най-голямо количество акриламид, което от своя страна е свързано и с развитието (формирането) на цветовете, което се дължи на реакцията на Майяр (Fiselier et al., 2006, Amrein et al., 2007). Интензивните условия за пържене (висока температура и продължително време) водят до по-тъмни картофи и с по-високо количество акриламид. По тази причина двата фактора - температурата на пържене и времето, трябва да се считат за важни, като температурата не трябва да надвишава 170-175 °C, а времето зависи от вида на продукта и може да варира и трябва да се установи опитно (Fiselier et al., 2006, Amrein et al., 2007).

Влияние на рН, водната активност и ферментацията върху продукцията на акриламид

Реакцията на Майяр силно се влияе от рН на храните (Eriksson, 2005). Изследванията показват, че понижението рН води до драстично намаляване в съдържанието на акриламид по време на пържене и печене (Jung et al., 2003, Grab 2007). Всяка киселинна обработка на суровините, намаляваща рН на храните, води до намаляване концентрациите на синтезиран акриламид. Добавянето на различни

киселини намалява количеството на акриламида в хлебни продукти, също така в царевичен чипс, бисквити и крекери (Jung et al., 2003, Graf et al., 2006). Активността на водата (a_w) в храните играе важна роля за намаляване образуването на акриламид. Акриламидът се образува в храната само когато водната активност (a_w) е под 0.8, докато образуването на акриламид е високо при водна активност, по-ниска от 0.4, каквато водна активност се наблюдава, при производството на бисквитки и картофен чипс (Hoenicke and Gattermann, 2004, 2005). Ферментацията контролира скоростта на образуване на акриламид в храната чрез поддържане на ниски концентрации на прекурсорите (редуциращи захари и аспарагин) и понижено рН. Установено е, че удълженото време на ферментация (най-малко един час) е подходящо за редукция на акриламид в хляб и пържени картофени продукти (Konings et al., 2007, Sadd et al., 2008). Комбинираната млечнокисела ферментация с бланширане е подходяща за по-голямо намаляване на акриламида в картофените продукти (Baardseth et al., 2006).

Заклучение

Основните ограничаващи фактори, отговорни за образуването на акриламид в картофените и зърнените продукти, са редуциращите захари (глюкоза и фруктоза) и съответно количеството на свободната (несвързана в пептиди и протеини) аминокиселина аспарагин. За търговско производство на картофени продукти е необходимо да се изберат сортове с ниски концентрации на редуциращи захари, като се отчита сезонната и регионалната вариабилност. Необходимо е да се избягва използването на картофи, съхранявани при температура под 6 °C. Оптималната температура на съхранение на картофите е около 8 °C. Бланширането във вода, последвано от пържене при контролирани температурно-времеви комбинации, може да бъде по-добра възможност за намаляване на образуването на акриламид в картофените продукти. Използването на добавки, като аминокиселини, аспарагиназен ензим, катиони и антиоксиданти, е ефективен подход за редукция на концентрацията на акриламид в хлебни и зърнени продукти. Въпреки това добавките не трябва да променят качеството и приемливостта от потребителите на хранителните продукти. Ферментацията с дрожди е обещаваща техно-

логия, която може да намали съдържанието на свободни прекурсори на аспарагина в зърнени продукти като пшеница. Комбинацията от ферментация с дрожди и бланширане значително ще намали съдържанието на акриламид в картофените продукти. Въпреки това стратегиите или подходите, разработени за картофените продукти, не са приложими към други хранителни продукти, например хлебни и зърнени изделия. Съществува силна положителна корелация между температурата на печене и времето на изпичане и образуването на акриламид. Използването на брашно с ниско съдържание на аспарагин може да намали съдържанието на акриламид в хлебните продукти. Чрез въвеждане на пара в конвенционална или традиционна система за печене е възможно да се намали съдържанието на акриламид в печени продукти. Разработените досега стратегии за смекчаване на образуването на акриламид се изучават при лабораторни условия, които може да не са подходящи за търговски процеси. Затова е необходима по-нататъшна работа, свързана с тестване на лабораторно получените стратегии в промишлени условия на производство. Намаляването на акриламида в хранителните продукти, като същевременно се защитават други аспекти на качеството им (органолептични качества) все още остават основно предизвикателство за хранителните технологии.

Литература

1. Ahrné L, Andersson CG, Floberg P, Rosén J, Lingnert H (2007) Effect of crust temperature and water content on acrylamide formation during baking of white bread: Steam and falling temperature baking. *LWT Food Sci. Technol* 40:1708-1715.
2. Amrein TM, Andres L, Escher F, Amado R (2007) Occurrence of acrylamide in selected foods and mitigation options. *Food Additives and Contaminants* 24: 13-25.
3. Anese M, Suman M, Nicoli MC (2009) Technological Strategies to Reduce Acrylamide Levels in Heated Foods. *Food Eng Rev* 1: 169-179.
4. Anese M, Suman M, Nicoli MC (2010) Acrylamide removal from heated foods. *Food Chemistry* 119: 791-794.
5. Baardseth P, Blom H, Skrede G, Mydland LT, Skrede A (2006) Lactic acid fermentation reduces acrylamide formation and other Maillard

reactions in French fries. *Journal of Food Science* 71: C28-C33

6. Becalski A, Lau BPY, Lewis D, Seaman SW (2003) Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling. *J Agric Food Chem* 51: 802–808.

7. Borda T, Alexe P (2011) Acrylamide levels in food. *Romanian Journal of Food Science* 1: 3-15.

8. Brathen E, Knutsen SH (2005) Effect of temperature and time on the formation of acrylamide in starch based and cereal model systems, flat breads and bread. *Food Chem* 92: 693-700.

9. Capuano E, Fogliano V (2011) Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT-Food Science and Technology* 44: 793-810.

10. CIAA (2009) Rev 12. The CIAA acrylamide toolbox. Confederation of the European Food and Drink Industries (CIAA), Brussels.

11. Claeys W, De Vleeschouwer K, Hendrickx ME (2005) Kinetics of acrylamide formation and elimination during heating of an asparagine-sugar model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 9999-10005.

12. Curtis TY, Powers SJ, Balagiannis D, Elmore JS, Mottram DS, et al. (2010) Free amino acids and sugars in rye grain: Implications for acrylamide formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 1959-1969.

13. David RL, James RC, Richard HS (2012) Acrylamide in foods: A review of the science and future considerations. *Annual Review Food Sci. Technol* 3: 15-35.

14. De Wilde T, De Meulenaer B, Mestdagh F, Govaert Y, Vandeburie S, et al. (2005) Influence of storage practices on acrylamide formation during potato frying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 6550-6557.

15. De Wilde T, De Meulenaer B, Mestdagh F, Verhé R, Govaert Y, et al. (2002) Acrylamide formation during frying of potatoes: thorough investigation on the influence of crop and process variables. In *Proceedings Chemical Reactions in Food* 4: 15-18.

16. De Wilde T, Meulenaer DB, Mestdagh F, Verhé R, Govaert Y, et al. (2004) Acrylamide formation during frying of potatoes: Thorough investigation on the influence of crop and process variables. *Czech Journal of Food Science* 22: 15-18.

17. Dybing E, Sanner T (2003) Risk assessment of acrylamide in foods. *Toxicological Sciences* 75: 7-15.

18. Elder VA, Fulcher JG, Leung H, Topor MG (2004) Method for reducing acrylamide in thermally processed foods. Patent US20040058045.

19. Eriksson S (2005) Acrylamide in food products: Identification, formation and analytical methodology. Doctoral thesis, Department of Environmental Chemistry, Stockholm University, Sweden.

20. Fernandez S, Kurppa L, Hyvönen L (2003) Content of acrylamide decreased in potato chips with addition of a proprietary flavonoid spice mix (Flavomare) in frying. *Innovations in Food Technology* 18: 24-26.

21. Fiselier K, Bazzocco D, Gama-Baumgartner F, Grob K (2006) Influence of the frying temperature on acrylamide formation in French fries. *Eur. Food Res Technol* 222: 414-419.

22. Fiselier K, Grob K (2005) Legal limit for reducing sugars in prefabricates targeting 50 µg/kg acrylamide in French fries. *Eur Food Res Technol* 220: 451-458.

23. Friedman M (2003) Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide-A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4504-4526.

24. Friedman MA, Dulak LH, Steham MA (1995) A Lifetime Oncogenicity Study in Rats with Acrylamide. *Toxicol Sci* 27: 95-105.

25. Gokmen V, Senyuva HZ (2007) Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food Chem* 103: 196-203.

26. Graf M, Amrein TM, Graf S, Szalay R, Escher F, et al. (2006) Reducing the acrylamide content of a semi-finished biscuit on industrial scale. *LWT- Food Science and Technology* 39: 724-728.

27. Granby K, Nielsen NJ, Hedegaard RV, Christensen T, Kann M, et al. (2008) Acrylamide-asparagine relationship in baked/toasted wheat and rye breads. *Food Addit Contam Part A* 25: 921-929.

28. Grob K (2007) Options for legal measures to reduce acrylamide contents in the most relevant foods. *Food Additives and Contaminants* 24: 71-81.

29. Hamlet CG, Sadd PA, Liang L (2008) Correlations between the amounts of free asparagine and saccharides present in commercial cereal flours in the UK and the

- generation of acrylamide during cooking. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 56: 6145-6153.
30. Hendriksen HV, Kornbrust BA, Oestergaard R, Stringer MA (2009) Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. *J Agric Food Chem* 57: 4168-4176.
 31. Hoenicke K, Gatermann R (2004) Stability of acrylamide in food during storage. *Czech Journal of Food Science* 22: 355-356.
 32. Hoenicke K, Gatermann R (2005) Studies on the stability of acrylamide in food during storage. *Journal of AOAC International* 88: 268-273.
 33. Hogervorst JG, Schouten LJ, Konings EJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA (2008) Dietary acrylamide intake and the risk of renal cell, bladder, and prostate cancer. *Am J Clin Nutr* 87: 1428-1438.
 34. Jung MY, Choi DS, Ju JW (2003) A novel technique for limitation of acrylamide formation in fried and baked corn chips and in French fries. *J Food Sci* 68: 1287-1290.
 35. Konings EJM, Ashby P, Hamlet CG, Thompson GAK (2007) Acrylamide in cereal and cereal products: a review on progress in level reduction. *Food Addit Contam* 24: 47-59.
 36. Konings EJM, Baars AJ, van Klaveren JD, Spanjer MC, Rensen PM, et al. (2003) Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks. *Food and Chemical Toxicology* 41: 1569-1579.
 37. Kumar D, Singh BP, Kumar P (2004) An overview of the factors affecting sugar content of potatoes. *Annals of Applied Biology* 145: 247-256.
 38. Levine RA, Ryan SM (2009) Determining the effect of calcium cations on acrylamide formation in cooked wheat products using a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 6823-6829.
 39. Levine RA, Smith RE (2005) Sources of variability of acrylamide levels in a cracker model. *J Agric Food Chem* 53: 4410-4416. hydrocolloids as inhibitors of acrylamide formation in model systems and fried potato strips. *Food Chemistry* 121: 424-428.
 40. Lindsay RC, Jang SJ (2005) Chemical intervention strategies for substantial suppression of acrylamide formation in fried potato products. *Chemistry and safety of acrylamide in food* 561: 393-404.
 41. Lukac H, Amrein TM, Perren R, Petit BC, Amado R, et al. (2007) Influence of roasting conditions on the acrylamide content and the color of roasted almonds. *Food Chem Toxicol* 72: 33-38.
 42. Martin FL, Ames JM (2001) Formation of strecker aldehydes and pyrazines in a fried potato model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 3885-3892.
 43. Matthäus B, Haase NU, Vosmann K (2004) Factors affecting the concentration of acrylamide during deep-fat frying of potatoes. *European Journal of Lipid Science and Technology* 106: 793-801.
 44. Medeiros VR, Mestdagh F, De Meulenaer B (2012) Acrylamide formation in fried potato products - Present and future, a critical review on mitigation strategies. *Food Chemistry* 133: 1138-1154.
 45. Medeiros VR, Mestdagh F, De Meulenaer B (2012) Acrylamide formation in fried potato products-Present and future, a critical review on mitigation strategies. *Food Chemistry* 133: 1138-1154.
 46. Muttucumaru N, Elmore JS, Curtis T, Mottram DS, Parry MAJ, et al. (2008) Reducing Acrylamide Precursors in Raw Materials Derived from Wheat and Potato. *J Agric Food Chem* 56: 6167-6172.
 46. Olesen PT, Olsen A, Frandsen H, Frederiksen K, Overvad K, et al. (2008) Acrylamide exposure and incidence of breast cancer among postmenopausal women in the Danish Diet, Cancer and Health Study. *Int J Cancer* 122: 2094-2100.
 48. Ou SY, Shi JJ, Huang CH, Zhang GW, Teng JW, et al. (2010) Effect of antioxidants on elimination and formation of acrylamide in model reaction systems. *Journal of Hazardous Materials* 182: 863-868.
 49. Pedreschi F, Granby K, Risum J (2010) Acrylamide mitigation in potato chips by using NaCl. *Food and Bioprocess Technology* 3: 917-921.
 50. Pedreschi F, Kaack K, Granby K (2006) Acrylamide content and colour development in fried potato strips. *Food Research International* 39: 40-46.
 51. Pedreschi F, Kaack K, Granby K (2008) The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. *Food Chemistry* 109: 386-392.
 52. Pedreschi F, Moyano PC (2005) Effect of pre drying on texture and oil uptake of potato chips. *LWT-Food Sci Technol* 38: 599-604.

53. Pedreschi F, Trivisany X, Reyes C, Troncoso E, Pedreschi R (2009) Kinetics of extraction of reducing sugar during blanching of potato slices. *Journal of Food Engineering* 91: 443-447.
54. Petersen BJ, Tran N (2005) Chemistry and Safety of Acrylamide in Food, *Advances in Experimental Medicine and Biology* 561: 63-76.
55. Riboldi BP, Vinhas ÁM, Moreira JD (2014) Risks of dietary acrylamide exposure: A systematic review. *Food chemistry* 157: 310-322.
56. Rice JM (2005) Carcinogenicity of acrylamide. *Mutation Research* 580: 3-20.
57. Rosen J, Hellenas KE (2002) Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst* 127: 880-882.
58. Rydberg P, Eriksson S, Tareke E, Karlsson P, Ehrenberg L, et al. (2003) Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7012-7018.
59. Sadd P, Hamlet C (2005) The formation of acrylamide in UK cereal products. *Chemistry and Safety of Acrylamide in Foods* 561: 415-429.
60. Sadd PA, Hamlet GH, Liang L (2008) Effectiveness of methods for reducing acrylamide in bakery products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 6154-6161.
61. Samir A, Rehab F, Mohsen A, Wafaa M (2013) Impacts of pre-treatments on the acrylamide formation and organoleptic evaluation of fried potato chips. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 9: 90-101.
62. Sanny M, Jinap S, Bakker EJ, Van BMAJS, Luning PA (2012) Is lowering reducing sugars concentration in French fries an effective measure to reduce acrylamide concentration in food service establishments. *Food Chemistry* 135: 2012-2020.
63. Schettgen T, Drexler H, Angerer J (2002) Acrylamide in the general population-A daily intake estimation. *Umweltmedizin in Forschung und Praxis* 7: 331-336.
64. Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, et al. (2002) Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 419: 449-450.
65. Summa C, Wenzl T, Brohee M, de la Calle B, Anklam E (2006) Investigation of the correlation of the acrylamide content and the antioxidant activity of model cookies. *J Agric Food Chem* 54: 853-859.
66. Svensson K, Abramsson L, Becker W, Glynn A, Hellenas KE, et al. (2003) Dietary intake of acrylamide in Sweden. *Journal of Food Chemistry and Toxicology* 41: 1581-1586.
67. Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M (2002) Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 4998-5006.
68. Taubert D, Harlfinger S, Henkes L, Berkels R, Schomig E (2004) Influence of processing parameters on acrylamide formation during frying of potatoes. *J Agric Food Chem* 52: 2735-2739.
69. Tomoda Y, Hanaoka A, Yasuda T, Takayama T, Hiwatashi A (2004) Preparing food to be cooked by heat treatment and removing polyvalent cations by flushing with water. *US Patent Application* 20040126469.
70. Törnqvist M (2005) Acrylamide in food: The discovery and its implications. *Chemistry and safety of acrylamide in food* 561 : 1-19.
71. Torres MDA, Parreño WC (2009) Thermal processing and quality optimization. *Advances in potato chemistry and technology*.
72. Totlani VM, Peterson DG (2006) Epicatechin carbonyl-trapping reactions in aqueous Maillard systems: identification and structural elucidation. *J Agric Food Chem* 54: 7311-7318.
73. Truong VD, Pascua Y, Reynolds R (2013) Processing Treatments for Reducing the Acrylamide Level in Sweet potato French Fries. *Journal of agricultural and food chemistry* 62: 310-316.
74. Vleeschouwer K, Van der PI, Van LA, Hendrickx ME (2007) Kinetics of Acrylamide formation/elimination reactions as affected by water activity. *Biotechnol Progr* 23: 722-728.
75. Wilson K, Rimm E, Thompson K, Mucci L (2006) Dietary acrylamide and cancer risk in humans-A review. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 1: 19-27.
76. World Health Organization (WHO) (2002) FAO/WHO Consultations on the health implications of acrylamide in foods. Summary report of a meeting held in Geneva.
77. Xu Y, Cui B, Ran R, (2014) Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: current status and future prospects. *Food and Chemical Toxicology* 69: 1-12.
78. Yaylayan V, Stadler R (2005) Acrylamide formation in food: a mechanistic perspective. *Journal of AOAC International* 88: 262-267.

79. Zeng XH, Cheng KW, Du YG, Kong R, Lo C, Chu IK, et al. (2010) Activities of hydrocolloids as inhibitors of acrylamide formation in model systems and fried potato strips. *Food Chemistry* 121: 424-428.

80. Zhang Y, Chen J, Zhang X, Wu X, Zhang Y (2007) Addition of antioxidant of bamboo leaves (AOB) effectively reduces acrylamide formation in potato crisps and French fries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 523-528.

81. Zhang Y, Zhang G, Zhang Y (2005) Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods: Review and recent developments. *Journal of Chromatography A* 1075: 1-21.

82. Zhang Y, Zhang Y (2008) Effect of natural antioxidants on kinetic behaviour of acrylamide formation and elimination in low-

moisture asparagine-glucose model system. *Journal of Food Engineering* 85: 105-115.

83. Zhu F, Cai YZ, Ke J, Corke H (2010) Compositions of phenolic compounds, amino acids and reducing sugars in commercial potato varieties and their effects on acrylamide formation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 2254-2262.

Име на автора:

доц. д-р. Иван Георгиев Иванов

Университет:

Университет по хранителни технологии

Катедра:

“Органична химия и неорганична химия”

Адрес:

гр. Пловдив, 4002, бул. Марица 26

e-mail: ivanov_ivan.1979@yahoo.com



ОСНОВНИ СТРАТЕГИИ В СИНТЕЗА НА *ОРТО*-ДИЙОДОЗАМЕСТЕНИ АРОМАТНИ КИСЕЛИНИ

Таня Димова, Надя Хаджиева, Надежда Нефедова, Илиян Колев

STRATEGIES IN THE SYNTHESIS OF *ORTHO*-DIIODINE-SUBSTITUTED AROMATIC ACIDS

Tanya Dimova, Nadya Hadzhieva, Nadezda Nefedova, Iliyan Kolev

ABSTRACT: Aryliodides are valuable precursors in organic synthesis. Their synthesis is generally carried out using the classical methods for direct and indirect halogenation (iodination). The subject of the present study, however, are the strategies for targeted synthesis of the much less readily accessible and atypically substituted 2,6-diiodosubstituted aromatic acids.

Key words: 2,6-diiodosubstituted aromatic acids, synthetic strategies, directed synthesis

Въведение

Йодоарените са атрактивен клас органични съединения. От синтетично гледище, те се ползват като реагенти в реакциите на кръстосано С-С куплиране [1,2]. Структурната нестабилност на наличните им С-І връзки предопределя до голяма степен и тяхната висока реактивност в този тип взаимодействия [3].

Йодоарените проявяват също и фармакохимичен потенциал. Редица йодоаромати се ползват като контрастни вещества, а други – като медикаменти в терапията на онкологични и инфекциозни заболявания [4].

Обикновено синтезът на йодоорганични съединения не се осъществява с количествени добиви. Освен това, повечето общоприети методи за ароматно йодиране оползотворяват реагенти с по-слаба I^+ -дотираща активност [5]. Отделно, не всеки субстрат бива количествено халогениран (йодиран). В редица случаи достъпът на I^+ бива стерично ограничен, а в други – електронно възпрепятстван. Въвеждането на втори йоден атом в състава на вече йодиран (деактивиран) ароматен въглеводород е също затруднен. Йодирането на ароматни киселини, по аналогия, не се осъществява във висок процент. Ето защо, по презумпция, синтезите на дийодозаместените производни на бензоената киселина не ще се реализират с желаните количествени добиви.

В случаите обаче, когато е необходимо осъществяването на ароматно дийодиране в необичайните за заместване позиции – *орто*, спрямо присъстващия $COOH$ функционал –, то следва да се ползва потенциала на някои от следните методи (Схема 1):

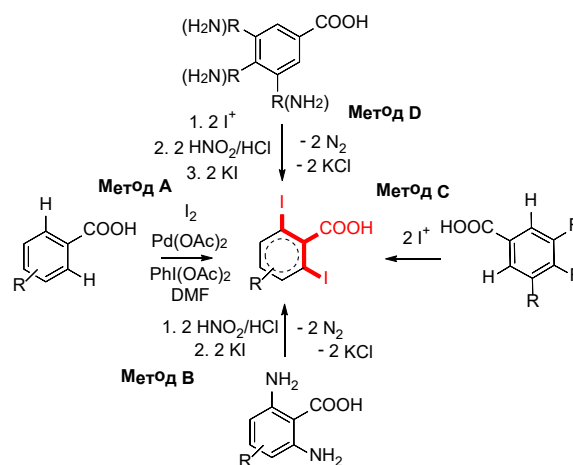


Схема 1. Стратегии за насочен синтез на 2,6-дийодозаместени производни на бензоената киселина

Представеното тук цели да обобщи и изложи в резюме наличните и хипотетични методи за синтеза на многообещаващите 2,6-дийодозаместени ароматни киселини.

Изложение

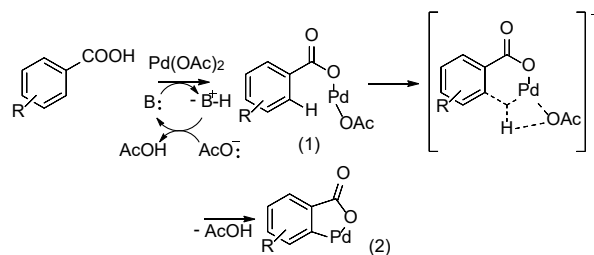
Най-общо методите за синтез на 2,6-дийодозаместената бензоена киселина и ней-

ните полизаместени производни могат да се класифицират като класически и съвременни. Порядъкът в който са представени в текста обаче е случаен, без определена закономерност - хронологична или друга. Там, където е счтено за необходимо е въведена подробна информация, представяща механизма на разглежданото взаимодействие или е посочена такава, която да изясни техните особености – ползи, недостатъци. Приложението на някои от представените методи (А и С) е експериментално потвърден, посредством синтеза на умерен брой, случайни производни на въпросната киселина. Останалите методи притежават потенциала за синтез на предвидените киселини. Последните представяме като предполагаемо потребни.

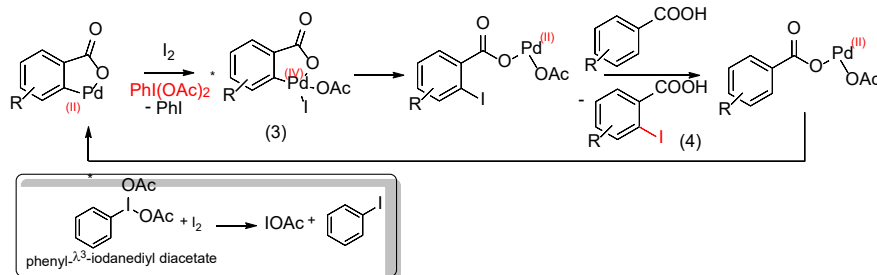
Метод А. Метод на директното *ortho* металиране с последващо йододеметалиране (съвременен подход)

Реакциите от този тип обикновено се осъществяват в присъствието на преходни метали – Rh, Ni, Ir, Pd, Hg, Tl [6-8]. Най-често прилагани в практиката реагенти са съединенията на Pd. Доказано е, че под формата на ацетат (Pd(OAc)₂), паладиът проявява своята най-висока реактивност в серия реакции, вкл. и в тези на йодиране [7,9]. За да бъде успешно осъществена реакцията на йодиране в присъствието на Pd е необходимо използва-

ния ароматен реактант да притежава т. нар. метало-насочващ заместител. Последният ще осигури положителния ход на основната реакция на директно *ortho*-металиране. В качеството на подходящ, в случая, се отбелязва - COOH функционал. Активността на карбоксилния функционал в тези взаимодействия обаче бива проявен единствено и само под формата на спрегната основа - карбоксилатен анион. Ето защо, в качеството на промотор (адитивен реагент), в реакционната система се внася също база (B:) - акцептор на водородния COOH протон.:

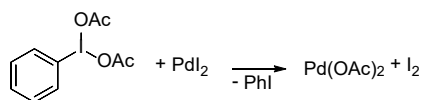


Образуваните смесенолигандни Pd съединения (1) са нестабилни. В резултат на вътремолекулярна циклизация спонтанно се формират петчленни Pd-цикли (2). Организираните метало-въглеродни връзки се позиционират в обкръжението (*ortho*) на метало-насочващата група, в случая – COOH функционал.:



Обмяната на паладиеви с йодни атоми се осъществява индиректно, в присъствието на подходящ по сила и природа окислител (обикновено PhI(OAc)₂)¹. В рамките на осъ-

¹ Ролята на PhI(OAc)₂, в разглежданата реакция, е разностранна. С помощта на този окислител се осъществява също и реактивацията на „инактивирания“ и внесен в следи Pd(OAc)₂.

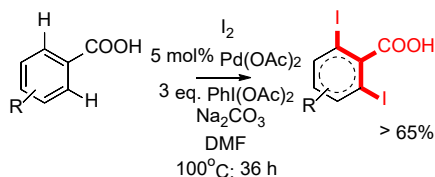


ществения контакт между въведените йодни молекули и използваният окислител се формира активният йод-дотиращ реагент – CH₃COOI (съкр. IOAc). Формираният хипойодид окислява също и междинно формираните се арил-Pd(II) цикли до такива, в които металът приема по-висок заряд (степен на окисление - (IV)) (3) [10]. В тази си форма Pd се елиминира лесно (по редукционен път) от ароматния остатък, генерирайки желаните йодирани продукти (4).

Като недостатъци на стратегията бихме посочили: необходимостта от налагането на хроматографско разделяне на така получения

продукт от съпътстващия го йодобензен и нежеланото присъствие на странични продукти на неспецифично (*para*) йодиране; употребата на скъпоструващ и трудно отстраним от реакционната система палдиев ацетат, а също и в необходимостта от ползването на специфични, високо кипящи полярни органични разтворители.

Позитивите на стратегията намираме в: отсъствието на особени ограничения в избора на реактант и в постигнатата висока региоселективност. Освен това, при подходящия подбор на реакционни условия, добивът на желаните продукти може да приеме количествени измерения [7,11].

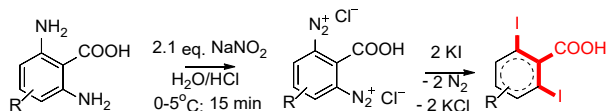


Йодирането на ароматния субстрат може да се осъществи и в отсъствието на преходно-метален реагент [12], но реализираните добиви и селективност в тези случаи са много по-ниски от тези, достигнати в присъствието на такъв.

Селективното *орто*-йодиране на ароматни киселини може също да се осъществи и с двойката I_2 - $Pt(OAc)_3$. Високата токсичност на $Pt(OAc)_3$ налага неговото ползване да бъде ограничено и да се прилага само в случаите на крайна необходимост; при отсъствие на алтернативен него реагент [13,14]. Съждението е валидно и по отношение на Hg-съдържащите реагенти [15].

Метод В. Метод на Задмайер (класически подход)

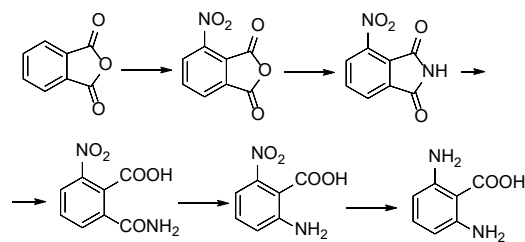
Въвеждането на йодни атоми в обкръжението на карбоксилния функционал може да се осъществи също и по план, който включва едноименната реакция на Задмайер:



Формирането и заместването на diazonиеви групи с йодни атоми, тук, се осъществява последователно, *in situ*, без необходимостта от изолирането на междинно образувалите се продукти. Взаимодействията с посочените реагенти се осъществяват в един реакционен

съд (*one pot*) и за кратък период от време. Необходимите условия за реализирането на реакцията на йодиране бихме посочили като благоприятни (меки). Последните следва да обезпечат и структурната цялост на новоорганизираните C-I връзки [16,17].

За синтеза на най-смплия по структура представител, 2,6-дийодобензоена киселина, съгласно този синтетичен план, следва да се ползва предварително получената 2,6-диаминобензоена киселина. Синтезът на последната е многостъпков и осъществен за първи път през 1950 от С. Moser и Т. Gompf [18]:

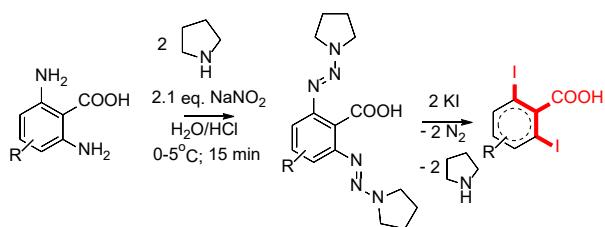


Разбира се, ако е необходимо получаването на други производни на въпросната киселина, то следва да се ползват целесъобразни реактанти, аналози на указания анхидрид.

Отсъствието на 2,6-диаминобензоената киселина (вкл. и на нейни производни) в международните търговски каталози, налага тяхната наличност да се осигури по чисто препаративен път. Ето защо синтезът на желаните прекурсори, производни на 2,6-диаминобензоената киселина, съгласно този план, изисква разхода на значително експериментално време и употребата на множество химични реагенти.

Въпреки, че йодирането на ароматни въглеводороди по метода на Задмайер се осъществява с висок процент, често пъти желаният продукт е съпроводен от присъствието на продукти на различни странични взаимодействия, като напр.: протодедиазотиране (заместване на diaзогрупата с водороден атом), купелуване и C-C куплиране.

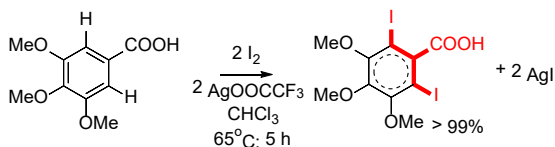
За да се избегне формирането на странични реакционни продукти, често пъти, е предпочитателно diaзониите групи да се преобразуват първо до много по-стабилните (както в твърдо, така и в течна агрегатно състояние) пирролидиндиазенилови (или диалкилтриазенилови) производни [15, 19]:



Метод С. Директно йодиране (класически подход)

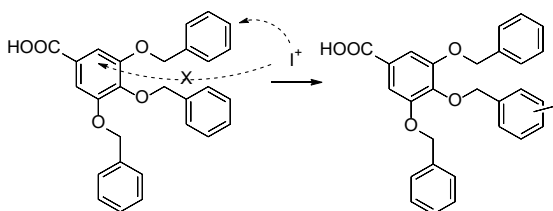
Изборът на подходящ ароматен реактант, притежаващ два „вакантни“ СН центъра в желаните позиции, 2 и 6, е стратегия, която може да ни осигури директният синтез на серия 2,6-дийодо-3,4,5-полизаместени производни на бензоената киселина. Като подходящи за йодиране, в този случай, бихме посочили следните общодостъпни (търговски) вещества: 3,4,5-трихидроксибензоена киселина (*галова киселина*), 4-метокси-3,5-дихидроксибензоена киселина (*сирингова киселина*), 3,4,5-триметоксибензоена киселина, 3,4,5-триетоксибензоена киселина, 3,4,5-трифлуоробензоена киселина, 5-метокси-3,4-дихидроксибензоена киселина и 3,4,5-трис(бензилокси)бензоена киселина.

Изборът на 3,4,5-триметоксибензоената киселина, като реактант за синтеза на съответния ѝ дийодозаместен аналог, по този метод, е приложен неотдавна от нашия екип [20].:



Изчерпателното йодиране на галова киселина е осъществено през 1900 г. Полученото нейно дийодопроизводно е използвано като ефективно антиинфекционно средство.

Не винаги обаче, изборът на определен субстрат може да се възприеме като напълно подходящ. Така напр., гореуказаната 3,4,5-трис(бензилокси)бензоена киселина следва да представим като нецелесъобразна. Присъстващите в нейния състав няколко бензилоксидни заместители се явяват конкурентни реакционни центрове в реакцията на йодиране. Последните ще позволят формирането на смес от няколко различни по структура продукта.:



Едва ли в този случай, дори и в следи, ще се формира целевата 2,6-дийодо-3,4,5-трис(бензилокси)бензоена киселина. Освен това, броят на общодостъпни 3,4,5-тризаместени производни на бензоената киселина е твърде ограничен, за да се постигне синтеза на хомоложна серия от съединения с желания структурен белег.

Метод Д. Избор на реактант със „защитени“ ароматни СН центрове (класически подход)

Представената синтетична стратегия носи донякъде белезите на гореуказаните синтетични методи - В и С. За разлика от тях обаче, тук избраната стратегия е многостъпкова и сложна за експериментално реализиране. Освен това, за изпълнението на представения синтетичен план не можем да посочим комерсиален реактант, ароматна киселина с присъстващи „защитни“ групи в нежеланите за йодиране позиции – 3, 4 или 5. Затова наличието на специфичен реактант следва да постигнем след предварително наложена стратегия за защита на посочените СН групи. Предвид високата реактивоспособност на новосъздадените С-І връзки е необходимо, присъстващите „защитни групи“ да се отстраняват лесно и при „благоприятни“ реакционни обстоятелства. Ето защо като подходящи за защита следва да посочим ароматните първични NH₂, респективно NO₂-групи (Схема 2).

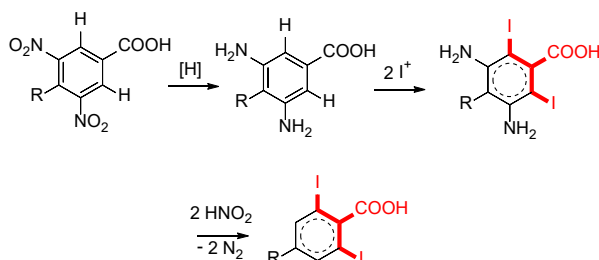


Схема 2. Стратегия за ароматно йодиране в присъствието на две защитни групи в 3 и 5 позиция

Отстраняването на предварително въведените аминогрупи, след наложено йодиране,

реализираме по общия маршрут на ароматно ди- и деазотиране в присъствието на HNO_2 и фосфорна киселина.

Заклучение

Предложените синтетични методи целят да подпомогнат работата на всеки, който се стреми да получи въпросните дийодозаместени ароматни киселини.

Производните на 2,6-дийодозаместената бензоена киселина могат да се ползват с успех в синтеза на много по-сложно устроени и рядко срещани природни съединения, каквито са напр. *мета*-терфениловите производни.

Производните на 2,6-дийодозаместената бензоена киселина имитират също поведението на повечето рентгеноконтрастни вещества. Изследва се дори и техният потенциал в изграждането на тъканно-имитиращи и диагностични материали. Откриват дори и възможността за изучаване пределите на т. нар. *ortho*-ефект.

Благодарност

This work was supported by the Science Fund of the Medical University „Prof. Dr. Paraskev Stoyanov” - Varna, Bulgaria (Grant № 20023/11.12.2020).

Литература

1. Liebscher, Y., J. Jürgen, 2007. Carbon–Carbon Coupling Reactions Catalyzed by Heterogeneous Palladium Catalysts, *Chemical Reviews*, 107, 1: 133–173.
2. Molnár, Á, 2011. Efficient, Selective, and Recyclable Palladium Catalysts in Carbon–Carbon Coupling Reactions, *Chemical Reviews*, 111, 3: 2251–2320.
3. Kolev, I., 2019. Farmakohimichen kachestven analiz - Osnovni polozheniya v analiza na vaglevodородni, halogeno- i kislородosadarzhashti funktsionali, Izd. MU "Prof. d-r P. Stoyanov", ISBN 978-619-221-227-8
4. Beale, J., J. Block, 2011. *Wilson and Gisvold's textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 12th ed., ISBN 978-0-7817-7929-6
5. Kolev, I., S. Petrova, R. Nikolova, et al. 2013. Synthesis, characterization, and crystal structure of 2-iodo-3,4,5-trimethoxybenzoic acid, *Journal of Molecular Structure*. 1034: 318-324.

6. Erbing, E., A. Sanz-Marco, A. Vázquez-Romero, et al. 2017. Base- and Additive-Free Ir-Catalyzed *ortho*-Iodination of Benzoic Acids: Scope and Mechanistic Investigations, *ACS Catalysis*, 8(2), 920–925.

7. Mei, T.-Sh., R. Giri, N. Mangel, et al. 2008. Pd(II)-Catalyzed Monoselective *ortho* Halogenation of C-H Bonds Assisted by Counter Cations: A Complementary Method to Directed *ortho* Lithiation, *Angewandte Chemie*. 120, 28: 5293-5297.

8. Schröder, N., J. Wencel-Delord, F. Glorius, 2012. High-Yielding, Versatile, and Practical [Rh(III)Cp*]-Catalyzed *Ortho* Bromination and Iodination of Arenes, *Journal of the American Chemical Society*. 134, 20: 8298–8301.

9. Grennberg, H., J. Foot, M. Banwell, 2008, Palladium (II) Acetate, *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*.

10. Dick, A., J. Kampf, M. Sanford, 2005, “Unusually Stable Palladium (IV) Complexes: Detailed Mechanistic Investigation of C–O Bond-Forming Reductive Elimination”, *Journal of the American Chemical Society*. 127 (37), 12790–12791.

11. Al-Zoubi, R., H. Al-Mughaid, R. McDonald, 2015. A Simple and Efficient Two-Step Synthesis of 1,2,3-Triiodoarenes via Consecutive C–H Iodination/*ipso*-Iodode-carboxylation Strategy: A Potential Application towards *ortho*-Diiodoarenes by Regioselective Metal–Iodine Exchange Reaction, *Australian Journal of Chemistry*. 68, 6: 912.

12. Sarkar, S., M. Jana, T. Narendar, 2013. Metal-Free Directed *ortho* C-H Iodination: Synthesis of 2'-Iodobiaryl-2-carbonitriles *European Journal of Organic Chemistry*. 29: 6491–6495.

13. McKillop, A., D. Bromley, E. Taylor, 1969. Thallium in organic synthesis. VI. Synthesis of primary aliphatic bromides, *The Journal of Organic Chemistry*. 34, 4: 1172–1173.

14. Banerjee, A., L. Silva, V. Carneiro, 2008. Thallium (III) Acetate, *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*.

15. Merkushev, E., 1988. Advances in the Synthesis of Iodoaromatic Compounds, *Synthesis*. 12, 923–937.

16. Dong, C., K. Nakamura, T. Taniguchi, et al. 2018. Synthesis of Aryl Iodides from Arylhydrazines and Iodine, *ACS Omega*. 3, 8: 9814–9821.

17. Nemati, F., A. Elhampour, 2012. Green and efficient diazotization-iodination of aryl amines using cellulose sulfuric acid as a biodegradable and recyclable proton source under sol-

vent-free condition, *Scientia Iranica*. 19, 6: 1594–1596.

18. Moser, C., T. Gompf, 1950. „The synthesis of 2,6-diaminobenzoic acid“ *The Journal of Organic Chemistry*. 15, 3: 583–586.

19. Foster, N., N. Heindel, H. Burns, et al. 1980. Aryl Iodides from Anilines via Triazene Intermediates, *Synthesis*. 07: 572–573.

20. Kolev, I., N. Hadzhieva, M. Rogozherov, 2021. Spectral behavior peculiarities of the carboxyl functional group in iodine encirclement - the case of 2,6-diiodo-3,4,5-trimethoxybenzoic acid, *Journal of Molecular Structure*. 1226: 129303.

маг. фарм. д-р Таня Димова
Медицински Университет “Проф. д-р Параскев Стоянов” - Варна
Факултет „Фармация“
Катедра „Фармацевтична химия“
гр. Варна, п.к. 9000
бул. "Цар Освободител" 84
e-mail: biotan@abv.bg

маг. фарм. Надя Хаджиева
Медицински Университет “Проф. д-р Параскев Стоянов” - Варна
Факултет „Фармация“
Катедра „Фармацевтична химия“
гр. Варна, п.к. 9000
бул. "Цар Освободител" 84
e-mail: hadjieva.nadja@mail.com

Надежда Нефедова
Медицински Университет “Проф. д-р Параскев Стоянов” - Варна
Факултет „Фармация“
Катедра „Фармацевтична химия“
гр. Варна, п.к. 9000
бул. "Цар Освободител" 84
e-mail: merely.es@gmail.com

доц. Илиян Колев, д.х.
Медицински Университет “Проф. д-р Параскев Стоянов” - Варна
Факултет „Фармация“
Катедра „Фармацевтична химия“
гр. Варна, п.к. 9000
бул. "Цар Освободител" 84
e-mail: ilian.kolev@mu-varna.bg



СЕНЗОРЕН ПРОФИЛ НА Ca (II) - АЛГИНАТНИ МИКРОСФЕРИ С ХИДРОЗОЛ ОТ *ROSA DAMASCENA* MILL.

Иванка Петрова, Надежда Петкова

SENSORY PROFILE OF CA (II)-ALGINATE BEADS CONTAINING HYDROSOL FROM *ROSA DAMASCENA* MILL.

Ivanka Petrova, Nadezhda Petkova

ABSTRACT: Current trends in food technology aimed to study the possibility of encapsulating the plant extracts rich in the biologically active substances by including them in the composition of Ca (II) - alginate microspheres with different concentrations of hydrocolloids. Our previous research reveals that the encapsulation of a rose hydrosol in Ca (II)-alginate beads with hydrocolloids appeared to be a procedure with a high reproducibility and relatively low cost. The present study aims to analyze the sensory profile of Ca (II) -alginate microspheres containing a hydrosol from *Rosa damascena* Mill. A different amounts of sodium alginate were used to form the alginate microspheres with the addition of selected hydrocolloids (inulin, pectin, kappa carrageenan, xanthan and guar gum). The further application of this knowledge can be useful in the development of various food products with an improved health profile.

Key words: sensory profile, alginate microspheres, hydrocolloids, *Rosa damascena* Mill

Introduction

Recently considerable interest has been developed concerning the alternative uses of edible flowers, rich in essential oils as an antioxidant and antibacterial agents in the food industry (Petrova et al., 2016).

Rosa damascena Mill is an ornamental plant, that belongs to the *Rosaceae* family. Flowers have traditionally been grown in Bulgaria since many centuries mainly for the production of rose oil. In ancient medicine *R. damascena* Mill was used to treat abdominal pain, strengthen the heart, treatment of menstrual bleeding and digestive disorders and reduction of inflammation, especially of the throat (Yassa et al., 2009; Boskabady et al., 2011; Abidi et al., 2019). The rose has been used not only in medicine and cosmetics, but also as a flavoring agent and for preserving or improving the colour of food, against enzymatic browning and fruit beverage stabilization (Xiao et al., 2020). Historically the rose has been used in the form of oil, syrup, honey, rose water, decoctions, tinctures, ointments and others including fresh flower petals.

Rose hydrosol, also called "rose water" is obtained by the hydrodistillation of *R. damascena* Mill in the production of rose oil and exhibits

antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties. Rose hydrosol contains less than 1 g/L of dispersed rose oils giving the organoleptic properties which is the main reason for to be popular in some Eastern country as an additive in some specialty foods and drinks as well as in the food industry (Labadie et al., 2015; D'Amato et al., 2018; Abidi et al., 2019; Bayhan et al., 2020). In Bulgaria rose hydrosol is used mainly for cosmetic purposes, but is also included in certain desserts and drinks.

Many biologically active substances as antioxidants in plant extracts are highly sensitive to several factors as the heat and the light. Beside that when they are in their free form, they show a low water solubility and a high rate of metabolism. These factors decrease the stability, the bioavailability, and drastically reduce the effectiveness of the biologically active substances in the human body. Encapsulation of bioactive compounds has shown a good performance in order to preserve their stability during processing and storage. This technique also leads to prevent undesirable interactions between the added compounds and food matrices, thereby it promoting a controlled release of the encapsulated compounds (Arriola et al., 2016).

Alginates are used for encapsulation of sensitive and unstable substances. In the presence of calcium ions alginates rapidly exhibit their gelling abilities by forming microspheres with favourable characteristics. Alginates are widely used in medicine, the pharmaceutical industry and more recently in the food industry as a suitable matrix for the supply of active compounds, they are biodegradable, non-toxic and can mask the flavour (Alkhatib et al., 2020). The addition of sugars and hydrocolloids in Ca (II)-alginate systems have some beneficial effect on the structural-mechanical properties of the formed beads (Aguirre Calvo et al., 2019). Our previous study showed that the addition of 3% inulin in the composition of Ca (II)-alginate alginate microspheres improves their plasticizing effect and a higher alginate concentration of 4% leads to an increase in the rupture force (Petrova et al. 2021).

The aim of the present study is to analyze the sensory profile of Ca (II) -alginate microspheres containing the hydrosol from *Rosa damascena* Mill and study the influence of selected colloids on their sensory characteristics.

Materials and methods

1. Materials

Commercial rose hydrosol (Ikarov, Bulgaria) was purchased from a local drugstore in Plovdiv, Bulgaria. The hydrosol was not further processed or pretreated before use.

Sodium alginate, CaCl_2 , xanthan and sucrose were purchased from Sigma (Germany).

Inulin with two different degrees of polymerization Frutafit[®]TEX (DP = 22) and Frutafit HD (DP = 9-12) were kindly supplied by Sensus (Roosendaal, the Netherlands).

Pectin from celery tubers with the average degree of esterification (DE) = 46%, anhydrouronic acid content (AUAC) 70% and average *M_w* of 912694 g/mol were obtained as previously described (Tumbariski et al., 2020).

κ -carrageenan and guar gum was purchased from Orion (Karlovo, Bulgaria).

2. Methods

2.1. Preparation of Ca (II)-alginate beads containing hydrosol from *R. damascena* and hydrocolloids

The sodium salt of alginic acid with M-block 61%, G-block 39% and M/G ratio 1.55 (Sigma Aldrich, Germany) were used for the preparation of the alginate beads with a rose hydrosol. Sodium alginate (1 g or 2 g) and 5 g sucrose was sus-

pended in 50 ml rose hydrosol. The resulting suspension was heated at 35°C for 3 min and stirring with a laboratory homogenizer Polytron PT45-80 (Kinematica, Switzerland) - 1600 W, max 250.s⁻¹ for 1 min. Nine different samples were prepared as follows: blank samples, containing only 2% and 4% sodium alginate and samples with the addition of selected hydrocolloids in the different amount (2% alginate + 3% inulin; 4% alginate + 6% inulin; 2% alginate + 1% xanthan gum; 0.5% κ -carrageenan + 2% alginate; 0.5% guar gum + 2% alginate; 2% alginate + 6% inulin, and 0.5% pectin + 2% alginate). For removing the air bubbles, the obtained suspension was placed in the fridge for 60 min. The alginate beads were prepared as liquid solutions were transferred into a syringe and dropped into a cold CaCl_2 solution (2%) with temperature 7°C. Then the Ca (II)-alginate beads containing rose hydrosol were rinsed with water and used for sensory analysis.

2.2. Sensory evaluation

Sensory characteristics of alginate beads were estimated by descriptive sensory analysis using a trained panel of nine members, four man and five women. Selected members were exposed to several screening tests according to the ISO standards. Panel members were asked to rate the intensity of their perceptions of colour, transparency of beads, smell, taste, flavour, aftertaste and texture attribute (density, elasticity, adhesiveness) on a 15 cm scale. All nine samples are presented in sequential order.

2.3. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using MS Excel 2019. All data are expressed as mean $\pm$ standard deviation, the difference was considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results and discussion

Sensory evaluation of food products is emerging as an essential component of its development. In sensory analysis, certain standards are used to create, test, analyze and interpret sensory results of products that are already at an advanced stage. Consumer perception of a food product can be a leading idea in the early stages of product development, and sensory tests can help determine the necessary sensory characteristics leading to acceptability. It is useful to identify target consumers, product competitors and to evaluate new ideas in the creation of food and beverages.

Hydrocolloids affect the viscosity and texture parameters of the products in which they are included. In addition, they are used to stabilize the mouthfeel sensation with a possible variation in the sensory parameters, such as acidity, salt or sugar content and mainly the temperature at

which the product is consumed, cooled or after warming (Vilgis, 2012).

In Table 1 were given in details all sensory attributes to the test products. The references that were used to compare the final product were also described.

Table 1. Sensory attributes and definitions

Attributes	Characteristics	Definitions	References
Appearance	Colour	Light to dark yellow in daylight	Paper with standard yellow colour
	Transparency	Lack of transparency (ability of products to omit light falling on them)	Distilled water
Smell	Rose	The smell associated with rose	Rose hydrosol "Ikarov"
Taste	Sweet	Taste associated with the taste of sucrose	An aqueous solution of sucrose with concentration of 20%
	Bitter	Taste associated with the taste of caffeine	An aqueous solution of caffeine at a concentration of 0,0042%
Flavour	Rose	The "trigeminal senses"	Rose hydrosol "Ikarov"
Aftertaste	Sweet	Intensity of the lingering sensations of sweet taste	An aqueous solution of sucrose with concentration of 20%
	Bitter	Intensity of the lingering sensations of bitter taste	An aqueous solution of caffeine at a concentration of 0,0042%
Texture	Firmness	The force required to attain a given deformation during the mastication	Jelly Sweets
	Elasticity	Property of the product to restore its original shape after exerted force	Jelly Sweets
	Adhesiveness	The force required to remove the food adheres to a specific surface	Jelly Sweets

Table 2. Sensory characteristics of appearance of alginate microspheres samples

Code	Samples	Appearance	
		Colour	Transparency
A	2% alginate + 3% inulin TEX	92,3±15,5 ^a	74,7±10,1 ^a
B	6% inulin TEX + 4% alginate	60,9±8,9 ^b	75,7±13,0 ^a
C	2% alginate + 1% xanthan gum	59,0±10,7 ^b	74,7±10,5 ^a
D	2% alginate	57,4±6,1 ^c	75,0±11,2 ^a
E	4% alginate	66,1±16,8 ^d	66,6±10,9 ^b
F	0.5% κ-carrageenan + 2% alginate	55,3±9,3 ^c	87,1±19,2 ^c
G	0,5% guar gum + 2%alginate	73,4±16,2 ^c	98,1±8,9 ^d
H	2% alginate + 6% inulin HP	54,7±11,8 ^c	75,6±17,6 ^a
I	0,5% pectin + 2% alginate	47,1±14,2 ^f	90,7±16,5 ^c

Note: Values are reported as mean ±SD, significant at p < 0.05

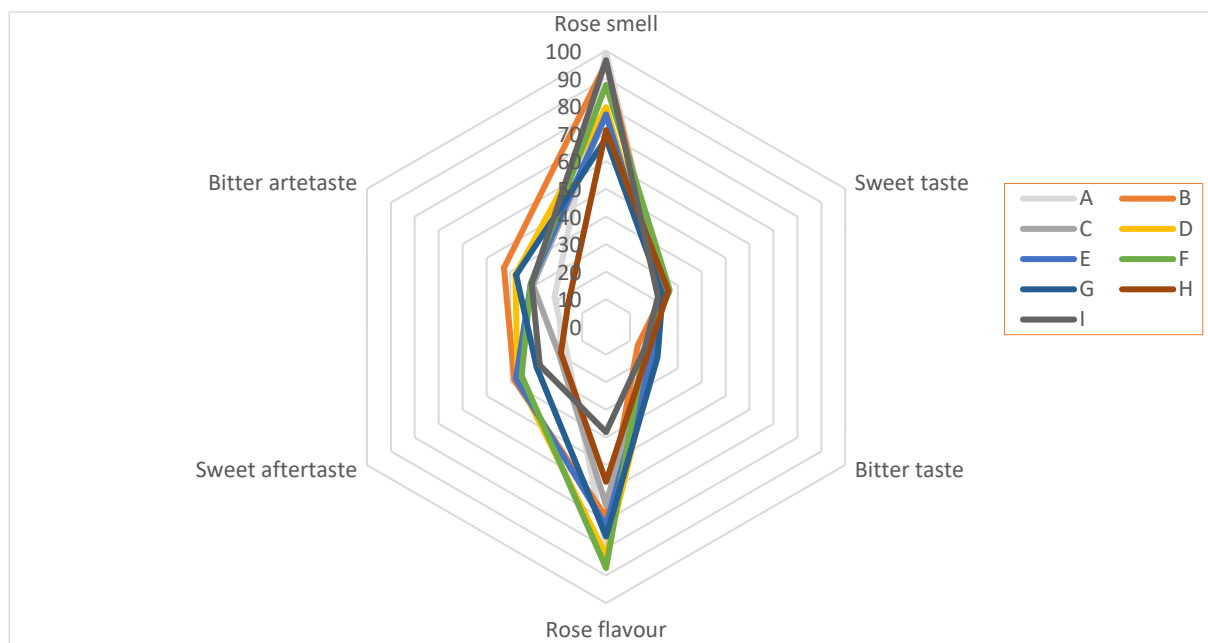


Fig.1. Sensory profile of alginate microspheres samples

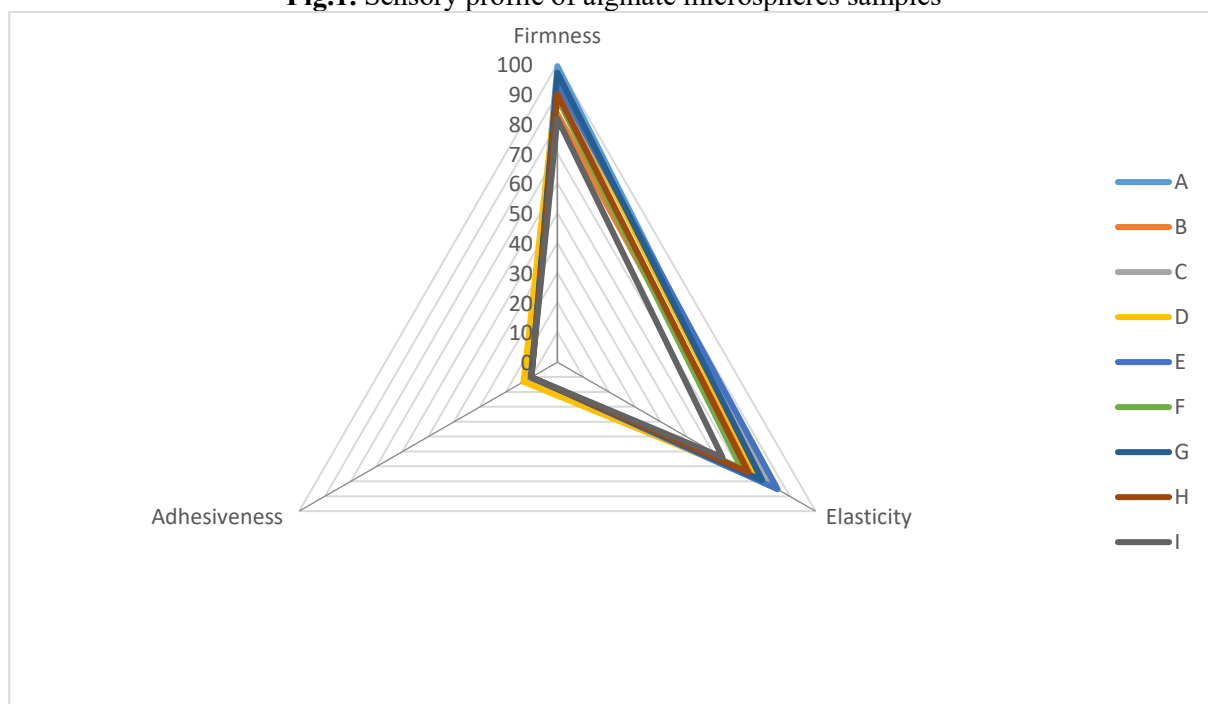


Fig.2. Texture profile of alginate microspheres samples

Colour is the most important attribute of the appearance of any food, it is an element of the first perception of the product, it is directly related to other qualities of the food. Colour had a great effect on the food acceptance (Dias et al., 2012).

Experimental data from sensory evaluation of alginate microspheres samples (table 2) suggests that addition of selected hydrocolloids can affect the color. The samples shown the statistically

significant differences in the shades of yellow colour and the degree of the transparency. The microspheres with 0,5% pectin + 2% alginate are lighter, but most opaque of all samples. The darker yellow shade is represented in the microspheres with 2% alginate + 3% inulin. However, these samples are translucent with average values of transparency about $74,7 \pm 10,1$.

The most pronounced masking effect on the smell of a rose was found on the alginate micro-

sphere with the addition of 0,5% guar gum. A similar slightly weaker effect showed the samples with 2 % alginate and 6% inulin HP. The scent of a rose is most strongly perceived in the samples with different compositions between inulin and alginate.

Taste is a sensation provoked by the chemical composition of food and is crucial for the sensory evaluation of food (Bradbury, 2004).

Aftertaste may be described as the lingering sensations of flavours or tastes and it remains in the mouth after the product is swallowed or expectorated (Schlossareck & Ross, 2020).

No statistical differences in the perception of the taste profile of the microspheres were found. All hydrocolloids lead to the lower perception of sweet taste compared to the reference solution of 20% sucrose. The low values of bitter taste and aftertaste can be explained by the presence of calcium chloride in the composition of the alginate beads and presence of rose hydrosol, which is rich of bitter taste polyphenols (Fig 1).

Firmness, also known as hardness, is a significant sensorial parameter used to evaluate the mouthfeel and it is defined as the force required to attain a given deformation (Yusof et al., 2019).

Elasticity is the property of the product to restore its original shape after exerted force. Adhesiveness can be described as a force needed to remove the material that adheres to a surface, for example the mouth or teeth (Guiné et al., 2020).

The data from our analysis show that microspheres with the lowest elasticity are with 0,5% pectin +2% alginate (Fig 2). All microspheres show extremely low adhesion values, with no statistically significant difference between them. Firmness is most pronounced in the samples involving alginate and inulin and alginate and guar gum (Fig. 2). In our previous study was found after texture analysis that the addition of inulin in the concentration 3% and 6% resulted in the increase of the rupture force by 34% and led to improvement in plasticizing effect of alginate beads with rose hydrosol (Petrova et al., 2021).

The role of the consumer remains essential for success in the market of this product, so it is recommended to conduct additional studies on consumer acceptance of products containing alginates microspheres.

Conclusion

The current study demonstrated sensory evaluation of Ca (II)-alginate beads containing rosehy-

drosol and different hydrocolloids. The beads with rose hydrosol and 2% alginate + 6% inulin demonstrated the lowest bitter taste, better rose smell, good firmness and elasticity. The described procedure for alginate bead preparation can be used for the design of new foods with desirable and attractive sensory properties, enriched with prebiotics as inulin and fibers, as pectin.

References

1. Abidi, S., Zaidi, A., Azhar, I., Sultan, R., Mahmood, Z., 2019 "Assessment of Rose Water and Evaluation of Antioxidant and Anti-inflammatory Properties of a Rose Water Based Cream Formulation", *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(1), pp. 43 - 48
2. Aguirre Calvo, T.R.A., Santagapita, P.R., Perullini, M., 2019 "Functional and structural effects of hydrocolloids on Ca (II)-alginate beads containing bioactive compounds extracted from beetroot", *Food Science and Technology*, 111, pp. 520 - 526
3. Alkhatib, H., Mohameda, F., Akkawi, M. E., Alfatama, M., Chatterjee, B., Doolaanea, A. A., 2020 "Microencapsulation of black seed oil in alginate beads for stability and taste masking", *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60, pp. 102030
4. Arriola, N. D. A., Medeiros, P. M., Prudencio, E. S., Müller, C. M. O., Amboni, R.D. M.C., 2016 "Encapsulation of aqueous leaf extract of Stevia rebaudiana Bertoni with sodium alginate and its impact on phenolic content", *Food Bioscience*, 13, pp. 32 - 40
5. Bayhan, G., Gumus, T., Alan B., Savas, I. K., Cam, S. A., Sahin, E. A., Arslan, S. O., 2020 "Influence of *Rosa damascene* hydrosol on skin flora (contact culture) after hand-rubbing" *GMS Hygiene and Infection Control*, 15, ISSN 2196-5226, pp 1- 6
6. Boskabady, M. H., Shafei, M.N, Saberi, Z., Amini S. 2011 "Pharmacological Effects of *Rosa Damascen*", *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 14 (4), pp. 295 - 307
7. Bradbury, J., 2004 "Taste Perception: Cracking the Code. PLoS Biol 2(3): e64.
8. D'Amato, S., Serio, A., López, C. C., Paparella, A., 2018 "Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications", *Food Control*, 86, pp. 126 – 137.
9. Dias, N. A. A., Lara, S. B., Miranda, L. S., Pires, I. S. C., Pires, C. V., Halboth, N. V., 2012 "Influence of color on acceptance and identifica-

tion of flavor of foods by adults”, *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, 32(2), pp. 296 - 301

10. Guiné, R. P. F., Correia, P. M. R., Reis, C., Florença, S. G., 2020 “Evaluation of texture in jelly gums incorporating berries and aromatic plants”, *Open Agriculture*, 5, pp. 450 - 461

11. Labadie, C., Ginies, C., Guinebretiere, M. H., Renard, C. M. G. C., Cerutti, C., Carlin, F., 2015 “Hydrosols of orange blossom (*Citrus aurantium*), and rose flower (*Rosa damascena* and *Rosa centifolia*) support the growth of a heterogeneous spoilage microbiota”, *Food Research International*, 76, pp. 576 - 586

12. Petrova, I., Petkova, N., Ivanov, Iv., 2016 “Edible Flowers – Valuable Source of Antioxidants in Human Nutrition”, *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8 (4), pp. 604 - 610

13. Petrova, I., Petkova, N., Slavchev, A., Petrova, T., 2021 “Structural effects of selected hydrocolloids on Ca (II)-alginate beads containing hydrosol from *Rosa damascena* Mill”, *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 1031, 012106.

14. Schlossareck, C., & Ross, C.F. 2020 “Consumer sensory evaluation of aftertaste intensity and liking of spicy paneer cheese”, *International Journal of Food Science and Technology*, 55, pp. 2710 – 2718

15. Tumbarski, Y., Petkova, N., Todorova, M., Ivanov, I., Deseva, I., Mihaylova, D., Ibrahim, S.A. 2020 “Effects of pectin-based edible coatings containing a bacteriocin of *Bacillus methylotrophicus* BM47 on the quality and storage life of fresh blackberries” *Italian Journal of Food Science*, 32, pp. 420–437.

16. Vilgis, A. T., 2012 “Hydrocolloids between soft matter and taste: Culinary polymer physics”, *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 1, pp. 46 - 53

17. Xiao, Y., He, J., Zeng, J., Yuan, X., Z., Zhang, Wang, B., 2020 “Application of citronella and rose hydrosols reduced enzymatic browning of fresh-cut taro”, *Journal of Food Biochemistry*, DOI: 10.1111/jfbc.13283, pp.1-10

18. Yassa, N., Masoomi F., Rohani Rankouhi S.E., Hadjiakhoondi A. 2009 “Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Extract and Essential oil of *Rosa damascena* from Iran, Population of Guilan”, *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17 (3), pp. 175 - 180

19. Yusof, N., Jaswir, I., Jamal, P., Saedi, J. M., 2019 “Texture Profile Analysis (TPA) of the jelly dessert prepared from halal gelatin extracted using High Pressure Processing (HPP)”, *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 15 (4), pp. 604 – 608

Ivanka Petrova

University of Food Technologies,
Department of Catering and Tourism
26 Maritza Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria
e-mail: i_petrova@uft-plovdiv.bg

Nadezhda Petkova

University of Food Technologies,
Department of Organic Chemistry and Inorganic Chemistry
26 Maritza Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria
e-mail: petkovanadejda@abv.bg



БИОДЕГРАДАЦИЯ НА ФЕНОЛНИ СЪЕДИНЕНИЯ ОТ *TRAMETES VERSICOLOR*

Ралица Колева, Мария Бръзкова, Галена Ангелова

BIODEGRADATION OF PHENOLIC COMPOUNDS BY *TRAMETES VERSICOLOR*

Ralitz Koleva, Mariya Brazkova, Galena Angelova

ABSTRACT: Phenol and its derivatives are persistent toxic pollutants and mainly because of their wide usage as intermediates in various industrial processes they are abundant in the environment. The ability of the white- and brown wood decaying fungi to mineralize such compounds has drawn research interest in the last years. *Trametes versicolor*, a white-rot basidiomycete, used in this research demonstrated remarkable ability not only of growing on phenolic compounds and utilizing them, but fully removing them from the growth medium. Phenol, catechol, resorcinol, hydroquinone, *p*-cresol and *o*-nitrophenol were used as substrates for the fungal growth. The degradation of binary mixtures of phenol and phenolic compounds were also examined. The strain was able to degrade mixtures of phenolic compounds as well, thus proving its applicability in industrial wastewaters treatment processes.

Key words: Biodegradation, phenol, phenolic compounds, *Trametes versicolor*

Introduction

Phenolic compounds are some of the most abundant environmental pollutants. They are present in the wastewaters of various industrial and agricultural processes, for example pulp and paper industry, distilleries, wineries, pesticides and disinfectants production (Raj et al., 2014; Aknu et al., 2017). Phenol and its derivatives are persistent and toxic aromatic compounds which possess mutagenic, cancerogenic, allergic and teratogenic properties towards living organisms even at extremely low concentrations (Gami et al., 2014). The benzene ring in the molecule of the phenolic compounds is the main reason for their rigidity towards biodegradation techniques. Their stability allows the accumulation and transportation in tissues prior its excretion by metabolic pathways outside the body. The accumulation ability of phenol is an issue mainly due to its toxicity and the problem with its degradation is upcoming because of its usage as intermediate in many industrial processes (Wasi et al., 2013, Aknu et al., 2017).

The constant growth of Earth's population, the urbanization and the development of the industry leads to increased concentration of pollutants in the industrial wastewaters, especially compounds with phenolic origin. Research in the field shows high phenolic concentrations in water sources as well as heavy metals and pesti-

cides. The prognosis is that by 2025 more than 65% of Earth's population will be living in countries with serious water limitations (Azizullah et al., 2011).

Bioremediation is defined as transformation of complex compounds by biological objects. Mainly, this process includes three sub-processes:

- Transformation or slight change in the configuration of the molecule
- Fragmentation or decomposition of the molecule to simpler compounds
- Mineralization or transformation of the complex compound to water, carbon dioxide, methane, hydrogen, etc.

Bioremediation is preferred method for treatment of domestic wastes, heavy metals, toxic chemical compounds and radioactive waste. The process is used as method for monitoring the natural degradation processes of pollutants for specified amount of time (bioattenuation). The additional stimulation of the natural occurring xenobiotic-degrading microorganism with addition of nutrients is also known as biostimulation. Biodegradation or the biological removal is a process which involves aerobic, mainly indigenous microorganisms and commonly reaches the mineralization of toxic compounds to inorganic forms (Vasques-Murrieta et al., 2016).

Recently the researcher's interests are focused on the white and brown rot wood decay fungi as biodegradation agent. The available data demonstrates the perceptivities for application of those fungi for degradation of phenolic compounds (Kietwanboot et al., 2020; Stoilova et al., 2009; Yuan et al., 2021). They prove the necessity of investigation and selection of newly isolated strains, preferably from contaminated areas which to be used as agents for detoxification of the environment.

The aim of this study was to evaluate the ability of *Trametes versicolor* 8939 to grow on phenol and its derivatives as single source of carbon and on mixtures of phenolic compounds.

Materials and methods

1. Chemicals

All used chemical were analytical grade unless otherwise stated. Sucrose, yeast extract and salts for the media were purchased from Scharlau, Spain. Phenol (99%), catechol (99%), resorcinole (99%), hydroquinone (99%), p-cresol (99%) and o-nitrophenol (98%) were purchased from Sigma-Aldrich, Germany.

2. Microorganism and cultivation conditions

Trametes versicolor was purchased from the National Bank of Industrial Microorganisms and Cell Cultures of Bulgaria under № 8939. The culture was grown on malt agar slots for 7 days and then stored at 4°C.

Liquid Czapek-Dox medium containing (in g/dm³) 30 g sucrose, 5 g yeast extract, 2g NaNO₃, 1g K₂HPO₄, 0.5g MgSO₄ x 7H₂O, 0.5g KCl, 0.01g FeSO₄ x 7H₂O with pH 6.5 prior sterilization was used for production of vegetative inoculum. After 7 days of cultivation the pellets were collected aseptically and saved under saline solution until further use.

3. Biodegradation of phenolic compounds

The biodegradation process was carried out on Czapek-Dox medium as given above without sucrose and yeast extract with pH prior sterilization 6.5.

The medium (50 cm³) was transferred into Erlenmayer flask (300 cm³) and sterilized at 121°C for 20 min. Each phenolic compound was added aseptically with final concentration 500 ppm. When the biodegradation of phenolic mixtures

was examined the applied concentrations were as follows:

- in the two-component mixtures 300 ppm for phenol and 200 ppm for the other compounds (final concentration of phenolic compounds 500 ppm)
- in the four component mixture 200 ppm for phenol and 100 ppm for resorcinol, p-cresol and o-nitrophenol (final concentration of phenolic compounds 500 ppm)

The flasks were then inoculated with fungal pellets (0.01±0.002 g/dm³ dry weight) and placed on rotary shaker at 220 rpm and 28°C. The duration of the cultivation depended on the biodegradation rate. Samples were taken every 24 hours.

4. Phenol determination

Residual phenol concentration was determined after filtration of the samples. Properly diluted sample was added to mixture of 0.5 cm³ Folin-Ciocalteu reagent and 2.0 cm³ 10% Na₂CO₃ solution. After 10 min 1 cm³ from the mixture was taken for absorbance measurement at 680 nm.

The phenolic compounds concentrations were determined using C₁₈ 10µm Bondapac column (3.9 mm x 300 mm) and UV detector (Waters). The mobile phase was methanol:water (70:30) with constant flow of 2 cm³/min at 22°C. The sample volume was 20 µL and each sample was ran in triplicate.

5. Biomass dry weight determination

The dry weight of the biomass was analyzed on a RADWAG 50/NH moisture analyzer (Poland) at 105°C until constant weight.

Results and discussion

As part of the *Agaricomycetes* class the strain *Trametes versicolor* 8939 possess unique enzyme systems which allow the biodegradation of toxic phenolic and polycyclic pollutants. The lignin-degrading enzyme system together with the phenol hydroxylase and *cis,cis*-muconate lactonase are the key enzymes in transformation and degradation processes. It has been demonstrated that the fungi metabolize aromatic compounds using the orthofusion pathway (Alexieva et al., 2007; Yemendzhiev et al., 2008).

Phenol was added as single carbon source at final concentration 500 ppm. The flasks were then inoculated with 0.01±0.002 g/dm³ (dry

weight) with pellets. All experiments were performed in triplicate. The obtained data (Fig.1) showed that the strain grows on phenol as single carbon source with biomass gain of 5.5 fold until the 72 h and decrease afterwards due to culture lysis. The phenol concentration on the other hand drops significantly between 24 and 48 h of the process with 270 ppm reaching 30% of the initial phenol concentration. Full degradation of the compound was registered at 144 h.

The phenol utilization of *Trametes* sp. was demonstrated previously by Yemendzhiev et al., (2008) where the used strain *T. versicolor* 1 was able as well to fully metabolize 0.5 g/dm³ phenol for 6 days. In their research until the 120 h the phenol concentration was over 50% of the initial.

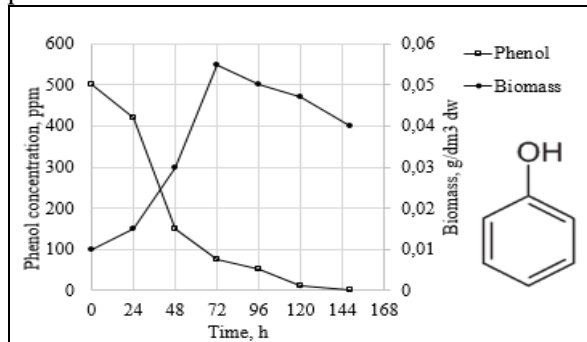


Fig. 1 Growth of *T. versicolor* 8939 on phenol as single carbon source

Catechol is used as monomer in the production of pesticides or precursor in the manufacturing of fine chemicals such as perfumes and pharmaceuticals. In the conducted experiment catechol was used as single carbon source for the *T. versicolor* 8939 growth with final concentration of 500 ppm. The flasks were inoculated with 0.01±0.002 g/dm³ (dry weight) fungal pellets. All experiments were performed in triplicate.

T. versicolor 8939 showed ability of full degradation of catechol in 96 h (Fig. 2). During the experiment the biomass concentration was only increasing which means that the culture degraded the compound during its exponential growth phase.

The fungal strain *Aspergillus awamori* NRRL 3112 showed remarkable catechol-degrading capacity being able to metabolize 3 g/dm³ in 5 days (Stoilova et al., 2006). The strain used in our research was able to fully degrade catechol for 96 h, with most intensive degradation between the 24 and 48 h with 66% degradation after 48 h.

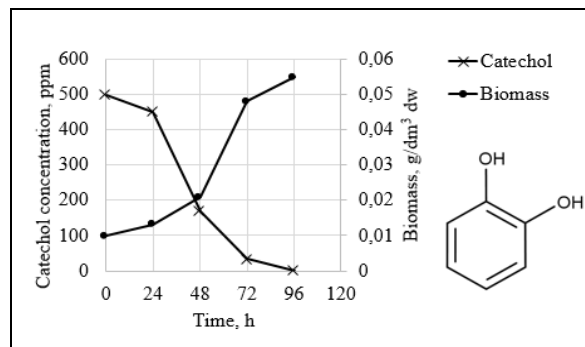


Fig. 2 Growth of *T. versicolor* 8939 on catechol as single carbon source

Resorcinol is widely used as precursor in the manufacturing of pharmaceuticals, azodyes, anti-septics and disinfectants. In the literature there are several researches by different teams regarding resorcinol degradation where primary bacteria were used as biological agent. *Pseudomonas* sp. was able to degrade 37.12% resorcinol in 12 days (Hajizadeh et al., 2016). Sharma et al. (2010) used active sludge in sequential batch reactor for resorcinol biodegradation. The team achieved 85% efficiency of the resorcinol degradation with initial concentration of 50 ppm.

Compared with bacteria, fungi demonstrate excellent biodegradation abilities. The experimental flasks contained 500 ppm final concentration of resorcinol. Each flask was inoculated with 0.01±0.002 g/dm³ (dry weight) pellets. All experiments were performed in triplicate. *T. versicolor* 8939 was able to fully degrade resorcinol in 120 h (Fig. 3). The registered biomass gain was 5.9 fold until 72 h followed by decrease.

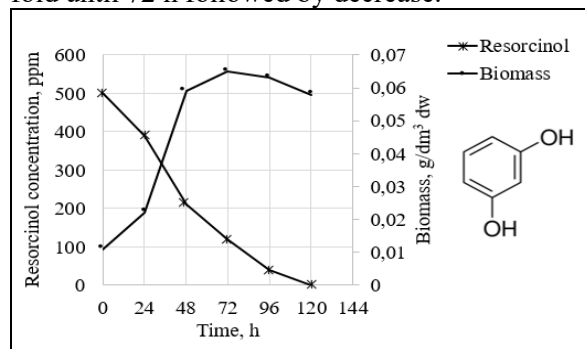


Fig. 3. Growth of *T. versicolor* 8939 on resorcinol as single carbon source

Hydroquinone is the main component in the photographic developers. It could be used in medicines for local skin stains treatment. The compound is also used as precursor in the production of herbicides, antioxidants and rubber. Hydroquinone is often product of the degradation of other phenolic compounds. The metabolism of

the benzaldehyde and benzoic acid by the brown-rot basidiomycetes *Tyromyces* sp. and *Gloeophyllum* sp. results in hydroquinone, which was metabolized afterwards (Engiuta and Leitão, 2013).

In our research 0.01 ± 0.002 g/dm³ (dry weight) biomass was used for inoculation of three flasks containing 500 ppm final concentration of hydroquinone each. The data (Fig. 4) showed that *T. versicolor* 8939 possess the ability of using hydroquinone as sole source of carbon. There was 5.8 fold gain of biomass until 72 h. The culture fully degraded hydroquinone for 96 h. Kamada et al. (2002) demonstrated that hydroquinone was metabolized with no formation of other products. The compound was registered in combined phenol and glucose cultures of *Penicillium chrysogenum* where during the phenol metabolism hydroquinone was metabolized in the exponential phase of the culture growth, and after 80 h no traces of the pollutant were found (Leitão et al., 2007).

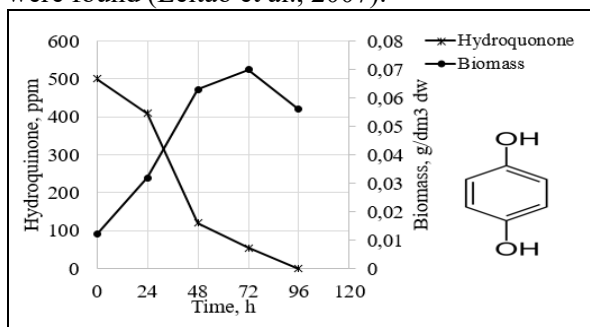


Fig. 4. Growth of *T. versicolor* 8939 on hydroquinone as single carbon source

Cresols are used as solvents for various chemicals, as disinfectants and insecticides, in permanent markers. They are one of the most toxic compounds for the environment.

The ability of white-rot fungi to remove a variety of toxic pollutants thus detoxifying wastewaters has been an object of scientific interest in the recent years. This process was found to be dependent on fungal growth, enzyme production and the presence of some inducers (Ryan et al., 2007). In a study from 2010 Alexieva's research team demonstrated the ability of *Trametes versicolor* strain 1 to preferably degrade *p*-cresol instead of *o*- or *m*-cresol (Alexieva et al., 2010).

In the present study *p*-cresol was used as single carbon source in final concentration of 500 ppm. All experimental flasks were inoculated with 0.01 ± 0.002 g/dm³ (dry weight) biomass in pellet form. Samples were taken every 24 h. The

collected data (Fig. 5) showed the ability of the strain to grow on *p*-cresol in correlation with previously reported experiments (Alexieva et al., 2010).

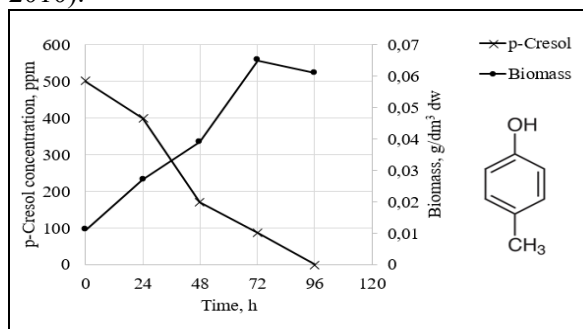


Fig. 5. Growth of *T. versicolor* 8939 on *p*-cresol as single carbon source

Strain *T. versicolor* 8939 was able to fully degrade *p*-cresol for 96 h at the incubation conditions. The biomass gain for that time was 5.5 fold.

o-Nitrophenol (*o*-NP) is a phenol derivative which is used widely in the manufacturing of agrochemicals, fertilizers and pesticides. There is limited information about the toxicological profile of the compound and it is not yet fully tested for genotoxicity (WHO, 2010).

The final concentration of *o*-NP in the experimental flasks was 500 ppm. The biodegradation process was carried out on a rotary shaker at 220 rpm and 28°C. Samples were taken every 24 h and analysed for *o*-NP residual concentration and biomass concentration (Fig. 6).

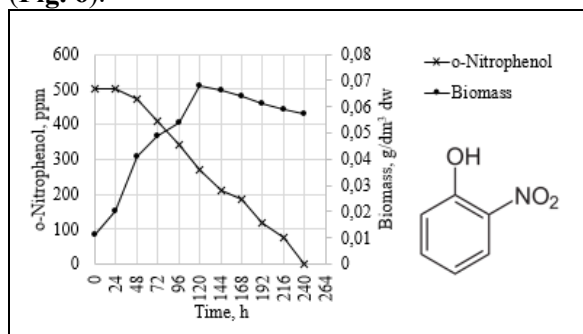


Fig. 6. Growth of *T. versicolor* 8939 on *o*-nitrophenol as single carbon source

Unlike the other phenolic compounds *o*-NP seems more difficult to degrade by *T. versicolor* 8939. Full degradation was obtained after 240 h at the inoculation conditions. Within that time the biomass concentration increased 6.2 fold for 120 hours followed by slight decreasing due to culture's lysis.

A consortium of eight bacterial cultures was used for degradation of mononitrophenols isomers where full degradation of *o*-NP was not accomplished. Several intermediates were determined, such as cathecol, *cis,cis*-muconic acid, maleyacetate and β -keto adipate indicating a degradation pattern following the Zeyer model (Basheer et al., 2007).

Further in our study the degradation process of two-component mixtures of phenolic compounds was examined. Mixture 1 (M1) contained 300 ppm phenol and 200 ppm resorcinol, mixture 2 (M2) contained 300 ppm phenol and 200 ppm *p*-cresol and mixture 3 (M3) contained 300 ppm phenol and 200 ppm *o*-NP.

The full degradation of M1 components was achieved in 72 h (Fig. 7). In this experiment resorcinol was not present in the samples after 48 h incubation, while phenol was completely degraded after 72 h.

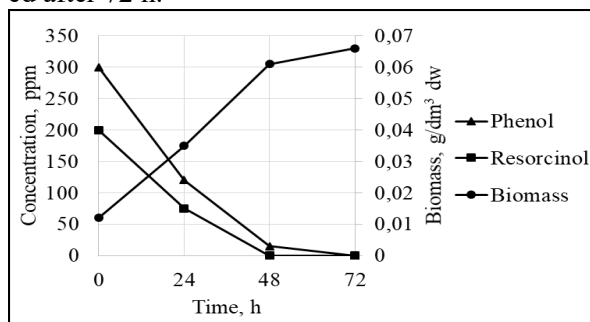


Fig. 7. Growth of *T. versicolor* 8939 on M1 as carbon source

In a similar research Yemendzhiev's group used *Aspergillus awamori* NRRL 3112 for biodegradation of mixture of phenol and resorcinol with final concentration 300 ppm and 200 ppm, respectively. The data showed faster phenol degradation in the beginning of the process as the rate of resorcinol degradation increased in the second half of the process (Yemendzhiev et al., 2010). Those results differ from the ones obtained for *T. versicolor* 8939 where the degradation of the components of M1 was going with similar speed for both of them. The full degradation of M1 was obtained after 72 h at the incubation conditions. Within that time the biomass increase was 5.5 fold.

The degradation of M2 was investigated during 6-day incubation process on a rotary shaker at 28°C. The degradation of both components started simultaneous. Complete degradation of both substrates was accomplished after 120 h. *p*-Cresol was absent from the samples at 48 h but residual phenol concentration was detected until

the 96 h (Fig. 8). The influence of phenol over the *p*-cresol degradation was significant. When used as sole energy source (Fig. 5) *p*-cresol was utilized from the fungal strain for 96 h, while in M2 the degradation speed was higher.

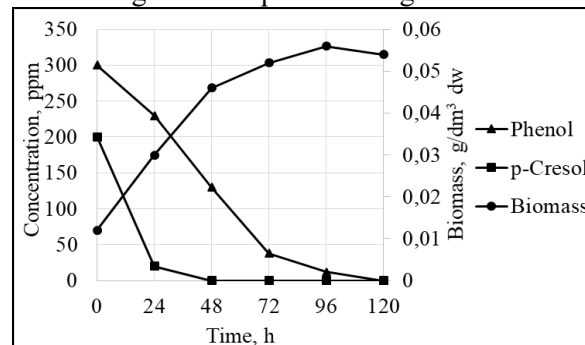


Fig. 8. Growth of *T. versicolor* 8939 on M2 as carbon source

Results from similar degradation experiments using bacterial, yeast and fungal strains capable of degrade mixtures of phenolic compounds are reported by other authors. The ability of *T. versicolor* strain 1 to degrade similar mixtures of phenol and *p*-cresol is analogous to the results obtained in our experiment although *T. versicolor* strain 1 degraded both compounds for shorter time. In both investigations phenol degradation was slower than *p*-cresol's (Alexieva et al., 2010). This might be due to the fact that the both strains possess similar enzyme activity thus similar modes of degradation.

The binary M3 mixture was degraded by the fungal strain for 7 days (Fig. 9). Phenol was fully degraded within 48 h while *o*-NP was detected in the mixture until the 168 h.

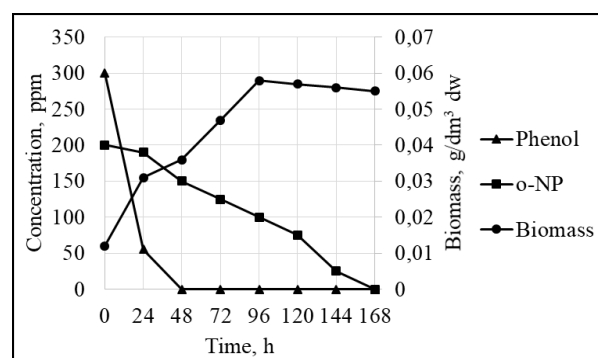


Fig. 9. Growth of *T. versicolor* 8939 on M3 as carbon source

The lower phenol concentration in the mixtures benefits the higher degradation rate of the compound despite the fact that the phenolic compounds concentration in total is 500 ppm. There is a relation between the composition of

the mixtures and the degradation rate of the compounds. When *T. versicolor* 8939 was grown on M2 *p*-cresol was preferably degraded, while on M3, despite its high concentration, phenol was degraded first. When used as sole carbon source phenol was degraded for 144 h (Fig. 1) while in M3 the degradation time was shortened dramatically to 48h. Time needed for full elimination of *o*-NP from the M3 also decreased from 240 h (when used as single carbon source) to 168 h.

The simultaneous presence of various phenolic compounds in effluents is the main reason for investigation of mixture degradation processes. The removal of one of the components of the mixture is often dependent of the mixture composition.

A mixture of four phenolic compounds with total concentration of 500 ppm (phenol – 200, resorcinol – 100, *p*-cresol – 100 and *o*-NP -100) was used as medium for the growth of *T. versicolor* 8939. The residual concentration of each component as well as biomass concentration were monitored every 24 h. The results are presented on Fig. 10.

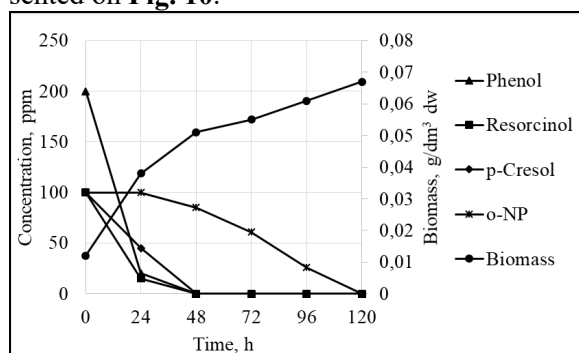


Fig. 10. Growth of *T. versicolor* 8939 on medium containing mixture of phenol, resorcinol, *p*-cresol and *o*-NP as carbon source

Complete biodegradation of the investigated mixture was achieved after 120 h and during that time the biomass concentration was growing constantly proving that the culture was in exponential growth phase. Phenol, resorcinol and *p*-cresol were degraded for 48 h, with over 80% degradation for phenol and resorcinol at 24h. *o*-NP had the slowest degradation speed, but yet the full degradation was obtained two times faster with comparison to the degradation of the compound as single carbon source. In this experiment the preferred substrates for fungal growth were phenol, resorcinol and *p*-cresol.

The capacity of *T. versicolor* strain 1 for degradation of similar mixture was investigated by Yemendzhiev et al., (2011). The culture complete-

ly assimilated all compounds in 144 h, where the *o*-NP degradation was with slowest rate, especially in the first 24-48 h (Yemendzhiev et al., 2011).

Conclusion

Phenolic compounds in final concentration 500 ppm were used as energy source for the growth of *Trametes versicolor* NBIMCC 8939. When single component growth media were used the strain demonstrated the ability to assimilate all used compounds. Catechol, hydroquinone and *p*-cresol were utilized for 96 h each, for resorcinol the degradation time was 120 h, 144h for phenol. The longest biodegradation process was observed when *o*-NP was used as sole carbon source with the highest biomass concentration registered. When binary mixtures were tested the results showed shortened time for biodegradation of mixtures monomers despite that the total concentration of phenolic compounds remained unchanged. The examination of biodegradation ability of the strain over four-component mixture demonstrated even briefer times. There is a relation between the composition of the mixtures and the degradation rate of the compounds.

The complete utilization of the phenolic compounds indicates the potential of *Trametes versicolor* 8939 for its employment in industrial technologies for purification and detoxification of polluted areas and effluents.

Acknowledgements

This work was supported by the Bulgarian Ministry of Education and Science under the National Research Programme "Young scientists and postdoctoral students", approved by DCM # 577 / 17.08.2018".

References

- Aknu W., Mamo M., Govender P. 2017. Phenolic Compounds in Water: Sources, Reactivity, Toxicity and Treatment Methods. In: Soto-Hernandez (Ed.) *Phenolic compounds: Natural sources, Importance and Applications*, 17, pp. 419-443
- Alexieva A., Yemendzhiev H., Zlateva P. 2010. Cresols utilization by *Trametes versicolor* and substrate interaction in the mixture with phenol. *Biodegradation*, 21, 625-635
- Alexieva Z., Gerginova M., Zlateva P. et al. 2004. Comparison of growth kinetics and phenol metabolizing enzymes of *Trichosporon cutaneum* R57 and mutants with modiWed degradation abilities. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, pp. 242-247

- Azizullah A., Khattak M.N.K., Ritcher P. et al. 2011. Water pollution in Pakistan and its impact on public health: A review. *Environment International*, 37, pp. 479-497
- Engiuta F. J., Leitão A. L. 2013. Hydroquinone: Environmental Pollution, Toxicity, and Microbial Answers. *BioMed Research International*, 542168
- Gami A.A., Shukor M.Y., Khalil K.A. et al. 2014. Phenol and its toxicity. *Journal of environmental microbiology and toxicology*, 2 (1), pp 11-24
- Hajizadeh N., Shirzad N., Farzi A. et al. 2016. Biodegradation of resorcinol by *Pseudomonas* sp. *Journal of Coastal Life Medicine*, 12, pp. 932-934
- Kamada F., Abe S., Hiratsuka N., Wariishi H. et al. 2002. Mineralization of aromatic compounds by brown-rot basidiomycetes – mechanisms involved in initial attack on the aromatic ring. *Microbiology*, 148, 1939-1946
- Kietwanboot A., Chaiprapat S., Müller R. et al. 2020. Biodegradation of phenolic compounds present in palm oil mill effluent as single and mixed substrates for *Trametes hirsute* AK04. *Journal of environmental science and health, Part A*, 1-14
- Leitão A. L., Duarte M.P., Santos Oliveira J. 2007. Degradation of phenol by a halotolerant strain of *Penicillium chrysogenum*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59, 220-225
- Raj, A., Kumar, S., Haq, I. et al. 2014. Bioremediation and Toxicity Reduction in Pulp and Paper Mill Effluent by Newly Isolated Ligninolytic *Parmibacillus* sp. *Ecological Engineering*, 71, pp. 355–362.
- Ryan D., Leukes W., Burton S. 2007. Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology*, 98, 579-587
- Sharma V., Srivastava V.C., Kushwaha J.P. et al. 2010. Studies on biodegradation of resorcinol in sequential batch reactor. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64, pp. 764-768
- Stoilova I., Krastanov A., Stanchev V. et al. 2006. Biodegradation of high amounts of phenol, catechol, 2,4-diclorophenol and 2,6-domethoxyphenol by *Aspergillus awamori* cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, pp. 1036-1041
- Stoilova I., Krastanov A., Yemendzhiev H. et al. 2009. Degradation of phenols by *Fusarium moniliforme*. *Current Research topics in Applied Microbiology and Microbial biotechnology*, pp. 203-207
- Vasques-Murrieta M.S., Hernandez O. J., Cruz-Maya J.A. et al. 2016. Approaches for Removal of PAHs in Soils: Bioaugmentation, Biostimulation and Bioattenuation. In: Larramendy M. (Ed.) *Soil Contamination: Current Consequences and Further Solutions*, 17, 329-342
- Wasi S., Tabrez S., and Ahmad M. 2013. Toxicological effect of major environmental pollutants: An overview. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185, 2585–2593
- World Health Organization/International Programme on Chemical Safety. 2010 Concise International Chemical Assessment Document No. 20. Mononitrophenols p.4-5
- Yemendzhiev H., Gerginova M., Krastanov A. 2008. Growth of *Trametes versicolor* on phenol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, pp. 1309-1312
- Yemendzhiev H., Terziyska A., Manasiev Y. et al. 2011. Degradation of mixed aromatic pollutants by *Trametes versicolor* strain 1. *Biotechnology and biotechnological equipment*, 25, Suppl.39-40
- Yemendzhiev H., Zlateva P., Terziyska A. et al. 2010. Phenol and resorcinol mixture degradation by *Aspergillus awamori* strain. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, 63, pp. 1577-1582
- Yuan H.S., Sheng L., Yu W.Z. et al. 2021. Enzyme degradation mechanism of white rot fungi and its research progress on Refractory Wastewater. *E3S Web of conferences*, 237, 01002

Ralitzka Koleva
University "Prof dr Asen Zlatarov"
Department of Chemical technologies
1, Yakim Yakimov Blvd., Burgas, Bulgaria
koleva.ral@gmail.com

Mariya Brazkova
University of Food Technologies
Department of Biotechnology
26, Maritza Blvd., Plovdiv, Bulgaria
mbrazkova@uht-plovdiv.bg

Galena Angelova
University of Food Technologies
Department of Biotechnology
26, Maritza Blvd., Plovdiv, Bulgaria
g_angelova@uht-plovdiv.bg



ПРЕВРЪЩАНЕ НА ХИМИЯТА В НАУКА. ЧАСТ ПЪРВА

Красимира Станчева

THE TRANSFORMATION OF CHEMISTRY INTO SCIENCE. FIRST PART

Krasimira Stancheva

ABSTRACT: In the period of 16th-17th century the progress of chemistry is due to Galilei, Descartes, Newton, Torricelli, Pascal, Hooke, Bayle, Marriott and many students. In Western Europe on the arena of public life and political struggle a new class appeared - the bourgeoisie. Atomic-corpuscular studies emerge. Scientific revolution began.

Key words: 16 th - 17th century. Atomic-corpuscular studies, barometer, mechanics, gases laws.

Introduction

In the period 17-20 century the development of chemistry is divided into **four main periods**:

First period - the emergence of Atomic-corpuscular studies:

16th century – Galileo Galilei

17th century – Rene Descartes

1661 г. - Boyle, Newton.

Second period - creation and validation of the Atomic-molecular theory:

1808

France - Gay Lussac, Ampere, Gerard

Italy - Avogadro, Canicaro

Sweden - Berzelius

England - Faraday.

1861

Russia - Butlerov, Mendeleev

The Netherlands - Vant Hof, Van der Vals

Germany - Kekule

England - Cooper, Maxwell.

Third period - the creation of studies on the complex structure of the atom:

1881

England - Thompson, Rutherford

Germany - Helmholtz, Nernst

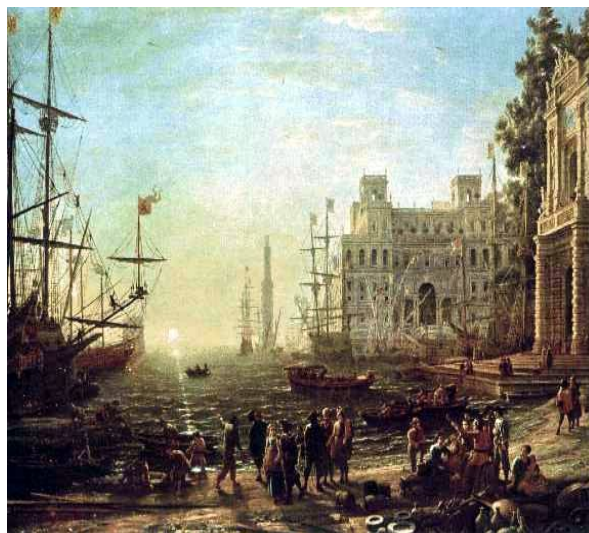
Sweden - Arenius

France - Becquerel, Marie and Pierre Curie.

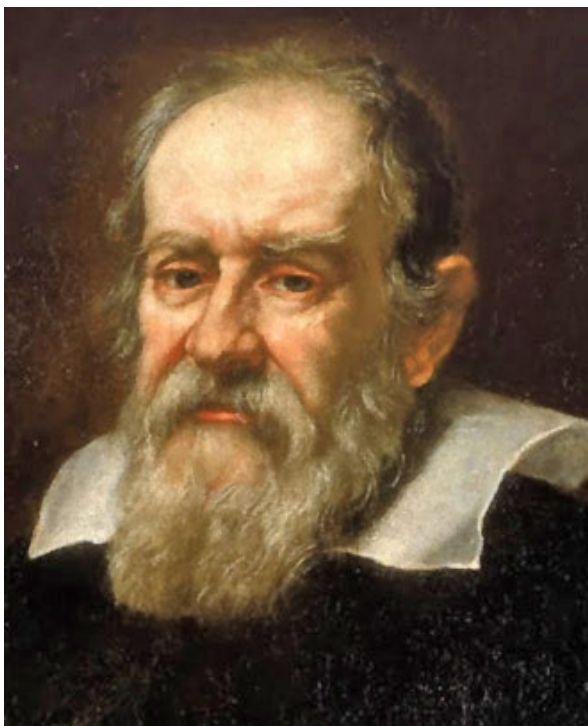
Fourth period - development of modern electronic and quantum-mechanical ideas about the structure of the atom: 1913-nowadays.

1. Nature of science and scientific thinking in the late 16th and early 17th centuries

In the 16th century, in the most technically and economically developed countries of Western Europe, a new class appeared on the arena of public life and political struggle - the bourgeoisie. The rapid growth of capitalist social relations began. Cities grow, maritime trade expands, new sources of minerals are discovered, new crafts emerge - all this creates new socio-economical and cultural-historical conditions for the development of science and technology.



At the end of the 16th century, the Italian scientist **Galileo Galilei**, studying falling bodies was the first one that shows the need for mathematical processing of experimental data.



Galileo Galilei (1564-1642) was an Italian physicist, astronomer, astrologer and philosopher, considered together with **Francis Bacon** as the founder of the modern scientific method. He is known with the First Astronomical observations with a telescope, the discovery of Jupiter's satellites and the phases of Venus, the law of inertia.

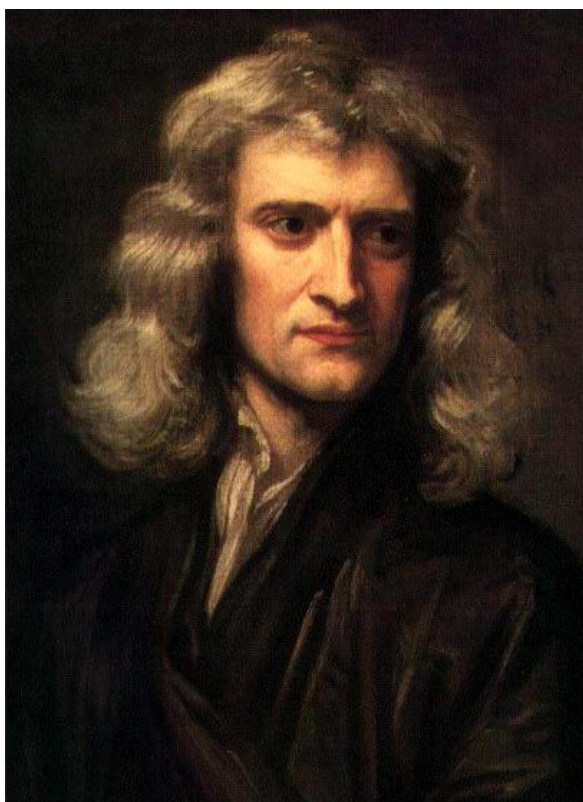
Galilei's conflict with the Roman Catholic Church is one of the first significant examples of the conflict between authority and freedom of thought in the Western world. In 1632, Galileo was tried by the Inquisition on charges of heresy, namely the idea that the Sun was motionless and the Earth rotated. However, the results of his research helped the work of many scientists such as the Frenchman **Rene Descartes** and the English scientist **Isaac Newton**.

Rene Descartes (1596-1650), also known as Cartesian, was a French philosopher, mathematician and physicist. He gained world fame mostly with his innovative philosophical ideas. Descartes is also known as the creator of the Cartesian coordinate system, which influenced the development of modern analytical geometry and mathematical analysis.

Newton's contribution to the development of mathematics and various fields of physics played an important role in the scientific revolution.

Isaac Newton's most important contribution to mathematics was the development of the method of fluxes, which would later become

mathematical analysis, a branch of mathematics dealing with mathematical functions such as differential and integral calculus.



Isaac Newton (1642-1727) was an English physicist, mathematician, astronomer, alchemist, philosopher and politician.

The Italian physicist and mathematician **Evangelista Torricelli** (1608-1647) also worked during this period. He invented the mercury barometer (in 1643 or 1644), discovered atmospheric pressure and vacuum (1644) and formulated the Torricelli equation (1641).



Some of Torricelli's experiments were continued by the French mathematician and physicist **Blaise Pascal** (1623-1662).



Due to his incompetent handling of chemicals such as mercury, he developed serious health problems. He carried out famous barometric experiments that gave way to the development of hydrodynamics and hydrostatics and destroyed

the old notion that "nature is afraid of emptiness."



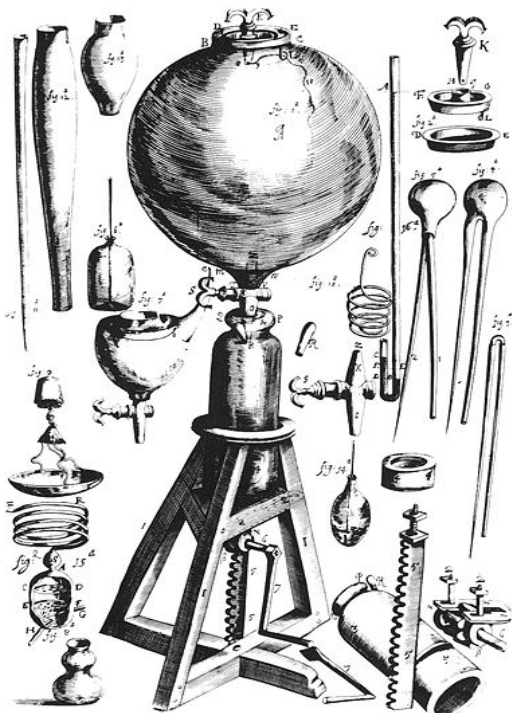
In the 17th century, mechanics also received great development, thanks to the experiments and results of Pascal, Descartes, Galilei and Newton. They have all studied the movement of bodies and the forces that cause them. In 1687, Newton formulated the three fundamental laws of motion that underlie classical *emerge* and were used by scientists unchanged for the next two centuries. They are:

1. Bodies shall remain at rest or maintain their rectilinear motion at a constant speed if no external force acts on them.
2. $F = m \times a$ - force acting on the system from the outside leads to acceleration of the system
3. $F_1 = -F_2$ - each impact corresponds equally in strength and opposite in direction counteraction.

Isaac Newton also formulated the law of universal attraction - gravity. It reads: "The force with which two material points are attracted to each other is directly proportional to the product



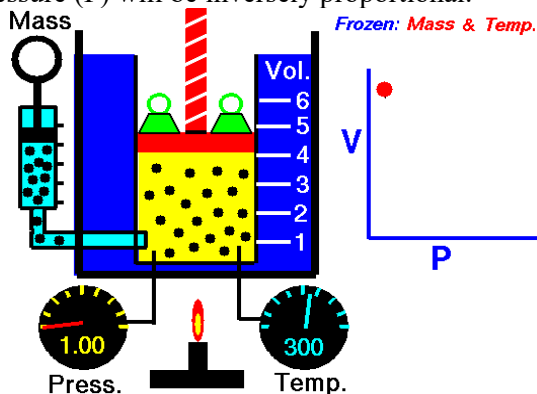
Robert Boyle (1627-1691) was an Irish physicist, chemist, theologian and nobleman of Elizabeth I.



Boyle studied the chemical and physical properties of air by constructing an air pump to compress the air. In a long U-shaped tube, he pours mercury and compresses the air at the closed end of the tube. When the amount of mercury doubled, the volume of air also decreased twice. If the pressure doubled, the volume increased.

This inverse relationship was called **Boyle's Law** (1662): "If a certain amount of ideal gas is

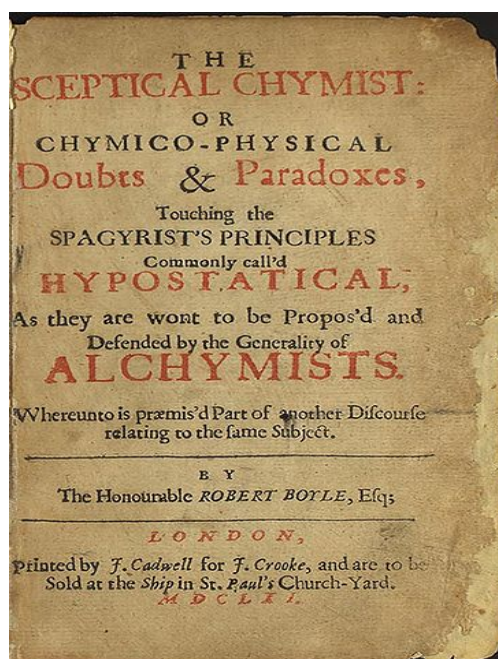
kept at a fixed temperature, its volume (V) and pressure (P) will be inversely proportional."



The same law was discovered later, in 1676, by the French physicist **Edmond Mariott**, who emphasized that the dependence is followed only at a constant temperature, i.e. $P \times V = \text{const.}$, at $T = \text{const.}$ The law was called the **Boyle-Mariott Law**.

Boyle was one of the first to obtain and describe hydrogen, obtain phosphorus, and study several of its compounds. He developed some methods of qualitative wet chemical analysis, introduced color decoctions as indicators in the determination of acids and bases.

After many chemical experiments, Boyle published his book „*The Skeptical Chemist*“, in which he sought to prove the unreality of the *Elements of Aristotle* (air, earth, fire, water) and *Paracelsus* (salt, sulfur, mercury) and to lay the foundations of corpuscular theory.



The book addresses the following issues:

- 1) Is fire a universal analyzer for all substances?

- 2) Can calcination products be called elements?
- 3) Can the number of substances taken as elements be limited?
- 4) Are there really elements "sulfur", "mercury" and "salt"?
- 5) Are there any elements or principles at all?

Thanks to the logic of his arguments and his precise statements of his ideas, he struck a chord with the views of the alchemists. However, the teachings of alchemists made it possible to classify substances according to their similar properties.



Robert Boyle was the first to develop the idea of chemical elements as practically indecomposable substances, and the decomposable component of substances - compounds. It is characteristic of Boyle that, unlike ancient Greek thinkers, he emphasized the great importance of experience.

(To be continue)

References

1. Solovyev Y.I. History chemistries. Moscow, ed. Enlightenment, 1976.
2. . Solovyev Y.I., Trifonov D.N., Shamin A.N. History chemistries. Moscow, ed. Enlightenment, 1978.
3. Asimov A. Short history chemistry. Moscow, ed. Peace, 1983.
4. Baikov G.V. Transmutation chemistries into science. Moscow, ed. Science, 1983.
5. Fawltly J., New L. History of science in dates. Sofia, ed. National Youth, 1984.
6. https://bg.wikipedia.org/ /Исак_Нютон
7. <http://www.answers.com/topic>
8. <http://en.wikipedia.org>
9. Ruickbie, L. Faustus: The Life and Times of a Renaissance Magician, The History Press, 2009.
9. Frank Baron: Faustus on Trial. The Origin of Johann Spies's Historia in an Age of Witch-hunting. Tübingen: Niemeyer 1992.

¹ "Prof. Dr. Assen Zlatarov" University,
Department of Chemistry,
8010 Bourgas, Bulgaria
e-mail: krasimiraangelova@abv.bg



МЕТОД НА ДЕРИВАТИВНА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПАЛАДИЙ (II)

Чанд Паша, Красимира Станчева

DERIVATIVE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF PALLADIUM (II)

Chand Pasha, Krasimira Stancheva

ABSTRACT: A derivative spectrophotometric method for the determination of palladium (II) using new chromogenic reagents *p*-dimethylamino benzaldehyde-(*p*-anisyl)-thiosemicarbazone (DBATSC) and glyoxal (*p*-anisyl)-thiosemicarbazone (GATSC) has been described. The reagents interact with palladium (II) to give coloured species. The developed methods are simple, sensitive and selective in aqueous medium without prior separation or extraction. This method has been applied for the spectrophotometric determination of palladium (II) in various synthetic mixtures and hydrogenation catalysts.

Key words: : palladium (II) determination, direct and derivative spectrophotometry, DBATSC, GATSC.

Introduction

Palladium is discovered by the English chemist William Hyde Wollaston in 1803. It is a rare, lustrous silvery-white metal used for catalytic converters along with platinum and rhodium in automobile industries [1], which convert as much as 90% of the harmful gases in automobile exhaust into less harmful substances like N₂, CO₂ and H₂O vapor. Palladium and its alloys have wide range of applications both in the chemical industry and in manufacturing instrument [2]. Palladium itself has occasionally been used as a precious metal in jewelry, as replacement for platinum or alloyed with platinum. Palladium is a component of the system for the manufacture of nitric acid and petroleum in the chemical industry. It is widely used in the production of synthetic polymers like rubber and nylon. Palladium is also used in jewelry, dentistry [3], watch manufacture, blood sugar test strips, aircraft spark plugs and surgical instruments [4]. Pd is used in many electrical devices, which makes it an alternative to gold in galvanic elements. Palladium is also used to create drugs for cancer treatment [5, 6]. Palladium is finely divided on carbon; it forms a good catalyst and is used to speed up in hydrogenation and dehydrogenation reactions, as well as in petroleum cracking.

It is used in making special photographic printing paper and detecting carbon monoxide in

the air of industrial areas. Hence, emission of these metal ions into the environment has increased [7]. From the health hazard viewpoint, it is one of the strongest allergens [8]. Therefore accurate determination of micrograms of palladium using simple and sensitive method is of great importance.

Various chromogenic reagents have been used for the spectrophotometric determinations of palladium. Analytical reagents containing S and N as donor atoms, thiocarbazones play important role in the determination of palladium. The most widely used method for the determination of palladium is extractive dithizone method [9], but it suffers serious interference from Cu(II), Cr(VI), Au(III), Pt(IV) and Hg(II). In the current work, two simple, sensitive and non-extractive derivative spectrophotometric methods for the determination of palladium (II) using *p*-dimethylamino benzaldehyde-(*p*-anisyl)-thiosemicarbazone(DBATSC) and glyoxal (*p*-anisyl)-thiosemicarbazone (GATSC) as chromogenic reagents are reported. The proposed methods can be successfully applied to the analysis of palladium in hydrogenation catalysts and alloys.

Experimental

Apparatus

A Systronics 2201 UV-Vis. Double Beam Spectrophotometer with 1 cm quartz cell was

used for the absorbance measurements and a pH meter WTW pH 330 was used.

Reagents and Solutions

Solution of GATSC (0.1%) was prepared in a 1:1 mixture of ethanol and DMF, and DBATSC (0.1%) was prepared in ethanol (few drop of DMF) by dissolving the recrystallised compounds. The standard stock solution ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) of Pd(II) was prepared by dissolving 1 g of palladium chloride (Johnson Mathey, England) in hydrochloric acid (5 mL, 2 M) and diluted to mark in a 250 mL volumetric flask with distilled water. Stock solution was standardized and standard working solutions were prepared by suitable dilution. Acetic acid 10 M was prepared and used in the present study. Aqueous solution of 2% Triton X-100 (CDH Pvt. Ltd., India) was prepared by dissolving 2 mL of Triton X-100 in distilled water. Solutions of the studied interfering ions were prepared by dissolving the required amounts of A.R. grade.

Recommended procedures

The following procedures were suggested after an intensive and thorough study of various parameters involved in the development of colored species.

GENERAL PROCEDURE

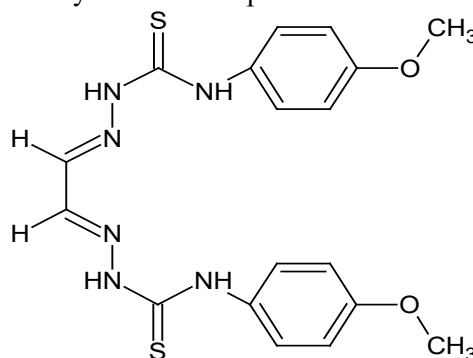
Suitable aliquots of Pd(II) [1.4-25 mg for PDABPTSC and 3.5 –42 mg for GATSC] were transferred into a series of 10 mL calibrated volumetric flasks. To each of these were added DBATSC or GATSC (1.0 mL, 0.1%), acetic acid solution (1.0 mL, 10 M for DBATSC and 3 mL, 10 M for GATSC) and TritonX-100 (2 mL, 2% for DBATSC) and diluted with distilled water.

The first order derivative spectra were recorded with $\Delta\lambda=2$ nm, scan speed of 370 nm/min and slit width of 1 nm in the wavelength range 350-650 nm against reagent blank. The first order derivative amplitudes were measured at 410 and 455 nm for Pd(II)-DBATSC and 432 and 520 nm Pd(II)-GATSC complex. Calibration graphs were constructed by plotting the derivative amplitudes against the concentration of palladium (II) ions.

Analysis of hydrogenation catalysts and synthetic samples. Hydrogenation catalyst (about 0.5g) sample was transferred into a 250 mL beaker. It is treated with 5 mL of 2N HNO_3 and covered. 10 mL of aqua regia was added after the gas evolution was ceased and solution was evaporated to near dryness on a sand bath. The residue was dissolved in 5 mL of 2N nitric acid and diluted to 100 mL with distilled water. Also, syn-

thetic solution containing Ru(III), Rh(III), Os(VIII) and Ir(III) along with Pd(II) and alloys corresponding palladium were prepared. Suitable aliquots of these solutions were taken and analysed for palladium as per the recommended general procedure.

Synthesis of glyoxal *p*-(anisyl) thiosemicarbazide. Glyoxal (*p*-anisyl) thiosemicarbazone was synthesised by refluxing 1:2 molar amounts of glyoxal and (*p*-anisyl) thiosemicarbazide in presence one drop of H_2SO_4 in ethanolic medium for 1 hour. The resulting solution was recrystallised from a mixture of DMF and ethanol (m.p =220-222 °C, yield 80%). The reagent is characterised by IR & NMR spectral data.



Structural formula of GATSC

Results and Discussion

Preliminary studies have shown that palladium (II) reacts with DBATSC or GATSC in presence of acetic acid in aqueous medium to form dark yellow coloured species. The development of colour is immediate upon mixing the reagent without heating or extraction.

Spectral characteristics of the complexes. Absorption spectra of Pd(II)-DBATSC and Pd(II)-GATSC were scanned in the wavelength range 350-650 nm against the corresponding reagent blank. The absorption spectra of the coloured species showed characteristic absorption maxima at 425 and 465 nm for Pd(II)-DBATSC and Pd(II)-GATSC respectively, where the reagent blank showed negligible absorbance (Fig. 1).

The first order derivative spectra were recorded with reference to the corresponding reagent blank in the wavelength range 350-650 nm. First order derivative spectrum of Pd(II)-DBATSC complex shows two troughs at 410 and 455 nm and two zero-crossing points at 400 and 425 nm. Zero-crossing point at 425 nm corresponds to the λ_{max} of the complex. Similarly first

order derivative spectrum of Pd(II)-GATSC complex shows two troughs at 432 and 510 nm; two zero-crossing points at 410 and 465 nm. Zero-crossing point at 465 nm corresponds to the $\lambda_{\max}$ of the complex. The derivative amplitudes measured were found to be proportional to the concentration of palladium (II). The first order derivative spectra of both the systems are shown in Fig.2.

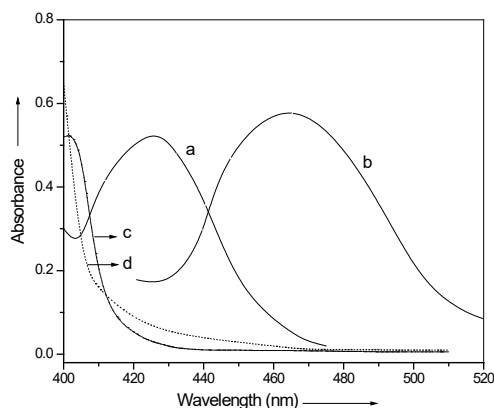


Fig. 1. Absorption spectra of palladium complexes: (a) Pd(II)[1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$]-DBATSC; (b) Pd(II) [3.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$]-GATSC against reagent blank and (c & d) Corresponding reagent blanks of (a & b) against distilled water.

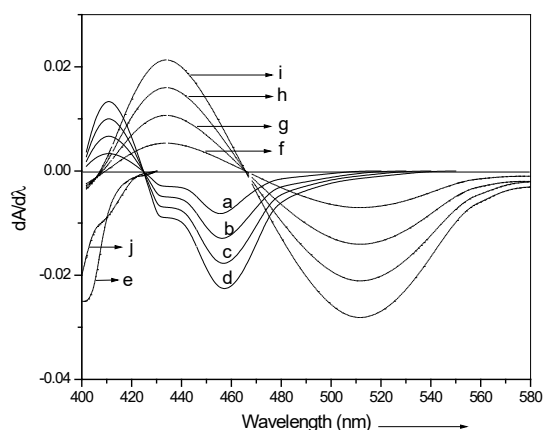


Fig. 2. First order derivative spectra of palladium (II) complexes: (-) Pd(II)-DBATSC (a-d) 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of Pd(II); (-) Pd(II)-GATSC (f-i) 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of Pd(II) and (e) and (j) reagent blanks.

Optimisation of experimental conditions for the formation of coloured species

The optimum reaction conditions necessary for the development of the coloured species with greater stability and higher sensitivity were established via number of preliminary studies measuring the absorbances of the coloured spe-

cies at their $\lambda_{\max}$ for a series of solutions by varying one parameter at a time and fixing the others.

Selection of the medium

The experimental results revealed that the colour development was slow in various acids such as sulphuric, hydrochloric, nitric and phosphoric acid except acetic acid and there was no colour formation in bases such as NaOH and NH_4OH for Pd(II)-DBATSC system. But in the case of Pd(II)-GATSC there was colour development in sulphuric, hydrochloric, nitric and acetic acids after few minutes precipitates except acetic acid and no colour formation with bases such as NaOH and NH_4OH . Hence, the effects of acetic acid on the absorbance of the coloured complexes were investigated. Studies revealed that, acetic acid 1.0 mL (10 M) for DBATSC and 3 mL (10 M) for GATSC was found to be optimum for the colour development of the systems. The results are shown in Fig.3. Also, the effect buffers on the colour development were studied using different buffers such as sodium acetate-HCl (pH 0.65 – 5.2), KCl-HCl (pH 1.0-2.2), sodium acetate-acetic acid (pH 3.48 – 6.04), potassium hydrogen phthalate-HCl (pH 2.2-4.0) and potassium hydrogen phthalate-NaOH (pH 4.1-5.9). The colour development was slow in the pH range 1.0-6.0 for both the systems.

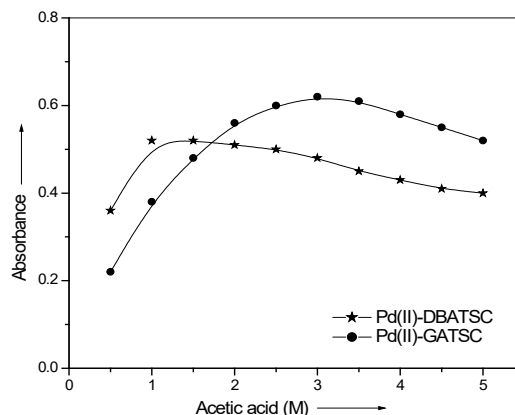


Fig.3. Effect of acetic acid on the absorbance of Pd(II)[1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$]-DBATSC and Pd(II)[3.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$]-GATSC coloured species.

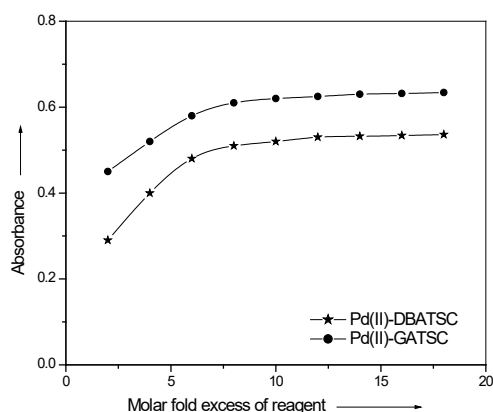


Fig. 4. Effect of DBATSC and GATSC on the determination of $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $3.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ of Pd(II) respectively.

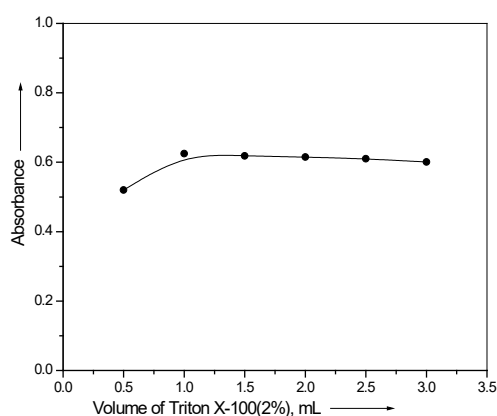


Fig. 5. Effect of concentration of Triton X-100 on the absorbance of Pd(II)[$3.0 \mu\text{g mL}^{-1}$] GATSC complex

Calibration graphs and analytical parameters

Under the recommended conditions, first order derivative amplitudes [at 410 or 455 nm for Pd(II)-DBATSC and 432 or 510 nm for Pd(II)-GATSC] were recorded for a series of solutions containing different amounts of Pd(II). Calibration graphs were constructed by plotting amplitudes against concentration of palladium (II) (Fig. 6). The optimum concentration ranges obtained from Ringbom plots are 0.14-2.5 and 0.35 to $4.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ for Pd(II)-DBATSC and Pd(II)-GATSC complexes respectively. The molar absorptivity, Sandell's sensitivity, specific absorptivity, slope, intercept and correlation coefficient values are summarized in Table 1. The calibration graphs follow the straight-line equation $y = mx + c$; where x is the concentration of palladium (II) in $\mu\text{g mL}^{-1}$, y is the measured derivative amplitude, m is the slope and c is the intercept.

The linear regression analysis of the change in derivative amplitude, versus metal ion concentration shows a good linear fit. The high value of correlation coefficient and closeness of the intercept to zero show that calibration graphs are linear and obey Beer's law.

The precision of the method in different modes, reported as relative standard deviations (RSD) determined by measuring absorbances or derivative amplitudes of five replicate samples containing known amounts of palladium (II). The low RSD values indicated good precision of the methods. The accuracy of the proposed method was checked using known amounts of palladium (II). The low percentage errors at 95% confidence limit values calculated from five replicate analyses have demonstrated good accuracy of the proposed method. The results are recorded in Table 1.

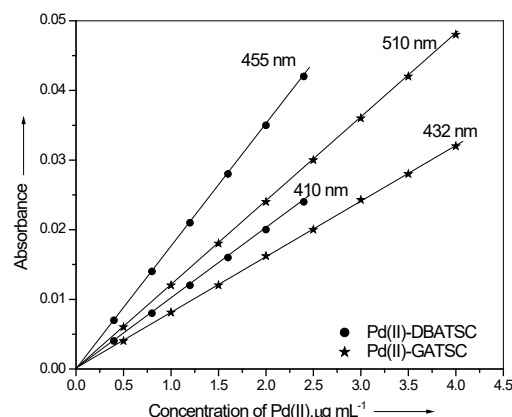


Fig. 6. Beer's law plots for first order derivative method of Pd(II)-DBATSC and Pd(II)-GATSC Complexes

Effect of diverse ions

The effect of diverse ions has been investigated in first order derivative modes. An error of less than $\pm 3\%$ in the absorbance values was considered to be tolerable. The tolerance limits of the foreign ions tested are given in Table 3. It was found that, metal ions like Cr(VI), Ag(I), Al(III), Fe(III), Zn(II), Zr(IV), Rh(III), Ir(III), Ru(III), alkali & alkaline earth metal ions and a large number of anions did not interfere even present in large excess. Pt(IV), Cu(II), Ni(II), Co(II)&Hg(II) interferes. The interference of Cu(II), Ni(II) and Co(II) can be minimized by complexing with Na_2EDTA (500 ppm) and that of Hg(II) and Pt(IV) by adding tartarate (100 ppm) respectively. Also interference due to Cu(II), Ni(II), Co(II) and Hg(II) can be minimized in the derivative mode.

Table 1. Analytical parameters of Pd(II)-DBATSC and Pd(II)-GATSC complexes

Pd(II)-DBATSC				Pd(II)-GATSC		
Parameters		First derivative, 410 nm	First derivative, 455 nm		First derivative, 432 nm	First derivative, 510 nm
Molar absorptivity, ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	3.71×10^4	---	---	2.23×10^4	---	---
The Sandell sensitivity (ng cm ⁻²)	2.8	---	---	4.65	---	---
Specific absorptivity, a (mL g ⁻¹ cm ⁻¹)	0.351	---	---	0.215	---	---
Linear range (μ g mL ⁻¹)	0.14 – 2.5	0.14-2.5	0.13-2.5	0.35-4.2	0.34-4.6	0.32-4.2
Regression analysis (y) ^a						
Slope, m	0.3488	0.01	0.0175	0.008	0.02025	0.012
Intercept, c	-0.0011	-5.2×10^{-4}	2×10^{-4}	0.00056	1×10^{-4}	5×10^{-4}
Correlation coefficient, r	0.99981	0.9996	0.9998	0.9993	0.99765	0.9997
Relative standard deviation (%) ^b	0.614	0.00032	0.00012	0.0125	0.102	0.0106
% Range of error ^b (95% confidence limit)	1.08	1.22	0.94	1.36	1.26	1.09

^ay = mx + c where y, absorbance/derivative amplitudes; m, slope; x, concentration of palladium (II); c, intercept. ^b For five replicate analyses within Beer's law limits, ^c Recommended for estimation.

Table 2. Determination of Pd(II) in synthetic mixtures and alloy compositions

	DBATSC method		GATSC method		Reference method		DBATSC method		GATSC method	
	Pd Found ^a (Recovery) %	RSD %	Pd Found ^a (Recovery) %	RSD %	Pd Found ^a (Recovery) %	RSD %	t test	F test	t test	F test
Synthetic mixture										
Pd,30; Ru,20; Rh,25; Os,5; Ir,20	29.89 (99.6)	1.08	29.91 (99.7)	0.89	29.96 (99.86)	0.86	1.24	1.57	1.15	1.71
Pd,50; Ru,20; Rh,25; Pt,5	49.88 (99.7)	0.95	49.94 (99.88)	1.02	49.94 (99.88)	1.01	0.96	1.12	1.54	1.28
Alloys										
Pd,72;Ag,26;Ni,2	72.06 (100.08)	1.24	72.08 (100.1)	0.77	72.02 (100.02)	0.95	1.18	1.32	1.44	1.14
Pd,34;Au,10;Co,22;Ni,34	33.92 (99.76)	0.92	33.96 (99.88)	1.15	33.93 (99.79)	0.74	1.31	1.63	1.27	1.62
Pd,40;Ag,30;Cu,30	39.89 (99.7)	0.78	39.95 (99.87)	0.99	39.98 (99.95)	0.98	1.29	1.09	1.19	1.56

The interference due to Pd(II) can be masked by adding 100 ppm of dimethylglyoxime and Cu(II), Co(II) and Ni(II) by adding 500 ppm of

Na₂EDTA. Also, interference can be minimised in the derivative mode as spectral profiles of the coloured species of the interfering ions get resolved from that of the analyte.

Analytical applicability

The validity of the proposed method was checked by determining Pd(II) in hydrogenation catalysts, synthetic mixtures containing Pt, Ru(III), Rh(III), Os(VIII) and Ir(III) along with Pd(II) and alloys corresponding palladium. Satisfactory results were obtained for the recovery of palladium in both methods, indicating that the proposed methods were effective. The students *t*-values at 95% confidence level and the variance ratio *F*-values calculated for $p=0.05$ did not exceed the theoretical values, indicating that there was no significant difference in accuracy and precision between proposed and reference method. The results are summarized in Table 2.

Conclusions

The proposed method are advantageous in terms of simplicity, selectivity and sensitivity. The methods need require tedious separation or solvent extraction procedures. Most of the commonly associated metal ions do not interfere and utilisation of first order derivative spectrophotometry, increased the tolerance limit, sensitivity and selectivity. The low percentage relative standard deviation and percentage recovery values highlighted good accuracy and precision of the proposed methods. The results obtained by the proposed methods are accurate and reproducible. The proposed have been successfully applied for the determination of palladium (II) in various synthetic mixtures and hydrogenation catalysts.

References

1. Janet K., M. Christine, K. Detlef, M. Inge, 2002, "Palladium – A review of exposure and effects to human health" *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 205(6), p. 417.
2. N. N. Greenwood N.N., A. Earnshaw, 1989 "Chemistry of the elements" *Pergamon*

press, p. 1337.

3. Roy R., 2004 "Palladium in Restorative Dentistry: Superior Physical Properties make Palladium an Ideal Dental Metal" *Platinum Metals Review*, 48 (1).

4. Hesse R.W., 2007 "Palladium. Jewelry-making through history: an encyclopedia" *Greenwood Publishing Group*, p. 146.

5. Viennot S., M. Lissac, G. Malquarti, F. Dalard, B. Grosogeat, 2006 "Influence of casting procedures on the corrosion resistance of clinical dental alloys containing palladium" *Acta Biomaterialia*, 2(3), p. 321.

Zereini F., F. Alt, 2006 "Palladium Emissions in the Environment, Analytical methods. Environmental Assessment and Health Effects", *Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Herdecke, Germany*, p. 639.

Pyrzinska K., 1998 "Recent advances in solid-phase extraction of platinum and palladium" *Talanta*, 47, p. 841.

Caroli S., A. Alimonte, F. Petrucci, B. Bocca, M. Krashler, F. Forastere, M. T. Sacerdote A, S. Mallone, 2001 "Palladium determination" *Spectrochimica Acta Part B*, 56, p.1241.

Marczenko Z., 1973 "Separation and spectrophotometric determination of element" *John Wiley and sons*, p.440.

Chand Pasha¹, Dr., Krasimira Stancheva², Dr,
¹ Yanbu Industrial College
Department of General Studies
P. O. Box- 30436, Yanbu – 21477, Kingdom of Saudi Arabia
email : drpasha@gmail.com

² "Prof. Dr. Assen Zlatarov" University
Department of Chemistry
8010 Bourgas, Bulgaria
e-mail: krasimiraangelova@abv.bg



ТЕРМОДИНАМИЧНИ И КИНЕТИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА АДСОРБЦИОННИ ПРОЦЕСИ НА СРЕДНОДЕСТИЛАТНА ФРАКЦИЯ

Йорданка Ташева, Милена Димитрова, Александър Димитров

THERMODYNAMIC AND KINETIC CHARACTERISTICS OF ADSORPTION PROCESSES OF MIDDLE DISTILLATED FRACTION

Yordanka Tasheva, Milena Dimitrova, Aleksandar Dimitrov

ABSTRACT: Purifying of middle distilled fraction by adsorption was investigated. The aim of adsorption processes is to separate unlikely sulfur compounds. Si-gel and alumina were analyzed and compared. The thermodynamic and kinetic parameters of the process were determined. Activation thermodynamic parameters as free molar energy (Gibbs energy), entropy, enthalpy and equilibrium constant were obtained for adsorbates, respectively. The calculated kinetic process parameters were activation energy, Arrhenius constant and reaction rate constant.

Key words: adsorption purification, gasoil, fuel, sulphur compounds

Въведение

През последното десетилетие в света и в България най-силно се промениха изискванията за съдържание на сяра и полиарени в дизеловите горива [1].

При пълно изгаряне серните съединения образуват оксиди (SO_x). При високите температури на горивния процес, оксидите кородират металите в газова фаза. При ниски температури те се разтварят в кондензираните капчици вода, при което се получават серниста и сярна киселини, които атакуват елементите на двигателя в течна фаза. Корозионни са и неразложените серни съединения, особено меркаптаните, от които най-агресивни са ареновите, а циклановите меркаптани заемат междинно място [2].

Серните оксиди, отделяни с отработените горивни газове влияят негативно върху катализаторните системи за доизгаряне, а в атмосферата са причина за киселинните дъждове.

Сярата участва и при образуването на нагари и „лакове“, като при еднакви други условия, повишава плътността им. Продуктите от изгаряне на горивото, вкл. SO_x , попадат и в маслото, влошават на качеството му и увеличават скоростта на стареенето му [3-5].

Допустимото съдържание на сяра в моторните дизелови горива до 31.12. 2003 г. беше 0.2 %; от 01.01.2004 г. - 350 ppm, от

01.01.2007 г. - 50 ppm и от 01.01.2009 г. - 10 ppm [10].

От 31.07.2018 г. изискванията за съдържание на сяра в газьол за промишлени и комунални цели е под 0,1%, 0,02 % и 0,01 %. В повечето европейски страни и в Япония изискването за 10 ppm е от 2007 г. В САЩ автомобилното дизелово гориво е с 15 ppm сяра от 2006 г., а през 2010 г. се преминава към производство на ДГ с ултраниско съдържание на сяра (под 10 ppm) [11].

За да се намали сярата от 50 на 10 ppm в съответствие с нормите за производство на екологични чисти горива в японската нефтена индустрия са инвестирани около 4 билиона (10^9) долара, в американските рафинерии – около 8 билиона долара, като е установено, че използваните досега катализатори за ХДС не биха могли да понижат сярата под 5 ppm. Това налага да бъдат създадени нови катализатори, да се усъвършенстват процесите и оборудването за ХО и да се разработят алтернативни, неконсумиращи водород технологии за десулфуриране [6].

Използването на дизелови горива с ултраниско съдържание на сяра води и до някои нови проблеми – главно износване на системите за впръскване на горивото, защото горивото в дизеловия двигател играе роля на смазващ агент.

Съдържанието на полициклически ароматични въглеводороди в съвременните автомо-

билни дизелови горива също се ограничава, поради това че при тяхното изгаряне се получават канцерогенни продукти, като най-силно негативно биологично въздействие оказва бензпирена. Полицикличните арени са и основен източник за образуване на кондензиращи въглеродни частици – „сажди” и кокс [7].

Автори установяват, че в продуктите от горене на ДГ се съдържат две- до четирициклични арени, които присъстват и в състава на изходното гориво. Те се адсорбират върху образуваните при горенето въглеродни частици. Това ги прави особено опасен вторичен замърсител, негативното действие на който е по-голямо, отколкото на двата първични замърсители поотделно [8].

Образуваните при изгаряне на полиарените частици, са съставна част на нагарите и лаковете, което е съществен технически проблем. В отработените газове от съвременните автомобили те трябва да се уловят преди да се използва катализатор, тъй като биха попречили на неговата работа.

С увеличаване на съдържанието на газьол от КК в дизеловите горива се увеличава и количеството на полициклични арени в отработените газове на дизеловите двигатели. Резултатите от изследванията на някои колективи показват, че с добавянето на 3.5 % ЛКГ към търговско дизелово гориво (ТДГ) в продуктите от горенето на сместа, полицикличните арени се увеличават с 80 %. Според авторите това се дължи на значително повишаване на съдържанието на арени и полициклична ароматика в газьола в сравнение с ТДГ (газьолът съдържа 28.7 пъти повече полициклични арени и 2.5 пъти повече арени отколкото ДГ) [9].

Целта на настоящата работа е изчисляване на термодинамичните и кинетични параметри на адсорбционни процеси на среднодестилатна фракция.

Експериментална част

С цел изследване на термодинамичните и кинетични характеристики на отделни адсорбционни процеси в лабораторни условия беше използвана среднодестилатна фракция, чийто физикохимични свойства са отразени в Таблица 1.

Таблица 1. Физикохимични свойства на използваната среднодестилатна суровина

Показател	Стойност
Плътност при 15°C, g/cm ³	0.8355
Пламна температура, °C	69.5
Кинематичен вискозитет при 40 °C, mm ² /s	2.87
Дестилационни характеристики, °C	
н. к., °C	178
10 %, °C	201
50 %, °C	248
90 %, °C	325
95 %, °C	345
к. к., °C	356
Сяра, %	0.16
Вода, % (v/v)	отсъствие
Механични примеси, %	0.007
Пепел, %	0.001
Гранична температура на филтруемост, °C	-11
Коксов остатък (на 10% остатък), %	0.02
Съдържание на полициклични арени, %	25.0

Адсорбционните лабораторни процеси бяха проведени в апаратурата е описана в [10], при температури от 20 до 40 °C и време на контакт на отделните системи суровина:адсорбент от 1,0 до 6, 0 часа. Съотношението между суровината и отделните адсорбенти /силикагел и алуминиев оксид/ беше 1:10. Избора на цъотношение се базираше на предходни изследвания, литературни данни и не на последно място икономическа ефективност на процесите. Методиката на провеждане на отделните лабораторни адсорбционни експерименти, както и активирането и регенерацията на адсорбентите е представена в [11]. Въз основа на получените експериментални данни бяха изчислени термодинамичните и кинетични характеристики на отделните системи суровина:адсорбент. Последните бяха изчислени по-добре познатите физикохимични зависимости, представени по-долу:

$$A = [(T.R/N.h)e^{\Delta S/R}] \quad (1)$$

$$\Delta H = E_a - RT, \text{ kJ/mol} \quad (2)$$

$$\Delta G = -RT \ln K, \text{ kJ/mol} \quad (3)$$

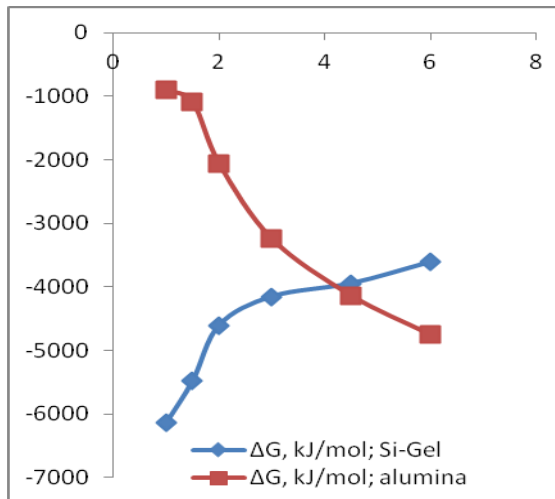
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \text{ kJ/mol} \quad (4)$$

където: N – константа на Авогадро; h – константа на Планк; ΔS – ентропия на отделните системи, kJ/mol K; ΔH – енталпия на отделните системи, kJ/mol; ΔG – енергия на Гибс, kJ/mol, K – равновесна константа.

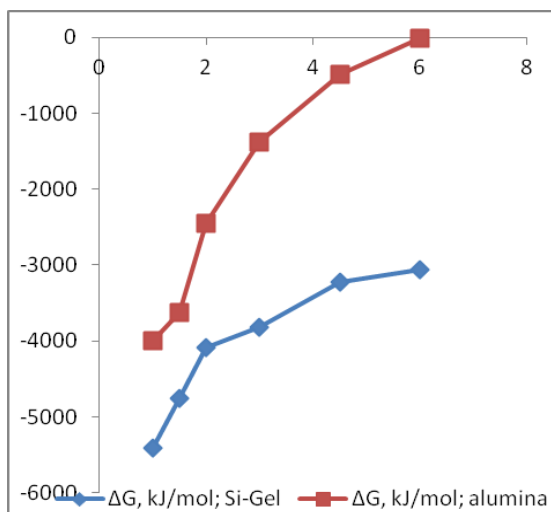
За да бъдат изчислени термодинамичните и кинетични параметри на отделните системи предварително бяха изчислени коефициентите на разпределение, като за целта изчислихме молните концентрации на серните съединения в адсорбата на всяка от системите. За целта беше изчислена молекулната маса на изследваната суровина, като цяло и на сумата от серните съединения, които се съдържат в нея. Вида на серните съединения, както и въглеродородния състав на суровината беше определен експериментално чрез метода на течната хроматография и ASTM D 2007. На база на данните за молекулната маса сме калкулирали молните концентрации на получените при експериментите продукти.

Резултати и обсъждане

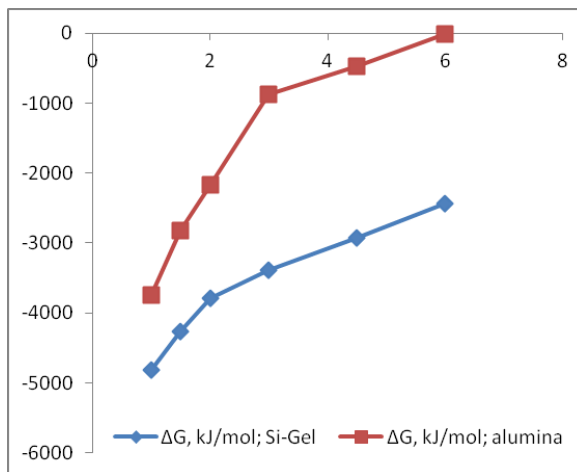
На следващите таблици и фигури са представени изчислените термодинамични и кинетични характеристики на конкретните системи суровина:селективен адсорбент.



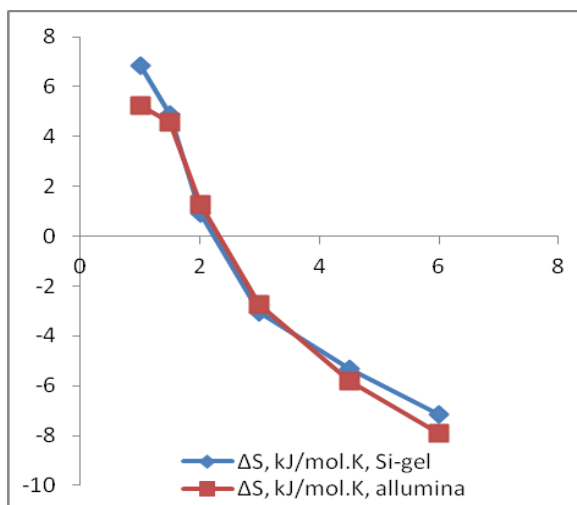
Фиг.1. Зависимост на Енергията на Гибс от времето на контакт при температура -20 °C



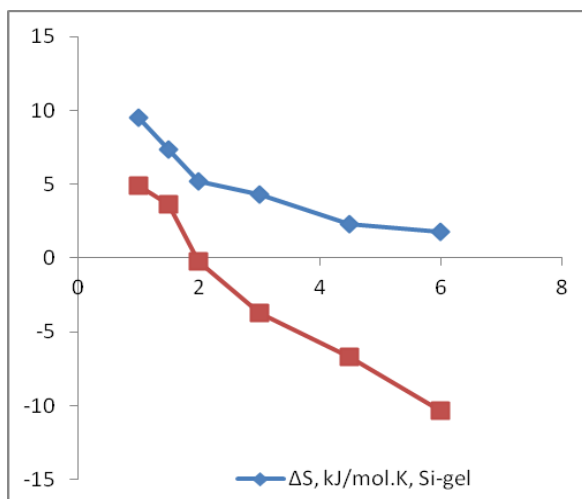
Фиг.2. Зависимост на Енергията на Гибс от времето на контакт при температура -30 °C



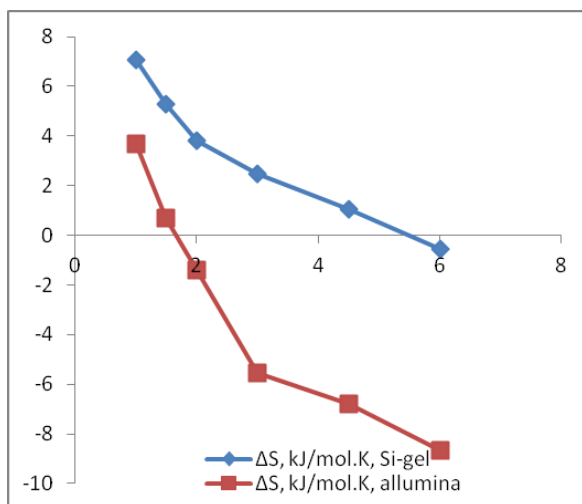
Фиг.3. Зависимост на Енергията на Гибс от времето на контакт при температура -40 °C



Фиг.4. Зависимост на ентропията от времето на контакт при температура -20 °C



Фиг.5. Зависимост на ентропията от времето на контакт при температура -30 °C



Фиг.6. Зависимост на ентропията от времето на контакт при температура -40 °C

Таблица 2. Кинетични параметри на адсорбционни системи изследвана суровина: силикагел = 1:10
Температури: 20 °C, 30 °C и 40 °C

Реакционна константа, s ⁻¹	Ea, kJ/mol	Константа на Арениус
223,28	0,9299	568682,60
353,16	0,8992	568682,60
459,10	0,8705	568682,60

Таблица 3. Кинетични параметри на адсорбционни системи изследвана суровина: алуминиев оксид = 1:10
Температури: 20 °C, 30 °C и 40 °C

Реакционна константа, s ⁻¹	Ea, kJ/mol	Константа на Арениус
388,73	0,6804	104674,32
388,73	0,6580	104674,32
533,66	0,6370	104674,32

Както показват получените изчислителни данни при всички температури и продължителност на контакт адсорбционния лабораторен процес на почистване от серни съединения е термодинамично възможен. Трябва да се отбележи, че с повишаване на температурата и времето на контакт получаваме по-добри резултати за енергията на Гибс, ентропията и енталпията. Най-добри резултати се получават при използване на адсорбент алуминиев оксид и изследваната суровина при температура 40 °C и време на контакт – 6 часа, междинни са резултатите при адсорбент алуминиев оксид и силикагел при температура – 30 °C и време на контакт от 4 до 6 часа. Най-лоши са термодинамичните и кинетични характеристики на адсорбционните системи суровина:силикагел, суровина:алуминиев оксид при температура – 20 °C и време на контакт 1 и 2 часа.

Отрицателните стойности получени за свободната енергия потвърждават експерименталните данни за извършване на процеса на адсорбция на изследваната суровина, като същевременно показват, че този процес за всички изследвани от нас системи е термодинамично възможен.

От получените данни за ентропията на разпределение на отделните системи се вижда, че при процеса на адсорбция на изследваната от нас среднодестилатна фракция се извършва най-вероятно взаимодействие от типа специфична солватация, без забележим топлинен ефект.

Получените експериментални данни за енталпията на адсорбционните процеси на изследваната среднодестилатна фракция са пренебрежимо ниски и доказват направените литературни проучвания, както и се налага извода, че могат да се пренебрегнат.

Въз основа на изчислените кинетични характеристики, представени в Таблице 2 и 3 може да се заключи, че най-вероятно механизма на реакцията на адсорбционните про-

цеси за изследваната от нас среднодестилатна суровина и подбрани адсорбенти е от първи порядък от гледна точка на химичната кинетика.

Заклучение

През последните години все по-широко3. навлизат алтернативните методи на почистване от нежелани компоненти, поради техните икономически и технологични предимства, а оттам като следствие е втората причина да се4. изследват термодинамичните и кинетични параметри на отделни процеси на почистване чрез адсорбция.

Във връзка с поставената цел на настоящата работа бяха изчислени термодинамичните и кинетични характеристики на отделните системи суровина:адсорбент, като от представените резултати представени в настоящатаб. можем да направим следното заключение:

Доказано е, че с повишаване на температурата и времето на контакт получаваме по-7. добри резултати за енергията на Гибс и ентропията. Най-добри резултати се получават при използване на адсорбент алуминиев оксид и суровината при температура 40 °C и8. време на контакт – 6 часа, междинни са резултатите при адсорбент алуминиев оксид и силикагел при температура 20 и 30 °C и време на контакт – 4,5,6 часа.. Най- лоши са термо-9. динамичните и кинетични характеристики на системите суровина:силикагел, суровина:алуминиев оксид при време на контакт 1 и 2 часа и температура 20 °C.

Отрицателните стойности получени за свободната енергия потвърждават експерименталните данни за извършване на процесa1. наадсорбция на изследваната от нас суровина, като същевременно показват, че този процес за всички изследвани от нас системи е термо-12. динамично възможен.

От получените данни за ентропията на разпределение на отделните системи се вижда, че при процеса на адсорбция на избраната от нас среднодестилатна фракция най-вероятно се извършва взаимодействие от типа специфична солватация, без забележим топлинен ефект.

Литература

- Минков Д., П. Петков, Д. Йорданов, 2007 *Химия и технология на нефта и газа*, Бургас.
2. Минков Д., П. Петков, Д. Вълчев, 2000, *Нефт, състав, свойства и химизъм на процесите на преработването му*, Ексел-М,София.
- Babich J., 2003, "Science and technology of novel processes for deep desulfurization of oil refinery streams: a review," *Fuel*, 82 (2), pp. 607-613.
- Corro G., 2002, Sulfur impact on diesel emission control: a review, *Reaction Kinetic Catalysis Letters*, 75, (1), pp. 89-93.
5. Cooper B., K. Knudsen, 2006, Ultra deep desulfurization of diesel: how an understanding of the underlying kinetics can reduce investment costs, *Practical Advances in Petroleum Processing*, 1, (10) pp. 297-322.
- Knecht W., 2008, Diesel engine development in view of reduced emission standards, *Energy*, 33, (1) pp. 264–271.
- Mubic M., K.Serti, 2013, Alternative Processes for Removing Organic Sulfur Compound from Petroleum Fractions, *Chem. Biochem. Eng.*, 27 (1), pp.101 - 110.
- Patil M., Y. Bhattacharyulu, S.Kulkarni, 2011, Desulphurization of hydrocarbon liquid fuels by adsorption, *Journal of Engineering Research and Studies*, 2, (1), pp.181-189.
- Serhiy P., 2012, Application of non catalytic oxidative desulphurization process for obtaining diesel fuels with improved lubricity, *Chemistry and Chemical Technology*, 6, (2), pp.68-72.
10. Tasheva Y., 2013, New investigations about decreasing of sulfur from diesel fraction, *Petroleum&Coal*, 55, (1), pp.31-39.
- Tasheva Y., 2019, Desulfurization of gasoil blends, *Industrial technologies*, 6, (1), pp. 114-118.

Йорданка Ташева, Милена Димитрова, Александър Димитров

Университет „Проф. д-р А. Златаров“

Катедра „Индустриални технологии и мениджмънт“

Адрес гр. Бургас, бул. „Я. Якимов“1

e-mail:jtasheva_2006@abv.bg



АНТИОКСИДАНТНИ СВОЙСТВА И АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ НА ТЪРГОВСКИ ПРОПОЛИСОВИ ЕКСТРАКТИ ОТ БЪЛГАРИЯ

Марияна Топузова, Мина Тодорова, Юлиан Тумбарски, Надежда Петкова и Иван Иванов

ANTIOXIDANT PROPERTIES AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF COMMERCIAL PROPOLIS EXTRACTS FROM BULGARIA

Mariyana Topuzova, Mina Todorova, Yulian Tumbarski, Nadezhda Petkova and Ivan Ivanov

ABSTRACT: Propolis (bee glue) is one of the most valuable and unique bee products, possessing a broad range of biological activities and health benefits. Propolis is widely used as a remedy in the traditional and alternative medicine, commercially available in different forms such as capsules, ethanolic extracts (tinctures), mouthwash, throat lozenges, toothpastes, creams, and powders. In the present study, five commercial ethanolic propolis extracts manufactured in Bulgaria were examined. The total phenolic content, the total flavonoids content, the antioxidant properties and antimicrobial activity of the extracts were evaluated. All commercial propolis preparations demonstrated promising antioxidant activity by the three methods used – DPPH, ABTS and FRAP. The propolis extracts exhibited high antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, particularly against *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* 2YC-YT, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* NBIMCC 8632 and *Listeria innocua* ATCC 33090. Regarding the rest Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 and *Escherichia coli* ATCC 8739, yeasts and fungi, the antimicrobial effect was moderate. The antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 was weak. The propolis extracts did not inhibit the test microorganisms *Bacillus cereus*, *Salmonella abony* NTCC 6017, *Klebsiella* sp., *Proteus vulgaris* ATCC 6380, and fungus *Rhizopus* sp.

Key words: propolis, commercial propolis extracts, antioxidant activity, antimicrobial activity

Introduction

Propolis (bee glue) is one of the most valuable and unique bee products, possessing a wide range of biological activities. Propolis is a sticky resinous substance produced by honey bees (*Apis mellifera* L.), which serves mainly as a building material. Bees use it to fill cracks, to cover the internal hive walls, to repair and seal the honeycomb cells, and to embalm the carcasses of invaders who penetrated and died inside their hives, thus removing the unpleasant odor and bacterial flora accompanying their decomposition (Sforcin and Bankova, 2011; Wagh, 2013).

Propolis is a complex natural product that is collected and processed by honey bees from flowers, leaf buds and exudates of various tree species. In Europe, the primary sources of propolis are the resins of poplar (*Populus alba*, *P. tremula* and *P. nigra*), birch (*Betula pendula*), pine (*Pinus* spp.), spruce (*Picea* spp.), fir (*Abies* spp.), alder (*Alnus glutinosa*), willow (*Salix alba*), acacia (*Acacia* sp.), horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*), oak (*Quercus* spp.), ash (*Fraxi-*

nus spp.) etc. (Moise and Bobiş, 2020). To produce propolis, the worker bees transport the plant material to the hive and mix it with beeswax and saliva, thereby obtaining a highly adhesive substance. The color (green, brown, red or yellow), chemical composition and biological properties of propolis can vary greatly depending on the plant source and the characteristics of the geographic region from which it is obtained (Bankova et al., 2016). At present, more than 300 chemical compounds have been identified as constituents of propolis (Toreti et al., 2013). Raw propolis contains 50% plant resins, 30% waxes, 10% essential and aromatic oils, 5% pollen, and 5% other organic substances (Moise and Bobiş, 2020). Among the major components are polyphenols, presented mainly by flavonoids (flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, chalcones, dihydrochalcones, isoflavones, isodihydroflavones, flavans, isoflavans and neoflavonoids), followed by aromatic acids, aromatic esters, aliphatic acids, aliphatic esters, volatile compounds, aromatic compounds, hydrocarbons, steroids, enzymes, waxy acids, alcohols, alde-

hydres, ketones, amino acids, micro- and macro-nutrients, vitamins, essential oils, sugars, pollen and other organic matter (Sahinler and Kaftanoglu, 2005; Toreti et al., 2013; Huang et al., 2014; Pobiega et al., 2019). The rich chemical composition determines the diverse pharmacological properties of propolis. It has been found that propolis possesses antioxidant, immunomodulatory, anti-inflammatory, antimicrobial, antiviral, antiparasitic, anticarcinogenic, hepatoprotective, anti-ulcerogenic, anti-allergic, antidiabetic, astringent, anaesthetic and other beneficial biological activities (Salomao et al., 2004; Sforcin and Bankova, 2011; Toreti et al., 2013; Cauich-Kumul and Segura Campos, 2019).

The therapeutic effects of propolis and its use as a natural remedy have been known since antiquity. The ancient Egyptians, Persians, and Romans have used propolis as an embalming substance due to its anti-putrefactive properties, while Incas have used it as an anti-pyretic agent. The ancient Greek and Roman physicians Hippocrates, Aristoteles, Dioscorides, Pliny and Galen wrote about the healing properties of propolis and its application as an antiseptic, as a wound cicatrizant, and as a mouth disinfectant. In the Middle Ages, the interest in the use of propolis decreased, and resumed during the Renaissance, when it was recognized as an effective remedy for treatment of various diseases (Castaldo and Capasso, 2002; Martinotti and Ranzato, 2015). Nowadays, propolis is a popular remedy in the traditional and alternative medicine, commercially available in different forms such as capsules, ethanolic extracts (tinctures), mouthwash, throat lozenges, toothpastes, creams, and powders. In recent years, the biological properties of propolis attracted the research attention on its application in other fields of life and industry. The broad antimicrobial spectrum and antioxidant potential of propolis made this natural product perspective for application as a food additive, as a functional food ingredient, and as a means for food biopreservation prolonging the shelf-life or improving the quality of food products.

The aim of the present research was to evaluate the total phenolic content, the total flavonoids content, antioxidant properties and antimicrobial activity of some commercial ethanolic propolis extracts (tinctures) available on Bulgarian market.

Materials and methods

1. Materials

1.1. Propolis extracts

Five 30% ethanolic propolis extracts (tinctures) were purchased from drugstores, nutraceutical food stores and producers of bee products from different regions of Bulgaria. The commercial propolis extracts were designated as samples C1, C2, C3, C4 and C5. To conduct the experiments, the ethanol from the propolis extracts was evaporated, and then the dry substance was diluted with methanol.

1.2. Test microorganisms

Twenty-three microorganisms including nine Gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* - clinical isolate, *Bacillus amyloliquefaciens* 4BCL-YT, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* NBIMCC 8632, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Enterococcus faecium* ATCC 19434, *Micrococcus luteus* 2YC-YT), six Gram-negative bacteria (*Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella abony* NTCC 6017, *Klebsiella* sp. - clinical isolate, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Proteus vulgaris* ATCC 6380, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027), three yeasts (*Candida albicans* NBIMCC 74, *Candida utilis* ATCC 9950, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763) and five fungi (*Aspergillus niger* ATCC 1015, *Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. - plant isolates, *Fusarium moniliforme* ATCC 38932) from the collection of the Department of Microbiology at the University of Food Technologies - Plovdiv, Bulgaria, were selected for the antimicrobial activity test.

1.3. Culture media

1.3.1. Luria-Bertani agar medium supplemented with glucose (LBG agar)

LBG agar was prepared by the manufacturer's (Laboratorios Conda S.A.) prescription: 50 g of LBG-solid substance mixture (containing 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl, 10 g glucose and 15 g agar) was dissolved in 1 L of deionized water. The final pH was adjusted to 7.5, and then medium was autoclaved at 121°C for 20 min.

1.3.2. Malt extract agar (MEA)

This medium was prepared by the following prescription: 20 g malt extract, 20 g dextrose, 6 g peptone, and 15 g agar were dissolved in 1 L of deionized water. pH was corrected to 5.5, and then medium was autoclaved at 121°C for 20 min.

2. Methods

2.1. Total phenolic content

The reaction mixture contained 1 ml of Folin-Ciocalteu reagent, 0.8 ml of 7.5% sodium carbonate solution and 0.2 ml of the tested propolis extract. The mixture was left at room temperature for 20 min, in the dark. The absorbance was measured at 765 nm against a blank with distilled water. The results were expressed as mg equivalent of gallic acid (GAE) per g propolis (Ivanov et al., 2014).

2.2. Total flavonoids content

The reaction mixture (0.5 ml of the tested propolis extract, 0.05 ml of 10% aluminum nitrate solution and 0.05 ml of 1M potassium acetate solution) was left at 20-24°C for 40 min, and then the absorbance was measured at 415 nm against a blank. The results were calculated as mg equivalents quercetin (QE) per g propolis according to a calibration curve (Ivanov et al., 2014).

2.3. Antioxidant activity

2.3.1. DPPH radical-scavenging ability

The reaction mixture containing 2.85 ml of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH reagent) and 0.15 ml of the tested propolis extract was incubated at 37°C for 15 min, and then the absorbance was measured at 517 nm against methanol. The antioxidant activity was expressed as mM Trolox® equivalents (TE) per g propolis (Ivanov et al., 2014).

2.3.2. ABTS assay

The ABTS reagent was prepared according to the method of Ivanov et al., 2014. The reaction mixture contained 2.85 ml of ABTS+ solution and 0.15 ml of the tested propolis extract. The absorbance was measured at 734 nm against methanol after incubation at 37°C for 15 min, in the dark. The antioxidant activity was expressed as mM (TE)/g propolis by using a calibration curve.

2.3.3. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

The FRAP reagent was prepared immediately before use by mixing of 300 mM acetate buffer with pH 3.6, 10 mM 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) in 40 mM hydrochloric acid and 20 mM Iron (III) chloride hexahydrate in distilled water in a ratio of 10:1:1.

The reaction mixture (3 ml of FRAP reagent and 0.1 ml of the tested propolis extract) was incubated at 37°C for 10 min, in the dark. The absorbance was measured at 593 nm against a blank with water. The antioxidant activity was

presented as mM Trolox® equivalents (TE) per g propolis (Ivanov et al., 2014).

2.4. Antimicrobial activity

The antimicrobial activity of propolis extracts was determined by the agar well diffusion method. The test bacteria *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens* and *M. luteus* were cultured on LBG agar at 30°C. The test bacteria *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. enteritidis*, *S. abony*, *Klebsiella* sp., *E. coli*, *P. vulgaris* and *P. aeruginosa* were cultured on LBG agar at 37°C for 24 h. The yeasts *C. albicans* were cultured on MEA at 37°C, while *C. utilis* and *S. cerevisiae* were cultured on MEA at 30°C for 24 h. The fungi *A. niger*, *A. flavus*, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., and *F. moniliforme* were grown on MEA at 30°C for 7 days or until sporulation.

The inocula of test bacteria/yeasts were prepared by homogenization of a small amount of biomass in 5 ml of sterile 0.5 % NaCl. The inocula of test fungi were prepared by the addition of 5 ml of sterile 0.5 % NaCl into the tubes. After stirring by vortex, they were filtered and replaced in another tubes before use. The number of viable cells and fungal spores was determined using a bacterial counting chamber Thoma. Their final concentrations were adjusted to 1×10^8 cfu/ml for bacterial/yeasts cells, and 1×10^5 cfu/ml for fungal spores, and then inoculated in preliminarily melted and tempered at 45-48°C agar media. Next, the inoculated media were transferred in quantity of 18 ml in sterile Petri plates (d=90 mm) and allowed to harden. Then six wells (d=6 mm) per plate were cut. Triplicates of 60 µl of each propolis extract were pipetted into the agar wells.

The antimicrobial activity was determined by measuring the diameter of the inhibition zones around the wells on the 24-th and 48-th hour of incubation. Test microorganisms with inhibition zones of 18 mm or more were considered sensitive; moderately sensitive were those in which the zones were from 12 to 18 mm; resistant were those in which the inhibition zones were up to 12 mm or completely missing (Tumbariski et al., 2018).

2.5. Statistical analysis

Data from triplicate experiments were processed with MS Office Excel 2010 software, using statistical functions to determine the standard deviation ($\pm$ SD), and maximum estimation error at significance level $P < 0.05$.

Results and discussion

The results obtained for the total phenolic content (TPC) and total flavonoids of the tested commercial propolis extracts as well as for the

antioxidant activity (determined by the DPPH, ABTS and FRAP methods) are summarized in Table 1.

Table 1. TPC, total flavonoids and antioxidant activity of the tested commercial propolis extracts.

Commercial propolis extract	Total phenolic content (mg GAE/g propolis)	Total flavonoids (mg QE/g propolis)	DPPH (mM TE/g propolis)	ABTS (mM TE/g propolis)	FRAP (mM TE/g propolis)
C1	250.02 ± 2.37	157.30 ± 1.43	1443.50 ± 72.68	2025.23 ± 10.21	1320.17 ± 27.12
C2	193.74 ± 0.71	144.98 ± 3.30	1203.26 ± 24.64	1414.00 ± 79.87	1162.48 ± 50.48
C3	248.68 ± 25.20	134.74 ± 11.53	1711.83 ± 37.17	2366.36 ± 42.66	1478.05 ± 5.39
C4	216.87 ± 15.46	176.56 ± 2.72	1202.51 ± 13.14	2761.49 ± 64.64	1106.70 ± 28.60
C5	209.54 ± 12.63	130.60 ± 1.00	1288.94 ± 28.90	1979.00 ± 11.85	1304.20 ± 2.10

The highest values of total phenolic content were found in propolis extracts C1 and C3 (250.02 ± 2.37 and 248.68 ± 25.20 mg GAE/g propolis). The content of total polyphenols of the rest extracts C2, C4, and C5 was 193.74 ± 0.71, 216.87 ± 15.46, and 209.54 ± 12.63 mg GAE/g, respectively. In contrast, the highest value of total flavonoid content was detected in extract C4 (176.56 ± 2.72 mg QE/g propolis), followed by extract C1 with 157.30 ± 1.43 mg QE/g propolis. The propolis extracts C2, C3 and C5 exhibited lower flavonoid content in comparison with C1 and C4. The lowest value of total flavonoids was obtained for the extract C5 (130.60 ± 1.00 mg QE/g propolis).

The contents of total phenols and total flavonoids in the Bulgarian commercial samples of propolis were close to those of propolis extracts originating from different regions of Guanajuato, Mexico (Zarate et. al., 2018). The amount of total phenols of our samples was higher in comparison with propolis extracts from various regions of Poland, in which the TPC varied between 150.05 ± 0.93 and 197.14 ± 9.39 mg GAE/g propolis. The total flavonoids content of the Polish samples ranged from 35.64 ± 2.23 to 62.04 ± 2.17 mg QE/g propolis, which was several times lower than that of our samples (Socha et al., 2014). The observed variations in the contents of polyphenols and flavonoids are due to the difference in the chemical composition of propolis, which depends on the flora of the certain geographic region (Bankova, 2005).

The antioxidant activity of commercial propolis extracts was evaluated by three methods based on different mechanisms – DPPH, ABTS

(mixed hydrogen atom transfer and single electron transfer mechanisms), and FRAP (single electron transfer mechanism).

The results obtained from the DPPH method showed that commercial propolis extract C3 possessed highest antioxidant activity (1711.83 ± 37.17 mM TE/g propolis), while the commercial propolis extracts C1, C2, C4, and C5 exhibited lower DPPH values. In contrast, the results from the ABTS assay revealed that propolis extract C4 had the highest antioxidant activity (2761.49 ± 64.64 mM TE/g propolis), while the rest propolis extracts C1, C2, C3, and C5 were characterized by lower ABTS radical scavenging activity.

The results obtained by the FRAP method demonstrated that propolis extract C3 possessed the highest ferric reducing ability (1478.05 ± 5.39 mM TE/g propolis), followed by the extracts C1 and C5, while the extracts C2 and C4 had a lowest FRAP activity (Table 1).

The relationship between the antioxidant activity determined by the three methods (DPPH, ABTS and FRAP) and the TPC values of the five commercial propolis extracts is presented in Fig. 1A, 1B and 1C. The obtained results revealed a positive linear correlation (R^2) between the antioxidant activity and the TPC. The results showed also a high correlation between the TPC and the DPPH assay - $R^2=0.6939$ (Fig. 1A), a medium correlation between the TPC and the FRAP assay - $R^2=0.4917$ (Fig. 1C), and a low correlation between the TPC and the ABTS assay - $R^2=0.2046$ (Fig. 1B). Consequently, the TPC contributes to the antioxidant properties of the tested commercial propolis extracts.

Mihai et. al. (2011) examined twenty propolis samples collected in Transylvania, Romania, and reported significantly lower TPC content (between 24.46 ± 0.91 and 62.39 ± 2.02 g standard mixture/100 g propolis) as well as lower DPPH activity (0.29 ± 0.10 – 1.24 ± 0.01 mM TE/g propolis) and FRAP values (0.74 ± 0.05 - 2.54 ± 0.10 mM $\text{Fe}^{\text{II}}\text{SO}_4/\text{g}$ propolis) compared to the results obtained for our propolis extracts. The same authors found a positive correlation

between the concentration of TPC and DPPH values ($R^2=0.8387$), and TPC and FRAP values ($R^2=0.3522$). In this regard, Silva et al. (2006) analysed 49 ethanolic commercial Brazilian propolis extracts and observed a positive correlation between their DPPH ability and total phenolic and flavonoid levels. The same trend in 20 ethanolic Chinese propolis extracts was reported by Ahn et al. (2007).

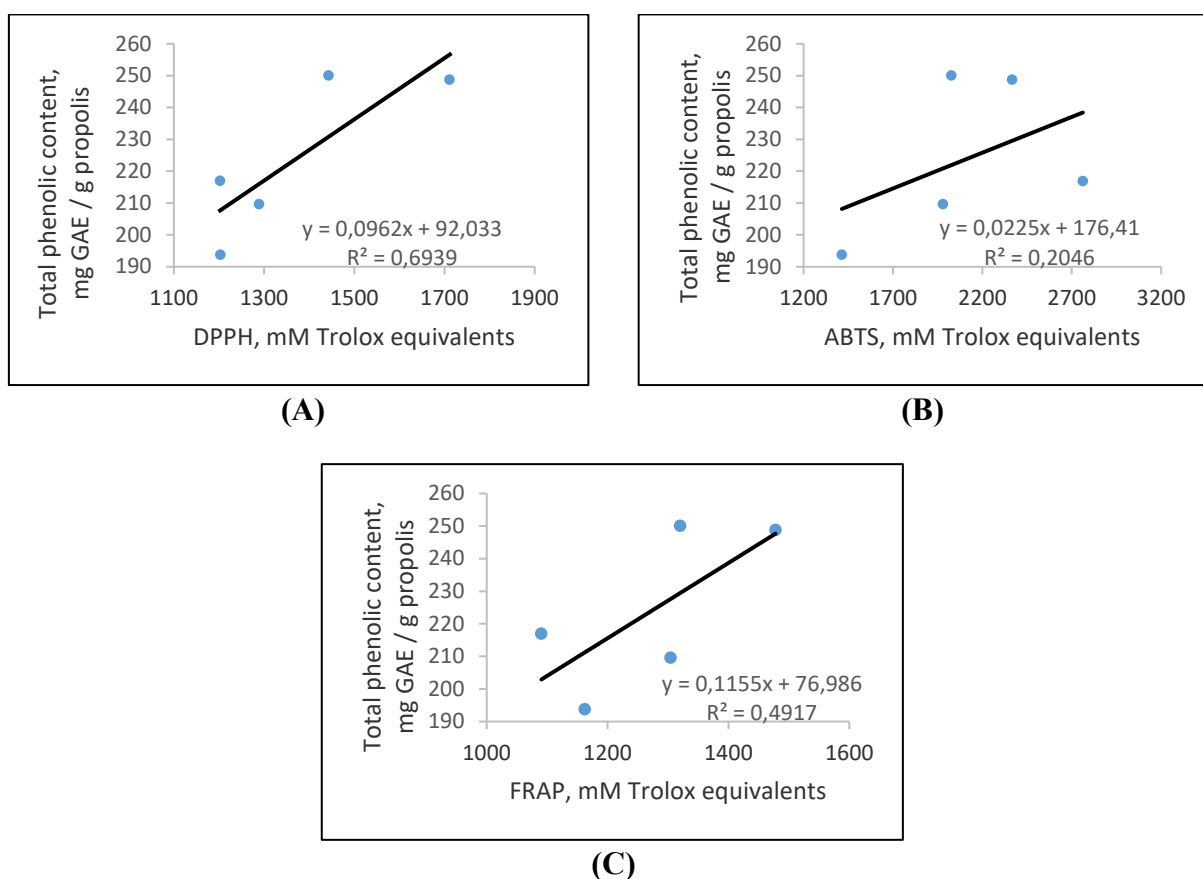


Figure 1. Linear correlations between DPPH (A), ABTS (B), FRAP (C) values and the total phenolic content (TPC) values of the tested commercial propolis extracts.

As seen from the results presented in Table 2, the commercial propolis extracts used in the present study showed similar antimicrobial properties. All propolis extracts demonstrated highest antimicrobial activity against Gram-positive bacteria. The inhibitory effect was most pronounced on *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* 2YC-YT, and foodborne pathogens *S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes* NBIMCC 8632 and *L. innocua* ATCC 33090. The antimicrobial activity against *B. amyloliquefaciens* 4BCL-YT, *E. faecalis* ATCC 19433 and *E. faecium* ATCC 19434 was moderate. All tested propolis extracts were inactive against *B. cereus*. Regarding the

Gram-negative bacteria, all tested propolis extracts exhibited moderate antimicrobial activity against *S. enteritidis* ATCC 13076 and *E. coli* ATCC 8739, and low antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (except of extract C1, which had no inhibitory effect on *P. aeruginosa*). None of the examined propolis extracts inhibited the Gram-negative *S. abony* NTCC 6017, *Klebsiella* sp., and *P. vulgaris* ATCC 6380. Moderate inhibitory effect of all propolis extracts on the yeasts *C. albicans* NBIMCC 74, *C. utilis* ATCC 9950, and *S. cerevisiae* ATCC 9763, and the fungi *A. niger* ATCC 1015, *A. flavus*, *Penicillium* sp., and *F. monili-*

forme ATCC 38932 was observed. None of the tested propolis extracts inhibited the growth of the fungus *Rhizopus* sp. Methanol (MeOH) used

as a solvent after the evaporation of ethanol from the propolis extracts did not show antimicrobial effect.

Table 2. Antimicrobial activity of the examined commercial propolis extracts.

Test microorganism	Commercial propolis extracts					MeOH*
	C1	C2	C3	C4	C5	
Gram (+) bacteria						
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	16	19	18	17	18	-
<i>Bacillus cereus</i> **	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 4BCL-YT	14	15	14	13	15	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25	26	24	21	25	-
<i>Listeria monocytogenes</i> NBIMCC 8632	20	21	18	16	18	-
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	18	20	17	14	19	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	15	15	13	12	15	-
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434	14	15	13	13	15	-
<i>Micrococcus luteus</i> 2YC-YT	18	20	18	17	19	-
Gram (-) bacteria						
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	14	16	16	13	14	-
<i>Salmonella abony</i> NTCC 6017	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i> sp.**	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	14	17	14	13	16	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	9	9	10	9	-
Yeasts						
<i>Candida albicans</i> NBIMCC 74	12	11	10	10	12	-
<i>Candida utilis</i> ATCC 9950	12	13	10	10	12	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	15	14	12	10	12	-
Fungi						
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015	13	14	13	11	14	-
<i>Aspergillus flavus</i> ***	13	13	10	8	14	-
<i>Penicillium</i> sp.***	12	14	12	11	13	-
<i>Rhizopus</i> sp.***	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium moniliforme</i> ATCC 38932	13	13	11	10	12	-

Legend: * control (methanol); **clinical isolate; ***plant isolate; d_{well}=6mm.

It was found that the antimicrobial activity of propolis is higher against Gram-positive bacteria than Gram-negative ones. This is because the outer membranes of Gram-negative bacteria produce some hydrolytic enzymes, which break the active compounds of propolis (Sforcin, 2016). Do Nascimento et al. (2018) examined four commercial extracts from brown and red propolis from Brazil, and stated that all extracts possessed high antimicrobial activity against *S. aureus* ATCC 25923 (inhibition zones 16-25 mm), but moderate activity against *P. aeruginosa* ATCC 27853 (inhibition zones 8-12 mm), which is comparable to our results from antimicrobial screening. Curifuta et al. (2012) investigated the

antifungal activity of six commercial ethanolic extracts of Chilean propolis, and ascertained that EEP-3 extract had the highest total polyphenols and flavonoids contents, and effectively inhibited the mycelial growth of the tested fungi *Alternaria alternata*, *Fusarium* sp., *Ulocladium* sp., *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Trichoderma reesei*.

Tosi et al. (1996) examined the antimicrobial activity of commercial propolis extracts (30%) prepared with different solvents – ethanol, glycerol, propylene glycol and blended oil of edible cereals. All propolis preparations exhibited inhibitory activity, particularly against Gram-positive bacteria (*S. aureus*, *Sarcina lutea*),

yeasts (*Candida albicans*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*) and dermatophytes (*Microsporum cookie*, *Nannizia cajetani*) with zones of inhibition ranging from 3 to 30 mm in diameter. Against yeasts and dermatophytes, oil, ethanol and propylene glycol solutions showed an inhibition for more than 2 weeks, while the glycerine maintained inhibition only for some days. The authors concluded that the nature of the solvent used for the extraction may enhance the potency of the antimicrobial activity of propolis.

Quintero-Mora et al. (2008) evaluated the antifungal activity of four propolis ethanolic extracts from three different Mexican states, and four commercial extracts on the growth of *Candida albicans* ATCC 10231 (a reference strain) and 36 clinical isolates of *C. albicans*. The authors stated that propolis ethanolic extract obtained from Cuautitlán Izcalli, State of Mexico, showed the highest antimicrobial activity, inhibiting 94.4% from the clinical isolates at concentration of 0.8 mg/ml, while the reference strain was inhibited at 0.6 mg/ml. In addition, the commercial propolis preparations also showed high inhibitory activity against *C. albicans*.

Conclusion

The current research provides information about the biological activity of five commercial ethanolic propolis preparations, available on Bulgarian market. The study clarifies the content of polyphenols and flavonoids, as well as their relationship with the antioxidant properties and antimicrobial activity of the extracts. This is the first study concerning Bulgarian commercial propolis preparations, and the obtained results revealed their great antioxidant potential and antimicrobial capacity, which can have significant health benefits after their application.

References

1. Ahn M. R., S. Kumazawa, Y. Usui, J. Nakamura, M. Matsuka, F. Zhu, T. Nakayama, 2007 "Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China", *Food Chemistry*, 101, pp. 1383-1392.
2. Bankova V., 2005 "Recent trends and important developments in propolis research", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), pp. 29-32.
3. Bankova V., M. Popova, B. Trusheva, 2016 "New emerging fields of application of propolis", *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 35(1), pp. 1-11.

4. Castaldo S., F. Capasso, 2002 "Propolis, an old remedy used in modern medicine", *Fitoterapia*, 73, pp. S1-S6.

5. Cauch-Kumul R., M. R. Segura Campos, 2019 "Bee Propolis: Properties, Chemical Composition, Applications, and Potential Health Effects", In: *Bioactive Compounds*, pp. 227-243.

6. Curifuta M., J. Vidal, J. Sánchez-Venegas, A. Contreras, L. A. Salazar, M. Alvear, 2012 "The *in vitro* antifungal evaluation of a commercial extract of Chilean propolis against six fungi of agricultural importance", *Ciencia e Investigacion Agraria*, 39(2), pp. 347-359.

7. Do Nascimento T. G., A. dos S. Silva, P. B. Lessa Constant, S. A. S. da Silva, M. A. B. Fidelis de Moura, C. P. de Almeida, V. da Costa Silva, A. B. Wanderley, I. D. Basilio, P. B. Escodro, 2018 "Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of some commercial extract of propolis", *Journal of Apicultural Research*, 57(2), pp. 246-254.

8. Huang S., C.-P. Zhan, K. Wang, G. Li, F.-L. Hu, 2014 "Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis", *Molecules*, 19(12), pp. 19610-19632.

9. Ivanov I. G., R. Z. Vrancheva, A. S. Marchev, N. T. Petkova, I. Y. Aneva, P. P. Deney, V. G. Georgiev, A. I. Pavlov, 2014 "Antioxidant activities and phenolic compounds in Bulgarian *Fumaria* species", *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2), pp. 296-306.

10. Martinotti S., E. Ranzato, 2015 "Propolis: a new frontier for wound healing?", *Burns & Trauma*, 3(1), pp. 1-7.

11. Mihai C. M., L. A. Mărghitaş, D. Dezmirean, L. Bărnăuţiu, 2011 "Correlation between Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity of Propolis from Transylvania", *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 44(2), pp. 100-103.

12. Moise A. R., O. Bobiş, 2020 "*Baccharis dracunculifolia* and *Dalbergia ecastophyllum*, Main Plant Sources for Bioactive Properties in Green and Red Brazilian Propolis", *Plants*, 9(11), pp. 1619.

13. Pobiega K., K. Kraśniewska, M. Gniewosz, 2019 "Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – a review", *Trends in Food Science & Technology*, 83, pp. 53-62.

14. Quintero-Mora M. L., A. Londoño-Orozco, F. Hernández-Hernández, P. Manzano-Gayosso, R. López-Martínez, C. I. Soto-Zárate, L. Carrillo-Miranda, G. Penieres-Carrillo, C. G.

- García-Tovar, T. A. Cruz-Sánchez, 2008 “Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*”, *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(1), pp. 22–26.
15. Sahinler N., O. Kaftanoglu, 2005 “Natural product propolis: chemical composition”, *Natural Product Research*, 19(2), pp. 183–188.
16. Salomao K., A. P. Dantas, C. M. Borba, L. C. Campos, D. G. Machado, F. R. Aquino Neto, S. L. Castro, 2004 “Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis”, *Letters in Applied Microbiology*, 38(2), pp. 87–92.
17. Sforcin J. M., V. Bankova, 2011 “Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?”, *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), pp. 253–260.
18. Sforcin J. M., 2016 “Biological properties and therapeutic applications of propolis”, *Phytotherapy Research*, 30, pp. 894–905.
19. Silva J. F. M., M. C. Souza, S. R. Matta, M. R. Andrade, F. V. N. Vidal, 2006 “Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities”, *Food Chemistry*, 99, pp. 431–435.
20. Socha R., D. Gałkowska, M. Bugaj, L. Juszcak, 2014 “Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland”, *Natural Product Research*, 29(5), pp. 416–422.
21. Toreti V. C., H. H. Sato, G. M. Pastore, Y. K. Park, 2013 “Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, Article ID 697390, pp. 1–13.
22. Tosi B., A. Donini, C. Romagnoli, A. Bruni, 1996 “Antimicrobial Activity of Some Commercial Extracts of Propolis Prepared with Different Solvents”, *Phytotherapy Research*, 10(4), pp. 335–336.
23. Tumbarski Y., I. Deseva, D. Mihaylova, M. Stoyanova, L. Krastev, R. Nikolova, V. Yanakieva, I. Ivanov, 2018 “Isolation, Characterization and Amino Acid Composition of a Bacteriocin Produced by *Bacillus methylotrophicus* Strain BM47”, *Food Technology and Biotechnology*, 56(4), pp. 546–552.
24. Wagh V. D., 2013 “Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials”, *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013, Article ID 308249, pp. 1–11.
25. Zarate M. S. H., M. R. A. Juárez, A. C. García, C. O. López, A. J. G. Chávez, J. J. N. S. Garfias, F. A. Ramos, 2018 “Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico”, *Food Science and Technology*, 38(2), pp. 210–215.

Mariyana Topuzova
University of Food Technologies,
Department of Organic Chemistry and Inorganic Chemistry
26 Maritza Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria
E-mail: marianagt@mail.bg

Mina Todorova
University of Food Technologies,
Department of Organic Chemistry and Inorganic Chemistry
26 Maritza Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria
E-mail: mm_todorova@abv.bg

Yulian Tumbarski
University of Food Technologies,
Department of Microbiology,
26 Maritza Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria
E-mail: tumbarski@abv.bg

Nadezhda Petkova
University of Food Technologies,
Department of Organic Chemistry and Inorganic Chemistry
26 Maritza Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria
E-mail: petkovanadejda@abv.bg

Ivan Ivanov
University of Food Technologies,
Department of Organic Chemistry and Inorganic Chemistry
26 Maritza Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria
E-mail: ivanov_ivan.1979@yahoo.com



АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ НА НЯКОИ ЕТЕРИЧНИ МАСЛА, ИЗПОЛЗВАНИ В КУЛИНАРИЯТА И БИОКОНСЕРВИРАНЕТО НА ХРАНИ СПРЯМО ПРЕДСТАВИТЕЛИ НА СТОМАШНО-ЧРЕВНАТА МИКРОБИОТА

Юлиан Тумбарски, Иванела Чолакова, Ремзи Чолаков, Надежда Петкова, Иван Иванов, Павел Мерджанов, Николай Панайотов и Александър Траянов

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SOME ESSENTIAL OILS USED IN THE CULINARY AND FOOD BIOPRESERVATION AGAINST REPRESENTATIVES OF THE GASTROINTESTINAL MICROBIOTA

Yulian Tumbarski, Ivanela Cholakova, Remzi Cholakov, Nadezhda Petkova, Ivan Ivanov, Pavel Merdzhanov, Nikolay Panayotov and Alexander Trayanov

ABSTRACT: Essential oils are aromatic and volatile liquids produced from different parts of the plants - flowers, roots, stems, barks, leaves, seeds, peels, fruits, or from whole plants. They are widely used in the culinary as spices or flavouring additives enhancing the sensory features of foods, in the perfume industry as fragrances, and in the folk and traditional medicine for treatment of various diseases. The broad antimicrobial spectrum and antioxidant potential of essential oils have focused the research attention on their application in food biopreservation as means of prolonging the shelf-life and improving the food quality and safety. The aim of the present study was to examine the antimicrobial activity of thirteen essential oils (ginger, clove, cinnamon, basil, cardamom, cumin, coriander, rosemary, dill, black pepper, spearmint, orange and carrot seed) used in the culinary and food biopreservation against some representatives of the gastrointestinal microbiota. The obtained results demonstrated that the essential oils of cinnamon, cardamom, rosemary, dill and carrot seed at concentration of 10 mg/ml were characterized by the highest antimicrobial activity against the microorganisms used in the study. The values of minimum inhibitory concentration (MIC) of the essential oils varied widely – from 10 mg/ml to 0.313 mg/ml, depending on the test microorganism.

Key words: essential oils, antimicrobial activity, food biopreservation, gastrointestinal microbiota

Introduction

Essential oils (EOs) are aromatic and volatile liquids produced from different parts of the plants - flowers, roots, stems, barks, leaves, seeds, peels, fruits, or from whole plants (Hyldgaard et al., 2012), and stored in secretory cells, cavities, canals, epidermic cells or glandular trichomes (Teixeira et al., 2013). They are synthesized by more than 17,000 higher aromatic plants belonging to the angiospermic families *Lamiaceae*, *Rutaceae*, *Myrtaceae*, *Zingiberaceae* and *Asteraceae* (Regnault-Roger et al., 2012).

EOs are multicomponent, water insoluble mixtures of polar and nonpolar natural compounds such as terpenes (monoterpenes and sesquiterpenes), aromatic compounds (aldehydes, alcohols, phenols, methoxy derivatives) and terpenoids (isoprenoids) (Tongnuanchan and Benjakul, 2014). The rich chemical composition

of EOs determines their antimicrobial, antiviral, antioxidant, antiparasitical, insecticidal and other biological activities, which find medical, cosmetic, agricultural and food applications (Prakash et al., 2015). Some EOs extracted from vegetable seeds are rich in proteins and vitamins (Bhavaniramya et al., 2019), and their addition to various food matrices can increase the nutritional value of the products.

EOs are widely used for many centuries in the culinary as spices or flavouring additives enhancing the sensory features of foods, in the perfume industry as fragrances, and in the folk and traditional medicine for treatment of various diseases. The broad antimicrobial spectrum and antioxidant potential of EOs have focused the research attention on their application in food biopreservation as means of prolonging the shelf-life and improving the food quality and safety (Calo et al., 2015). In this regard, the EOs can be considered as an alternative to the chemical

preservatives, which are associated with various harmful effects on the human health. The lipid oxidation and microbial spoilage are the major factors responsible for the deterioration of quality and reduction of the shelf-life of foods, leading to a risk for the consumers and economic losses for the manufacturers (Ribeiro-Santos et al., 2017). These important problems in the food industry could be overcome by appropriate selection and optimised application of EOs and their combinations as biopreservatives in the food products.

The application of EOs as substitutes of synthetic preservatives requires knowledge of their chemical composition, physicochemical properties, and possible interactions with food ingredients. The effectiveness of EOs as antimicrobial agents might be reduced by some food components (fats, proteins, carbohydrates, minerals) or pH value (Perricone et al., 2015). For example, the high levels of fat and/or protein in foods protect bacteria from the action of the EOs (Gutierrez et al., 2008). On the other hand, the use of higher doses of EOs in order to increase their antimicrobial effect, could have a negative impact on the organoleptic properties of food due to their strong smells (Tserennadmid et al., 2010). To avoid these limitations and to enhance the antimicrobial activity of EOs in food systems, several novel approaches have been developed such as their use in additive or synergic combinations (Bassolé and Juliani, 2012); encapsulation into nanoemulsions as delivery systems for application in various food matrices (Donsi et al., 2011; Prakash et al., 2018); incorporation in biodegradable films and coatings for active food packaging (Atarés and Chiralt, 2016).

At present, the information about antimicrobial effects of EOs on the gastrointestinal microflora and its pathogenic and especially beneficial members is very limited. Therefore, the aim of the present study was to examine the antimicrobial activity of some essential oils used in the culinary and food biopreservation against some representatives of the gastrointestinal microbiota.

Materials and method

1. Materials

1.1. Essential oils

Thirteen EOs obtained from ginger (*Zingiber officinale*), clove (*Syzygium aromaticum*), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), basil (*Ocimum basilicum*), cardamom (*Elettaria cardamomum*), cumin (*Cuminum cyminum*),

coriander (*Coriandrum sativum*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*), dill (*Anethum graveolens*), black pepper (*Piper nigrum*), spearmint (*Mentha spicata*), orange (*Citrus sinensis*) and carrot seed (*Daucus carota* subsp. *sativus* variety Tucson) were tested in the present study. The EOs were isolated by steam distillation for 3 h using a glass Clevenger-type apparatus. The extracted EOs were dried over anhydrous Na₂SO₄, and then stored in sealed dark glass vials under refrigerated conditions (4°C) for further analysis.

1.2. Test microorganisms

Ten microorganisms including five Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecium* ATCC 19434, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Lactobacillus brevis* ATCC 14869, *Lactobacillus acidophilus* RC2 – isolated from fermented cucumbers), four Gram-negative bacteria (*Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Proteus vulgaris* ATCC 6380, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027), and yeasts *Candida albicans* NBIMCC 74 from the collection of the Department of Microbiology at the University of Food Technologies - Plovdiv, Bulgaria, were selected for the antimicrobial activity test.

1.3. Culture media

1.3.1. Luria-Bertani agar medium supplemented with glucose (LBG agar)

LBG agar was prepared by the manufacturer's (Laboratorios Conda S.A.) prescription: 50 g of LBG-solid substance mixture (containing 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl, 10 g glucose and 15 g agar) was dissolved in 1 L of deionized water. The final pH was adjusted to 7.5, and then medium was autoclaved at 121°C for 20 min.

1.3.2. de Man, Rogosa and Sharpe agar medium (MRS agar)

MRS agar is a selective culture medium designed for cultivation of Lactobacilli. The medium was prepared by the manufacturer's (Merck, Germany) prescription: 55.2 g of MRS broth (containing 10 g peptone, 5 g yeast extract, 10 g beef extract, 20 g glucose, 2 g potassium phosphate, 5 g sodium acetate, 0.2 g magnesium sulphate, 0.05 g manganese sulfate, 1 g Tween 80 and 2 g ammonium citrate) was dissolved in 1 L of deionized water. The final pH was adjusted to 6.4, and then 15 g of agar (Sigma-Aldrich)

was added. The medium was autoclaved at 121°C for 15 min.

2. Methods

2.1. Antimicrobial activity test

The test bacteria and yeast were cultivated on LBG agar at 37°C for 24 h, except of *L. brevis* ATCC 14869 and *L. acidophilus* RC2, which were cultivated on MRS agar at 37°C for 24 h. In order to prepare bacterial/yeast inocula, a small amount of biomass of each test microorganism was suspended in 5 ml of sterile 0.5% NaCl, and then vortexed for 10-15 s. The number of viable cells in each inoculum was determined using the bacterial counting chamber Thoma, and the final concentration was adjusted to 1.0×10^8 cfu/ml. Next, bacterial/yeast inocula were dissolved in preliminarily melted and tempered at 45–48°C LBG and MRS agar media. The inoculated agar media were transferred in quantity of 18 ml in sterile Petri plates and allowed to harden. Then six wells (d=6 mm) per plate were cut.

The EOs were diluted in methanol in concentration of 10 mg/ml, and then a quantity of 60 µl of each sample was pipetted into the agar wells. The antimicrobial activity was determined by measuring the diameter of the inhibition zones around the wells on the 24-th and 48-th h of incubation. Test microorganisms with inhibition zones (IZ) of 18 mm or more were considered sensitive; moderately sensitive were those in which the zones were from 12 to 18 mm; resistant were those in which the inhibition zones were up to 12 mm or completely missing (Tumbariski et al., 2017).

2.2. Minimum inhibitory concentration

The minimum inhibitory concentration (MIC) of the EOs was determined by the dilution method. Two-fold serial dilutions of each EO in methanol, ranging from 10 mg/ml to 0.078 mg/ml were prepared. The samples were pipetted in quantity of 60 µl per well in a preliminarily inoculated with test microorganisms LBG and MRS agar media. The Petri plates were incubated at 37°C for 48 h. The MIC value was determined as the lowest concentration of the EO inhibiting completely the growth of the test microorganism around the agar well (Tumbariski et al., 2017).

Results and discussion

The results from the antimicrobial screening and determination of MIC values are summarized in Tables 1 and 2.

As seen from the results presented in Table 1, the EO of cinnamon exhibited the highest antimicrobial activity, inhibiting all of the test microorganisms. The antimicrobial effect on *E. faecalis*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *Proteus vulgaris* and *C. albicans* was strong (IZ >18 mm), while on the rest microorganisms – *S. aureus*, *E. faecium*, *L. brevis*, *L. acidophilus* and *P. aeruginosa* was moderate (IZ of 12-18 mm).

Cinnamon is a valuable spice, originating from Sri Lanka that has been used for centuries as a flavourant, a colourant, a food biopreservative, as well as for many medicinal purposes due to its antioxidant properties and antimicrobial activity (Thomas and Kuruvilla, 2012). The antimicrobial activity of cinnamon EO has been studied by many researchers. Unlu et al. (2010) found that EO of cinnamon possessed high antimicrobial activity against a wide spectrum of microorganisms, including Gram positive bacteria *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 6057 and Gram negative bacteria *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *P. aeruginosa* ATCC 27853. The authors stated that cinnamon EO was also highly effective against four *Candida* species. Similar findings were reported by Zhang et al. (2016) who observed that cinnamon EO effectively inhibited *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 25923. The MIC of cinnamon EO for both test bacteria was 1.0 mg/ml, which is comparable with our results. Babu et al. (2011) examined the antimicrobial activity of different EOs, and found that EO of cinnamon possessed strong inhibitory effect on the test microorganisms *E. coli* MTCC 452, *S. aureus* MTCC 3103, *S. typhimurium* MTCC 1251, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* and Methicillin resistant *S. aureus*. The antimicrobial activity of cinnamon EO was studied also by Andrade et al. (2013) who confirmed its high efficacy against 11 strains of *S. aureus*, 11 strains of *E. coli* and 10 strains of *P. aeruginosa*.

The EO of cardamom demonstrated high antimicrobial activity against *S. aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. enteritidis*, *E. coli* and *P. vulgaris*. The inhibitory activity against *L. acidophilus* and *C. albicans* was assessed as moderate, while against *P. aeruginosa* was low. The EO of cardamom did not inhibit *L. brevis* (Table 1).

Cardamom, popularly known as “Queen of Spices” is one of the most expensive spices in the world. Cardamom is native to India and is well known for its pharmacological properties

and culinary applications (Parthasarathy and Prathasath, 2012). In recent years, the biological activities of cardamom have attracted the research attention, which led to intensive studies on its antimicrobial potential. Singh et al. (2007) reported that EO of cardamom exhibited high antibacterial activity against the food-borne pathogens *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* and *Salmonella typhi* at concentration of 3000 ppm, and lower inhibitory activity at 1000 ppm. Bano et al. (2016) found that EO of cardamom exhibited high antimicrobial activity against enteropathogenic *E. coli* - EPEC (IZ of 20.3 mm) and moderate antibacterial activity against *L. monocytogenes* and *Bacillus pumilus*.

The EO of rosemary showed strong inhibitory effect only on *P. vulgaris*. Regarding the test microorganisms *S. aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. enteritidis*, *E. coli* and *C. albicans* the antimicrobial effect was moderate. The antimicrobial activity against *L. acidophilus* and *P. aeruginosa* was low (IZ <12 mm), while *L. brevis* was not inhibited (Table 1).

Rosemary is an aromatic evergreen plant, originating from the Mediterranean region, and widely used as a spice, flavouring agent and for many medical applications (Senanayake, 2018). Rosemary is a rich source of biologically active compounds, therefore it possesses promising antimicrobial properties. EO of rosemary was reported as an important antimicrobial agent inhibiting the growth of *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* and *Klebsiella pneumoniae* at very low concentrations (Stojanović-Radić et al., 2010). Pintore et al. (2001) compared the antimicrobial activity of two kinds of rosemary EO - from Sardinia and Corsica. The authors determined that Gram-positive bacteria used in the experiment were more sensitive (MIC 2.5–4 mg/ml) than Gram-negative bacteria. Bosnić et al. (2006) evaluated the antibacterial effects of different EOs, and found that rosemary EO had the highest inhibitory activity against *Bacillus subtilis* (IZ of 20 mm), followed by *S. aureus* (IZ of 15.9 mm), *E. coli* (IZ of 13 mm) and *P. aeruginosa* (IZ of 9 mm), which was in accordance with our results.

The EO of dill exhibited antimicrobial activity similar to that of rosemary. This EO was characterized by the highest inhibitory activity against *P. vulgaris*. Against *S. aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. enteritidis*, *E. coli* and *C. albicans* the antimicrobial activity was moderate. The antimicrobial activity against *L. brevis*, *L.*

acidophilus and *P. aeruginosa* was low (Table 1).

Dill is a herbaceous annual plant, originating from Asia and the Mediterranean area. Dill has been known from ancient times, and its valuable properties have been given by its essential oil, presented in all parts of the plant. The EOs of different dill plant parts are excessively used in many applications of the spice and food industry, especially for their pleasant aroma. Numerous studies revealed the antimicrobial potential of dill EO against a wide range of saprophytic and pathogenic microorganisms as *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *S. aureus* ATCC 6538 P, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa*, *Salmonella abony* NCTC 6017, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 and *C. albicans* ATCC 10231 (Jirovetz et al., 2003). According to Dimov et al. (2017) EOs of dill exhibited strong antimicrobial effect on *S. aureus* ATCC 6538 and *Micrococcus luteus* ATCC 9341, and moderate effect on *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* and *S. abony* NTCC 6017, which corresponded to our results.

The EO obtained from carrot seed possessed highest inhibitory activity against *S. aureus*. Against *C. albicans* the antimicrobial activity was moderate. Regarding the rest of the microorganisms - *E. faecium*, *E. faecalis*, *L. brevis*, *L. acidophilus*, *S. enteritidis*, *E. coli* and *P. vulgaris*, the inhibitory effect was weak, except of *P. aeruginosa*, which was not inhibited (Table 1).

Carrot seed essential oil (CSEO) is a common fragrance component in cosmetics and perfumes, and a flavour ingredient in different food products. In traditional medicine its tonic properties are widely used for treatment of digestive disorders. The analgesic and anti-inflammatory properties of CSEO are very effective in the treatment of joint diseases (Sieniawska et al., 2016). CSEO is also known for its antimicrobial properties, being able to inhibit the growth of various microorganisms such as *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* and *C. albicans* (Rokbeni et al., 2013). The same authors reported the highest antimicrobial activity against *S. aureus* and *C. albicans*, which was in accordance with our results.

The antimicrobial activity of the other EOs was found significantly lower. The EO of clove (a spice native to Indonesia, and used as a food biopreservative and a medicine) exhibited moderate antimicrobial activity only against *S. aureus* and *C. albicans*, while against *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *P. vulgaris* and *P.*

aeruginosa the activity was low. *L. brevis* and *L. acidophilus* were not inhibited (Table 1).

Similar results were obtained by Hossain et al. (2014), who examined three clove EOs from Saudi Arabia (SA), United Arab Emirates (UAE) and Jordan. The authors found that clove EOs (at concentrations of 2, 1 and 0.5 mg/ml) had weak antimicrobial activity against *E. coli* ATCC 9637 and *S. aureus* ATCC 29213. The EOs from SA and UAE (0.25 mg/ml) and the EO from Jordan (2 mg/ml) exhibited higher antimicrobial activity against *S. aureus*. None of the clove EOs inhibited *P. aeruginosa* ATCC 9027.

The EOs of basil and spearmint demonstrated identical results from the antimicrobial test. Basil EO had weak inhibitory effect on *S. aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*, while the EO of spearmint exhibited weak antimicrobial activity only against *S. aureus*, *E. faecium*, *L. brevis*, *P. vulgaris* and *C. albicans* (Table 1).

Similar to our results were obtained by Özcan and Erkmén (2001), who evaluated the antimicrobial activity of EOs of Turkish plant spices, and determined that basil EO at concentrations of 1, 10 and 15% inhibited the growth of *E. faecalis* KUEN 1514, *S. aureus* ATCC 27706, and *Yersinia enterocolitica* 03. The spearmint EO at the same concentrations had no inhibitory effect on the used test microorganisms.

The next four EOs demonstrated low antimicrobial activity. The EO of ginger had weak inhibitory effect on *S. aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. enteritidis*, *E. coli* and *P. aeruginosa*. The EO of cumin inhibited the growth of *S. aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. The EO of coriander possessed weak antimicrobial effect on *E. faecium*, *E. faecalis*, *L. acidophilus*, *E. coli*, *P. vulgaris* and *C. albicans*. The EO of black pepper inhibited test microorganisms *S.*

aureus, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. enteritidis*, *P. vulgaris* and *C. albicans* (Table 1). Our results confirmed the low antimicrobial activity of ginger, cumin, black pepper and coriander EOs as previously reported by some other authors (Zai-ka, 1988; Teneva et al., 2015).

The EO obtained from orange showed limited antimicrobial activity. Orange EO had moderate inhibitory activity against *S. aureus*, and weak inhibitory effect on the test microorganisms *E. coli*, *P. vulgaris* and *C. albicans* (Table 1).

According to the results obtained by Bozkurt et al. (2017) who investigated the antimicrobial activity of EOs of different citrus fruits, the orange EO demonstrated weak inhibitory effect on *E. coli* (similar to our results), *B. cereus*, *S. aureus* and *E. faecalis*, and moderate effect on *L. monocytogenes*. The orange EO was ineffective against *S. typhimurium*.

The MIC values of the EOs varied widely – from 10 mg/ml to 0.313 mg/ml, depending on the test microorganism (Table 2). Methanol (MeOH) used as a solvent of EOs and a control did not show antimicrobial effect.

Conclusion

The obtained results demonstrated that the essential oils of cinnamon, cardamom, rosemary, dill and carrot seed were characterized by the highest antimicrobial activity. Moreover, the inhibitory effect was expressed mainly on pathogenic bacteria, while beneficial members of the gastrointestinal microbiota such as *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus acidophilus* were relatively resistant, which can be emphasized as a positive property as well as a contribution to the knowledge of essential oils. Consequently, these essential oils can find successful application in food biopreservation, contributing to safety and shelf-life extension of food products.

Table 1. Antimicrobial activity of the tested essential oils at concentration of 10 mg/ml.

Test microorganism	Inhibition zones, mm** (10 mg/ml)													MeOH*
	Ginger	Clove	Cinna- mon	Basil	Carda- mom	Cumin	Corian- der	Rose- mary	Dill	Black pepper	Spear- mint	Orange	Carrot seed	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	12	13	15	9	18	9	-	16	15	9	9	14	20	-
<i>Enterococcus faecium</i>	10	11	14	12	19	10	9	12	13	9	8	-	11	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	12	25	8	26	8	8	15	13	9	-	-	12	-
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869	-	-	12	-	-	-	-	-	8	-	8	-	10	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> RC2	-	-	12	-	12	-	9	9	9	-	-	-	10	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	9	11	25	-	26	9	-	15	14	9	-	-	11	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	10	11	30	-	25	9	8	15	14	-	-	8	12	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	-	12	28	10	18	10	11	26	21	9	10	10	12	-
<i>Pseudomonas aerugino- sa</i> ATCC 9027	12	12	14	10	10	10	-	10	10	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	13	35	9	13	11	10	16	14	9	10	9	15	-

Table 2. Minimum inhibitory concentration (mg/ml) of the tested essential oils.													
Test microorganism	Minimum inhibitory concentration, mg/ml												
	Ginger	Clove	Cinnamon	Basil	Cardamom	Cumin	Coriander	Rosemary	Dill	Black pepper	Spear-mint	Orange	Carrot seed
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2.5	1.25	1.25	5	1.25	5	-	1.25	1.25	2.5	5	1.25	2.5
<i>Enterococcus faecium</i>	2.5	1.25	1.25	2.5	1.25	5	10	2.5	2.5	2.5	10	-	2.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	2.5	1.25	2.5	10	1.25	10	10	2.5	2.5	5	-	-	2.5
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869	-	-	5	-	-	-	-	-	10	-	10	-	5
<i>Lactobacillus acidophilus</i> RC2	-	-	5	-	1.25	-	5	5	5	-	-	-	2.5
<i>Salmonella enteritidis</i>	5	2.5	1.25	-	1.25	5	-	2.5	1.25	0.625	-	-	2.5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	2.5	0.313	1.25	-	1.25	5	10	1.25	0.313	-	-	5	2.5
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	-	5	1.25	5	2.5	5	2.5	1.25	1.25	2.5	2.5	2.5	0.625
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	5	2.5	0.625	5	2.5	5	-	5	5	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	5	0.625	10	1.25	1.25	2.5	0.313	0.625	0.625	2.5	0.625	1.25
													-

References

- Andrade B. F. M. T., L. Nunes Barbosa, I. da Silva Probst, A. Fernandes Júnior, 2013 "Antimicrobial activity of essential oils", *Journal of Essential Oil Research*, 26(1), pp. 34–40.
- Atarés L., A. Chiralt, 2016 "Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging", *Trends in Food Science & Technology*, 48, pp. 51–62.
- Babu A. J., A. R. Sundari, J. Indumathi, R. V. N. Srujan, M. Sravanth, 2011 "Study on the Antimicrobial activity and Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils of Spices", *Veterinary World*, 4(7), pp. 311–316.
- Bano S., N. Ahmad, A. K. Sharma, 2016 "Phytochemical screening and evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of *Elettaria cardamom* (Cardamom)", *Journal of Applied and Natural Science*, 8(4), pp. 1966–1970.
- Bassolé I. H. N., H. R. Juliani, 2012 "Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties", *Molecules*, 17(4), pp. 3989–4006.
- Bhavaniramy S., S. Vishnupriya, M. S. Al-Aboody, R. Vijayakumar, D. Baskaran, 2019 "Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications", *Grain & Oil Science and Technology*, 2,.
- Bosnić T., D. Softić, J. Grujić-Vasić, 2006 "Antimicrobial Activity of Some Essential Oils and Major Constituents of Essential Oils", *Acta Medica Academica*, 35, pp. 19–22.
- Bozkurt T., O. Gülnaz, Y. A. Kaçar, 2017 "Chemical composition of the essential oils from some citrus species and evaluation of the antimicrobial activity", *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 11(10), pp. 29–33.
- Calo J. R., P. G. Crandall, C. A. O'Bryan, S. C. Ricke, 2015 "Essential oils as antimicrobials in food systems – A review", *Food Control*, 54, pp. 111–119.
- Dimov M., K. Dobрева, S. Damyanova, A. Stoyanova, 2017 "Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of dill essential oils (*Anethum graveolens* L.)", *Annual of Assen Zlatarov University, Burgas, Bulgaria*, XLVI (1), pp. 37–42.
- Donsi F., M. Annunziata, M. Sessa, G. Ferrari, 2011 "Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods", *LWT - Food Science and Technology*, 44(9), pp. 1908–1914.
- Gutierrez J., C. Barry-Ryan, P. Bourke, 2008 "The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients", *International Journal of Food Microbiology*, 124(1), pp. 91–97.
- Hossain M. A., S. R. A. Harbi, A. M. Weli, Q. Al-Riyami, J. N. Al-Sabahi, 2014 "Comparison of chemical constituents and antimicrobial activities of three essential oils from three different brands' clove samples collected from Gulf region", *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(4), pp. 262–268.
- Hyldgaard M., T. Mygind, R. L. Meyer, 2012 "Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components", *Frontiers in Microbiology*, 3, article 12.
- Jirovetz L., G. Buchbauer, A. Stoyanova, S., E. V. Georgiev, S. T. Damianova, 2003 "Composition, Quality Control, and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Long-Time Stored Dill (*Anethum graveolens* L.) Seeds from Bulgaria", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(13), pp. 3854–3857.
- Özcan M., O. Erkmén, 2001 "Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices", *European Food Research and Technology*, 212(6), pp. 658–660.
- Parthasarathy V. A., D. Prasath, 2012 "Cardamom. Handbook of Herbs and Spices" (Second Ed.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, pp. 131–170.
- Perricone M., E. Arace, M. R. Corbo, M. Sinigaglia, A. Bevilacqua, 2015 "Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components", *Frontiers in Microbiology*, 6, article 76.
- Pintore G., M. Usai, P. Bradesi, C. Juliano, G. Boatto, F. Tomi, M. Chessa, R. Cerri, J. Casanova, 2001 "Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica", *Flavour and Fragrance Journal*, 17(1), pp. 15–19.
- Prakash B., A. Kedia, P. K. Mishra, N. K. Dubey, 2015 "Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges", *Food Control*, 47, pp. 381–391.
- Prakash B., A. Kujur, A. Yadav, A. Kumar, P. Singh, N. K. Dubey, 2018 "Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system", *Food Control*, 89, pp. 1–11.
- Regnault-Roger C., C. Vincent, J. T. Arnason, 2012 "Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world", *Annual Review of Entomology*, 57, pp. 405–424.
- Ribeiro-Santos R., M. Andrade, A. Sanches-Silva, N. R. de Melo, 2017 "Essential Oils for Food Application: Natural Substances with Established Biological Activities", *Food and Bioprocess Technology*, 11(1), pp. 43–71.
- Rokbeni N., Y. M'rabet, S. Dziri, H. Chaabane, M. Jemli, X. Fernandez, A. Boulila, 2013 "Variation of the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Natural Populations of Tunisian *Daucus carota* L. (Apiaceae)", *Chemistry & Biodiversity*, 10(12), pp. 2278–2290.
- Senanayake S. N., 2018 "Rosemary extract as a natural source of bioactive compounds", *Journal of Food Bioactives*, 2(2), pp. 51–57.

26. Sieniawska E., Ł. Świątek, B. Rajtar, E. Kozioł, M. Polz-Dacewicz, K. Skalicka-Woźniak, 2016 "Carrot seed essential oil - Source of carotol and cytotoxicity study", *Industrial Crops and Products*, 92, pp. 109–115.
27. Singh G., S. Kiran, P. Marimuthu, V. Isidorov, V. Vinogorova, 2007 "Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and various oleoresins of *Elettaria cardamomum* (seeds and pods)", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(2), pp. 280–289.
28. Stojanović-Radić Z., M. Nešić, L. Čomić, N. Radulović, 2010 "Antimicrobial activity and cytotoxicity of commercial rosemary oil (*Rosmarinus officinalis* L.)", *Biologica Nyssana*, 1(1-2), pp. 83-88.
29. Teixeira B., A. Marques, C. Ramos, N. R. Neng, J. M. F. Nogueira, J. A. Saraiva, M. L. Nunes, 2013 "Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils", *Industrial Crops and Products*, 43, pp. 587–595.
30. Teneva D., Z. Denkova, R. Denkova, T. Atanasova, N. Nenov, P. Merdzhanov, 2015 "Antimicrobial activity of essential oils and extracts from black pepper, cumin, coriander and cardamom against some pathogenic and saprophytic microorganisms", *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 18(4), pp. 373–377.
31. Thomas J., K. M. Kuruvilla, 2012 "Cinnamon. Handbook of Herbs and Spices" (Second Ed.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, pp. 182–196.
32. Tongnuanchan P., S. Benjakul, 2014 "Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation", *Journal of Food Science*, 79(7), pp. R1231–R1249.
33. Tserennadmid R., M. Takó, L. Galgóczy, T. Papp, C. Vágvolgyi, L. Gerő, J. Krisch, 2010 "Antibacterial effect of essential oils and interaction with food components", *Open Life Sciences*, 5(5), pp. 641-648.
34. Tumbarski Y., V. Lincheva, N. Petkova, R. Nikolova, R. Vrancheva, I. Ivanov, 2017 "Antimicrobial activity of extract from aerial parts of potentilla (*Potentilla reptans* L.)", *Industrial Technologies*, 4, pp. 37-43.
35. Unlu M., E. Ergene, G. V. Unlu, H. S. Zeytinoglu, N. Vural, 2010 "Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*)", *Food and Chemical Toxicology*, 48(11), pp. 3274–3280.
36. Zaika L. L., 1988 "Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination", *Journal of Food Safety*, 9(2), pp. 97–118.
37. Zhang Y., X. Liu, Y. Wang, P. Jiang, S. Quek, 2016 "Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*", *Food Control*, 59, pp. 282–289.

Yulian Tumbarski
Ivanela Cholakova
University of Food Technologies,
Department of Microbiology,
26 Maritza Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria
E-mail: tumbarski@abv.bg

Remzi Cholakov
Ozgazi B. V.,
39, Nijverheidsweg, 4879 Etten-Leur,
The Netherlands
E-mail: inj.cholakov@gmail.com

Nadezhda Petkova
University of Food Technologies,
Department of Organic Chemistry and Inorganic Chemistry
26 Maritza Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria
E-mail: petkovanadejda@abv.bg

Ivan Ivanov
University of Food Technologies,
Department of Organic Chemistry and Inorganic Chemistry
26 Maritza Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria
E-mail: ivanov_ivan.1979@yahoo.com

Pavel Merdzhanov
University of Food Technologies,
Department of Technology of Tobacco, Sugar, Vegetable and Essential Oils
26 Maritza Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria
E-mail: pmerdzhanov@abv.bg

Nikolay Panayotov
Agricultural University
12 Mendeleev Str., 4000 Plovdiv, Bulgaria
E-mail: nikpan@au-plovdiv.bg

Alexander Trayanov
Agricultural University
12 Mendeleev Str., 4000 Plovdiv, Bulgaria
E-mail: alexander_traqnov@abv.bg



ТОКСИКОЛОГИЧНО ОЦЕНЯВАНЕ НА 2-МЕТИЛТИОФЕН ОТ ПЕТРОЛ

Яна Колева

TOXICOLOGICAL EVALUATION OF 2-METHYLTHIOPHENE FROM PETROLEUM

Yana Koleva

ABSTRACT: Petroleum contains heteroatom species (nitrogen-, oxygen-, and sulfur-containing organic compounds). The presence of sulfur compounds in petroleum products often leads to harmful effects on living organisms. There is limited experimental toxicological data on sulfur-containing organic compounds in oil. This necessitates the search for and application of alternative methods for predicting the toxicological properties of sulfur compounds in oil. The present work focused on the use of alternative methods such as the CompTox Chemistry Dashboard to predict the toxicological properties of 2-methylthiophene.

Key words: 2-methylthiophene, toxicological properties, prediction, CompTox Chemistry Dashboard

Introduction

Fossil fuel-based hydrocarbons are a primary energy source for current civilizations, which nowadays accounts for 83% of global energy consumption, and this tendency is forecasted to continue even after two decades [1]. However, to satisfy such rapidly growing appetite for fossil fuels, the petroleum industry will have to face a lot of challenges. Oil and gas companies, which have always preferably produced the oil and gas from the reservoirs technically the easiest to develop, will have to develop more complex and extremely challenging sour hydrocarbon projects. In the nearest future, crude oil and natural gas with high sulfur content will be the energy source of choice to meet increasing demand [2].

In order to understand the importance of those challenges thorough analysis of hydrocarbon quality is needed. To start with, it should be that the value of the reservoir fluid is commonly based on its quality characteristics. Lower quality Dubai crude is sold at discount rate to lighter, sweeter Brent crude. Sulfur content is among the most important characteristics of the crude oil and natural gas. Currently, there is a negative trend of increase of sulfur content in hydrocarbons worldwide. If US sulfur content of crude oil input to refineries was 0.88% in 1985, as of February 2013 it was 1.44% [3].

Another unfavorable for refineries tendency regards to environmental sulfur regulations. If in 2012 the maximum allowable level of sulfur was

795 ppm in Africa, 605 ppm in the Middle East, 520 ppm in Latin America, in 2030 it is expected to decrease the sulfur content to 95 ppm, 16 ppm, and 30 ppm respectively. The other nations of the world are moving towards environmentally friendly transportation fuels too. New transportation fuel specifications are being put into effect worldwide. As a result, those contra directional factors, such as hydrocarbon quality deterioration and reducing the maximum allowable level of sulfur, are making the situation even worse [2].

Depending on the amount of sulfur the crude oil can be sweet or sour. When the total sulfur level in the oil is less than 0.5 % the oil is called sweet and if it is more than that the oil is called sour. Sweet crude oil is more preferred by refineries as it contains valuable chemicals which is needed to produce the light distillates and high quality feed stocks. Historically, early prospectors tasted the crude oil to determine its quality. Crude petroleum had a sweet taste and pleasant smell if the content of sulfur was low. For this reason, sweet crude is a low sulfur crude oil [4].

In general, the higher the density of the crude oil, the lower the API gravity of the crude and the higher the sulfur content. The total sulfur in crude oil can vary from 0.04% w/w for light crude oil to about 5% w/w for heavy crude oil and tar sand bitumen. Nevertheless, the sulfur content of crude oils which is produced from different locations varies with time, depending on the chemical composition of newly discovered

fields, especially those in different geological environments [5].

Sulfur compounds are substances of different chemical nature, from the elemental sulfur to hydrogen sulfide and mercaptan compounds, sulfides, open-chain and cyclic disulfides, and heterocyclic derivatives of thiophene, thiophane and other more complex compounds. To date, with the exception of low molecular weight compounds, most of the sulfur compounds oils are not deciphered. Free elemental sulfur is rarely found in crude oils. The emergence of free sulfur is associated with the decomposition of more complex sulfur compounds [2].

The bulk of sulfur compounds found in crude oil are distributed between the heavy cuts and residues in the form sulfur compounds of the naphthenophenanthrene or naphthenoanthracene type, or in the form of benzothiophenes, that is molecules having one or several naphthenic and aromatic rings that usually contain a single sulfur atom [6].

Thiophene and its derivatives are neutral cyclic and temperature resistant compounds with five-membered ring. They do not dissolve in water, and their chemical properties are similar to aromatic hydrocarbons. The first determination of thiophene and its derivatives was in 1899, and it was believed that they came from the degradation of sulfides during refining operations. That was until 1953, the year when the methylthiophenes were identified in kerosene from Agha Jari crude oil, Iran. The existence of those sulfur compounds was no longer doubted after the identification of benzothiophenes and their derivatives [2].

The present work focused on the use of alternative methods such as the CompTox Chemistry Dashboard to predict the toxicological properties of 2-methylthiophene.

Material and Methods

Compound. The 2-methylthiophene (known as 2-thiotolene) [7], belong to the class of organic compounds known as heteroaromatic compounds with CAS number 554-14-3. The structural formula is as follows (Figure 1):

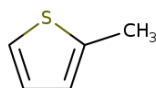


Figure 1. Structure of 2-methylthiophene.

CompTox Chemistry Dashboard. The Dashboard is a freely accessible web-based application and data hub providing access to data associated with chemical substances. It accesses data from nine component databases housing generic data types. The Dashboard also integrates data from other platforms (specifically PubChem and PubMed) via web services and visualization widgets. The Dashboard represents a first step in building a comprehensive chemical substance-centric informatics architecture to provide flexible access to data, models and analysis tools in support of EPA's research programs [8,9].

Results and Discussion

The CompTox Chemistry Dashboard software was used to predict the toxicological properties of 2-methylthiophene. Data of prediction (toxicological endpoints) of 2-methylthiophene are presented in Table 1.

Toxicological endpoints are values derived from toxicity tests that are the results of specific measurements made during or at the conclusion of the test. Two broad categories of endpoints widely used are assessment and measures of effect. Assessment endpoints refer to the population, community, or ecosystem parameters that are to be protected (e.g., population growth rate, sustainable yield). Measures of effect refer to the variables measured, often at the individual level, that are used to evaluate the assessment endpoints. The measures of effect describe the variables of interest for a given test. The most common measures of effect include descriptions of the effects of toxic agents on survival, growth, and reproduction of a single species. Other measures of effect include descriptions of community effects (respiration, photosynthesis, diversity) or cellular effects such as physiological/histopathological effects (backbone collagen levels, ATP/ADP levels, RNA/DNA ratios, biomarkers, etc.). In each case the endpoint is a variable that can be quantitatively measured and used to evaluate the effects of a toxic agent on a given individual, population, or community. The underlying assumption in making toxicological endpoint measurements is that the endpoints can be used to evaluate or predict the effects of toxic agents in natural environments [10].

Table 1. Predicted results of toxicological endpoints of 2-methylthiophene

Property	Experimental value	Consensus	Hierarchical clustering	Single model	Group contribution	Nearest neighbor
96 hour fathead minnow LC ₅₀						2.117 -Log10 (mol/L) 749.934 mg/L
48 hour Daphnia magna LC ₅₀		3.156 -Log10 (mol/ L) 68.629 mg/L	3.887 -Log10 (mol/ L) 12.742 mg/L	2.724 -Log10 (mol/ L) 185.475 mg/L	3.509 -Log10 (mol/ L) 30.419 mg/L	2.503 -Log10 (mol/L) 308.572 mg/L
48 hour Tetrahymena pyri-formis IGC ₅₀		2.410 -Log10 (mol/ L) 382.102 mg/L	2.245 -Log10 (mol/ L) 559.042 mg/L		2.842 -Log10 (mol/ L) 141.386 mg/L	2.143 -Log10 (mol/L) 705.813 mg/L
Oral rat LD ₅₀	1.487 -Log10 (mol/kg) 3199.065 mg/kg	1.708 -Log10 (mol/kg) 1923.357 mg/kg	1.637 -Log10 (mol/kg) 2266.889 mg/kg			1.779 -Log10 (mol/kg) 1631.886 mg/kg
Bioaccumulation factor		0.850 Log10 7.084	0.695 Log10 4.953	0.666 Log10 4.635	1.524 Log10 33.434	0.516 Log10 3.282
Developmental toxicity		false	false	false		true
Ames mutagenicity	false	false	false			false
Estrogen Receptor RBA						-3.900 Log10 1.259*10 ⁻⁴
Estrogen Receptor Binding		false	false	false	true	false

There are no experimental values of 2-methylthiophene for seven of nine toxicological endpoints. Prediction results (Consensus method) for all toxicological endpoints (without 96 hour fathead minnow LC₅₀ and Estrogen Receptor RBA) are obtained of individual predictions with the following methods (Hierarchical clustering, Single model, Group contribution, Nearest neighbor).

For each toxicological endpoint a training and an external test set are defined. Predictions for the test chemical and for the most similar chemicals in the sets have been made.

Endpoints most often measured in acute toxicity tests include a determination of the LC or EC₅₀ (median effective concentration), an estimate of the acute no-observed effect concentration (NOEC), and behavioral observations. The primary endpoint is the LC or EC₅₀. The LC₅₀ is a lethal concentration that is estimated to kill 50% of a test population. An EC₅₀ measures immobilization or an endpoint other than death [10].

Prediction of toxicological endpoint (96 hour fathead minnow LC₅₀) of 2-methylthiophene was performed with the individual method Nearest neighbor. The predicted value is 749.934 mg/L.

The predicted result (Consensus method) of 2-methylthiophene for toxicological endpoint (48 hour *Daphnia magna* LC₅₀) is 68.629 mg/L (3.156 -Log₁₀ (mol/L)). A training set of ten similar compounds used to predict the 2-methylthiophene (similarity coefficient is greater than 0.5 (0.58)). An additional external test set of ten similar compounds was used to evaluate 2-methylthiophene (similarity coefficient is greater than 0.5 (0.52)). Individuals predictions of methods for 2-methylthiophene are 3.89-Log₁₀ (mol/L) (Hierarchical clustering), 2.72-Log₁₀ (mol/L) (Single model), 3.51-Log₁₀ (mol/L) (Group contribution) and 2.50-Log₁₀ (mol/L) (Nearest neighbor).

The predicted value of toxicological endpoint *Tetrahymena pyriformis* IGC₅₀ (48 hr) for 2-methylthiophene from Consensus method is 2.41-Log₁₀ (mol/L) (382.10 mg/L). A training set of ten similar compounds used to predict the 2-methylthiophene (similarity coefficient is less than 0.5 (0.29)). An additional external test set of ten similar compounds was used to evaluate 2-methylthiophene (similarity coefficient is less than 0.5 (0.22)). Individuals predictions of methods for 2-methylthiophene are 2.24-Log₁₀ (mol/L) (Hierarchical clustering), 2.84-Log₁₀

(mol/L) (Group contribution) and 2.14- Log₁₀ (mol/L) (Nearest neighbor).

For toxicological endpoint Oral rat LD₅₀ the experimental value of 2-methylthiophene is 1.49-Log₁₀ (mol/L) (3199.06 mg/kg) and its predicted value (Consensus method) is 1.71-Log₁₀ (mol/L) (1923.36 mg/L). A training set of ten similar compounds used to predict the 2-methylthiophene (similarity coefficient is less than 0.5 (0.15)). An additional external test set of ten similar compounds was used to evaluate 2-methylthiophene (similarity coefficient is less than 0.5 (0.38)). Individuals predictions of methods for 2-methylthiophene are 1.64-Log₁₀ (mol/L) (Hierarchical clustering) and 1.78-Log₁₀ (mol/L) (Nearest neighbor).

The predicted value of the endpoint Bioconcentration factor for 2-methylthiophene from Consensus method is 0.85 Log₁₀ (7.08). A training set of ten similar compounds used to predict the 2-methylthiophene (similarity coefficient is less than 0.5 (0.28)). An additional external test set of ten similar compounds was used to evaluate 2-methylthiophene (similarity coefficient is less than 0.5 (0.23)). Individuals predictions of methods for 2-methylthiophene are 0.69 Log₁₀ (Hierarchical clustering), 0.67 Log₁₀ (Single model), 1.52 Log₁₀ (Group contribution) and 0.52 Log₁₀ (Nearest neighbor).

Developmental Toxicity value of 2-methylthiophene from Consensus method is 0.45, i.e. developmental non-toxicant (false). A training set of ten similar compounds used to predict the 2-methylthiophene (concordance (0.60 (6 out of 10)), sensitivity (0.60 (3 out of 5)) and specificity (0.60 (3 out of 5))). An additional external test set of three similar compounds was used to evaluate 2-methylthiophene (concordance (0.67 (2 out of 3)), sensitivity (0.50 (1 out of 2)) and specificity (1.00 (1 out of 1))). Individuals predictions of methods for 2-methylthiophene are 0.49 (Hierarchical clustering) (false), 0.18 (Single model) (false) and 0.67 (Nearest neighbor) (true).

For Mutagenicity the experimental value of 2-methylthiophene is 0.00 (mutagenicity negative) (false) and its predicted value (Consensus method) is 0.26 (mutagenicity negative) (false). A training set of ten similar compounds used to predict the 2-methylthiophene (concordance (0.90 (9 out of 10)), sensitivity (0.50 (1 out of 2)) and specificity (1.00 (8 out of 8))). An additional external test set of ten similar compounds was used to evaluate 2-methylthiophene (concordance (0.80 (8 out of 10)), sensitivity (0.00 (0 out

of 2)) and specificity (1.00 (8 out of 8))). Individuals predictions of methods for 2-methylthiophene are 0.18 (Hierarchical clustering) (false) and 0.33 (Nearest neighbor) (false).

Prediction of toxicological endpoint (Estrogen Receptor RBA) of 2-methylthiophene was performed with the individual method Nearest neighbor. The predicted value is $-3.900 \text{ Log}_{10} (1.259 \cdot 10^{-4})$.

The predicted value of Estrogen Receptor Binding for 2-methylthiophene from Consensus method is 0.25 (Does not bind to estrogen receptor (false)). A training set of ten similar compounds used to predict the 2-methylthiophene (concordance (N/A), sensitivity (N/A) and specificity (N/A)). An additional external test set of four similar compounds was used to evaluate 2-methylthiophene (concordance (0.50 (2 out of 4)), sensitivity (1.00 (2 out of 2)) and specificity (0.00 (0 out of 2))). Individuals predictions of methods for 2-methylthiophene are 0.14 (Hierarchical clustering) (false), 0.16 (Single model) (false), 0.71 (Group contribution) (true) and 0.00 (Nearest neighbor) (false).

Conclusion

The presence of sulfur-containing compounds in crude oil poses a number of technical, toxicological, environmental, economic and other problems. Due to the limited experimental toxicological data on sulfur compounds, alternative methods for their prediction are being sought. In the present work, a toxicological evaluation of 2-methylthiophene for various toxicological endpoints was performed using the the CompTox Chemistry Dashboard through Consensus method.

Acknowledgements

This study was financially supported by the Burgas University through the Scientific Research Sector – Project 2021.

References

1. Pratap, J. 2013, March 4. Global demand for natural gas will rise nearly 50% by 2035. Re-

trieved 2013, from Gulf Times: <http://www.gulf-times.com/business/191/details/344245/global-demand-for-natural-gas-%E2%80%98will-rise-nearly-50%25-by-2035%E2%80%99>

2. Duissenov, D. Production and processing of sour crude and natural gas - challenges due to increasing stringent regulations, Norwegian University of Science and Technology, June 2013.

3. EIA. 2013. Petroleum & Other Liquids. Retrieved 2013, from US Energy Information Administration:

<http://www.eia.gov/dnav/pet/hist/LeafHandler.js?n=pet&s=mcrslus2&f=m>

4. FSU. 2010. Description of the MC 252 Crude Oil. Retrieved November 4, 2012, from Oil Spill Academic Task Force: <http://oilspill.fsu.edu/images/pdfs/mc-252crude-oil-desc.pdf>

5. Speight, J. 2007. The Chemistry and Technology of Petroleum. Boca Raton: Taylor & Francis Group.

6. Wauquier, J.-P. 1995. Crude oil. Petroleum products. Process flowsheets. Paris: Editions Technip.

7. ChemIDplus Advanced:

<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>.

8. USA EPA; CompTox Chemistry Dashboard: <https://comptox.epa.gov/dashboard/>

9. Williams, A. J., C. M. Grulke, J. Edwards, A. D. McEachran, K. Mansouri, N. C. Baker, G. Patlewicz, I. Shah, J. F. Wambaugh, R. S. Judson and A. M. Richard. 2017. The CompTox Chemistry Dashboard: a community data resource for environmental chemistry. *Journal of Cheminformatics*, 9: 61.

10. <https://www.ecologycenter.us/ecotoxicology/toxicological-endpoints.html>

доц. д-р Яна Колева Колева

Университет „Проф. д-р Асен Златаров“- Бургас

Катедра по химия

гр. Бургас, п.к. 8010

ул. Проф. Якимов №1

yanuriana@abv.bg



ВЕРОЯТНА РЕАКЦИОННА СПОСОБНОСТ НА 2-МЕТИЛТИОФЕНА

Яна Колева

PROBABLE REACTIVITY OF 2-METHYLTHIOPENE

Yana Koleva

ABSTRACT: This work examines the possible hepatic metabolic activation of 2-methylthiophene and the possible reactivity of the generated metabolites to DNA and protein by in silico methods (QSAR Toolbox software). Generated hepatic metabolites of 2-methylthiophene are twelve (in vivo rat metabolism simulator) in the following mechanistic domains – A_N^2 , radical, S_N^2 by DNA binding and six reactive metabolites in the mechanistic domain (Michael addition, Schiff base formation, S_N^2 and acylation) by protein binding. Sixteen reactive hepatic metabolites of 2-methylthiophene were predicted (rat liver S9 metabolism simulator) in the following mechanistic domains – radical and S_N^2 by DNA binding and eleven reactive metabolites in the mechanistic domain (Michael addition, S_N^2 , Schiff base formation and acylation) by protein binding.

Key words: 2-methylthiophene, metabolic activation, predict, QSAR Toolbox

Introduction

Sulfur compounds are substances of different chemical nature, from the elemental sulfur to hydrogen sulfide and mercaptan compounds, sulfides, open-chain and cyclic disulfides, and heterocyclic derivatives of thiophene, thiophane and other more complex compounds. To date, with the exception of low molecular weight compounds, most of the sulfur compounds oils are not deciphered. Free elemental sulfur is rarely found in crude oils. The emergence of free sulfur is associated with the decomposition of more complex sulfur compounds [1].

A major cause of air pollution is the burning of fossil fuels and producing compounds such as NO_x and SO_x, which is released from factories and vehicle exhausts. Sulfur content in crude oil is highly significant due to the high toxicity, corrosivity and air pollution that results from the burning of sulfur-containing fuel products [2]. In accordance with the increasingly stringent environmental regulations on sulfur concentration in transportation fuels and the demand for diesel fuel with low sulfur content, removal of sulfur-containing compounds is an important issue for the petroleum refining industry [3].

To achieve this goal, most sulfur-containing compounds are easily desulfurized by hydrodesulfurization (HDS), in which H₂ gas is used to remove the S-compounds through the formation of hydrocarbons and H₂S. It is difficult to decrease the sulfur content from several

hundred ppm to a few ppm by the HDS method which is extremely efficient in removing thiols, sulfides and disulfides, but less effective for thiophenic compounds [4]. Due to the high capital and operating costs of the HDS process due to factors such as reduced catalyst life time, higher hydrogen consumption, high temperature and pressure, oxidative desulfurization (ODS) is proposed as an appropriate substitute for the traditional HDS process and complementary method with ambient pressure, relatively low temperature, high selectivity and no consumption of hydrogen [5, 6]. The integration of an ODS unit with a conventional hydro-treating unit can improve the economics of diesel desulfurization process in comparison with the current HDS technology [7].

This work examines the possible hepatic metabolic activation of 2-methylthiophene and the possible reactivity of the generated metabolites to DNA and protein by in silico methods (QSAR Toolbox software).

Material and Methods

Compound. The 2-methylthiophene [8] is a heterocyclic compound. It consists of a planar five-membered ring with CAS number 554-14-3. The structural formula is as follows (Figure 1):

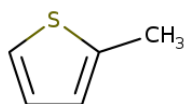


Figure 1. Structure of 2-methylthiophene.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (Q)SAR Toolbox (version 4.3). (Quantitative) Structure-Activity Relationships [(Q)SARs] are methods for estimating properties of a chemical from its molecular structure and have the potential to provide information on the hazards of chemicals, while reducing time, monetary costs and animal testing currently needed [9].

Liver metabolism (observed and simulator) – *in vivo* and *in vitro* for rat:

Observed rat *in vivo* metabolism. The observed (documented) metabolic pathways for 647 chemicals, extracted from the scientific literature, and associated with the *in vivo* biotransformations of xenobiotic chemicals in rodents (mostly rats) are stored in a database format that allows easy computer access to the metabolism information. This database includes structurally different chemicals of various functionalities such as aliphatic and aromatic hydrocarbons, halogenated hydrocarbons, alcohols and phenols, carbonyl compounds, carboxylic acids and esters, nitro compounds, amines, organic sulfides, heterocyclic and, mostly, multi-functional chemicals etc. [9]

***In vivo* rat metabolism simulator.** The current *in vivo* rat liver metabolic simulator (transformation table) represents electronically designed set of 671 structurally generalized, hierarchically arranged abiotic and enzymatic transformation reactions, which are characteristic for the metabolism for *in vivo* experimental systems such as rodent (mostly rat). The principal applicability of this simulator is associated with the reproduction as well as the prediction of the metabolic activation reactions and pathways of xenobiotic chemicals, which may elicit *in vivo* genotoxicity effects [9].

Observed rat liver S9 metabolism. The documented metabolic pathways for 261 chemicals

observed with the use of *in vitro* experimental systems such as rodent (mostly rat) liver microsomes and S9 fraction are stored in a database format that allows easy computer access to the metabolism information. This database includes structurally different chemicals of various functionalities and fields of application such as aliphatic and aromatic hydrocarbons, halogenated hydrocarbons, carboxylic acids and esters nitro compounds, amines, heterocyclic and multi-functional chemicals, etc. [9].

Rat liver S9 metabolism simulator. The current *in vitro* rat liver metabolic simulator (transformation table) represents electronically designed set of 551 structurally generalised, hierarchically arranged biotransformation reactions, which are characteristic for the metabolism for *in vitro* experimental systems such as rodent (mostly rat) liver microsomes and S9 fraction. The principal applicability of this simulator is associated with the reproduction as well as the prediction of the metabolic activation reactions and pathways of xenobiotic chemicals, which may elicit *in vitro* genotoxicity effects such as bacterial mutagenicity and chromosomal aberrations [9].

DNA binding by OASIS. The profiler is based on Ames Mutagenicity model part of OASIS TIMES system [9].

Protein binding by OASIS. The scope of the profiler is to investigate presence of alerts within target molecules responsible for interaction with proteins [9].

Results and Discussion

Hepatic metabolic activation (generation of metabolites) and their reactivity (DNA and protein binding) of 2-methylthiophene were studied using the QSAR Toolbox software. The parent structure of the 2-methylthiophene cannot bind to DNA and protein, i.e. the parent structure is not reactive. Experimental metabolic pathways of activation were not observed for rat *in vivo* and *in vitro* for the 2-methylthiophene. The heterocyclic sulfur-containing compound was metabolically activated, i.e. twelve metabolites are generated in the hepatic metabolism simulator (*in vivo* rat). The generated metabolites of 2-methylthiophene are presented in Table 1.

Table 1. Number and structure of the predicted hepatic metabolites of 2-methylthiophene (*in vivo* rat metabolism simulator)

1	2	3	4	5	6	7
8	9	10	11	12		

DNA binding by OASIS is a general mechanistic profiler, consisting of list of structural alerts. The profiler relies on the alerts from the AMES mutagenicity TIMES model. The profiler is based on 85 structural alerts responsible for interaction of chemicals with DNA. The scope of the profiler is to investigate presence of alerts within target molecules which may interact with DNA. The list of 85 structural alerts has been separated into eight mechanistic domains. The

profiling result assigns a target to the corresponding structural alert, mechanistic alerts and domain [9].

The potential DNA binding (the probable reactivity) of hepatic metabolites for 2-methylthiophene are predicted by QSAR Toolbox software. Results of DNA binding of hepatic metabolites of 2-methylthiophene are present in Table 2.

Table 2. DNA binding of hepatic metabolites for 2-methylthiophene by QSAR Toolbox (*in vivo* rat metabolism simulator)

Number of metabolite	DNA binding by OASIS (mechanism of reaction)		
	Structural alert	Mechanistic alert	Mechanistic domain
5, 6, 10-12	No alert found		
1	alpha,beta-unsaturated aldehydes	Nucleophilic addition to alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds	A_N^2
1	alpha,beta-unsaturated aldehydes	Schiff base formation	A_N^2
2-4, 7-9	thiols	Radical mechanism via ROS formation (indirect)	radical
7, 9	epoxides and aziridines	Alkylation, direct acting epoxides and related	S_N^2

For five of the twelve generated metabolites were not found alerts by DNA binding, i.e. they are not reactive. The remaining seven metabolites are reactive, i.e. structural alerts were found by DNA binding. The metabolites are in the following mechanistic domains - A_N^2 , radical and S_N^2 . The mechanistic alerts of metabolites are nucleophilic addition to alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds, Schiff base formation, radical mechanism via ROS formation and alkylation, direct acting epoxides and related with a structural alert (alpha,beta-unsaturated aldehydes, thiols and epoxides and aziridines).

The profiler (protein binding) is based on the rules defined in the OASIS TIMES models for skin sensitization (SS). It consists of 112 structural alerts related to interactions with proteins especially skin proteins and proteins such as topoisomerases, cellular protein adducts, etc. It is believed that positive results are result of interactions with proteins. The list of structural alerts has been separated into 11 mechanistic domains. Each of the mechanistic domains has been separated into more than 2 mechanistic alerts. The profiling result outcome assigns a target to the corresponding structural alert, mechanistic alerts

and domain. The absence of a structural alert should not be taken as an absence of toxicity [9].

Prediction results of protein binding of hepatic metabolites of 2-methylthiophene are present in Table 3.

Table 3. Protein binding of hepatic metabolites for 2-methylthiophene by QSAR Toolbox (*in vivo* rat metabolism simulator)

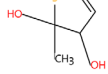
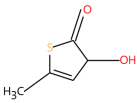
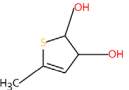
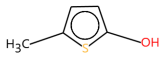
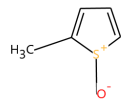
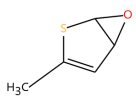
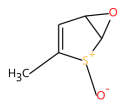
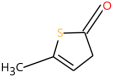
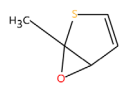
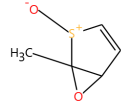
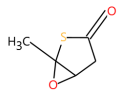
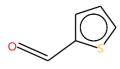
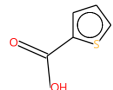
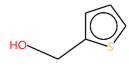
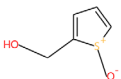
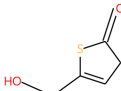
Number of metabolite	Protein binding by OASIS (mechanism of reaction)		
	Structural alert	Mechanistic alert	Mechanistic domain
3-6, 11, 12	No alert found		
1	alpha,beta-aldehydes	Michael addition on alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds	Michael addition
6	polarised alkenes - sulfinyl	Michael addition on polarised alkenes	Michael addition
1, 10	aldehydes	Schiff base formation with carbonyl compounds	Schiff base formation
2	thiols and disulfide compounds	Interchange reaction with sulphur containing compounds	S_N^2
7, 9	epoxides, aziridines and sulfuranes	Ring opening S_N^2 reaction	S_N^2
8	thio(acetates)	Direct acylation involving a leaving group	Acylation

Six metabolites of twelve are not reactive and for six metabolites were found alerts by protein binding. Two metabolites are in Michael addition mechanistic domain as the mechanistic alerts are Michael addition on alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds and Michael addition on polarised alkenes with structure alerts (alpha,beta-aldehydes and polarised alkenes - sulfinyl). Two of reactive generated metabolites are in Schiff base formation mechanistic domain as the mechanistic alert is Schiff base formation with carbonyl compounds with a structural alert (aldehyde). Three of six metabolites are in S_N^2 mechanistic domain as the mechanistic alerts are

interchange reaction with sulphur containing compounds and ring opening S_N^2 reaction with structural alerts (thiols and disulfide compounds, epoxides, aziridines and sulfuranes). Finally, one of the six metabolites is in acylation mechanistic domain as the mechanistic alert is direct acylation involving a leaving group with a structural alert (thio(acetates)).

In the hepatic metabolism simulator (rat liver S9 metabolism simulator), sixteen metabolites were predicted. Results of metabolic activation (generated metabolites) of 2-methylthiophene in liver (rat liver S9 metabolism simulator) are presented in Table 4.

Table 4. Number and structure of the predicted hepatic metabolites of 2-methylthiophene (rat liver S9 metabolism simulator)

1	2	3	4	5	6
					
7	8	9	10	11	12
					
13	14	15	16		
					

The potential DNA binding (probable reactive mechanism) of hepatic generated metabolites of the derivative of thiophene are predicted by QSAR Toolbox software (rat liver S9 metabo-

lism simulator). Results of DNA binding of hepatic metabolites (rat liver S9 metabolism simulator) of 2-methylthiophene are present in Table 5.

Table 5. DNA binding of hepatic metabolites of 2-methylthiophene by QSAR Toolbox (rat liver S9 metabolism simulator)

Number of metabolite	DNA binding by OASIS (mechanism of reaction)		
	Structural alert	Mechanistic alert	Mechanistic domain
4, 5, 12-15	No alert found		
1-3, 6, 8, 9, 11, 16	thiols	Radical mechanism via ROS formation (indirect)	Radical
6, 7, 9-11	epoxides and aziridines	Alkylation, direct acting epoxides and related	S _N ²

Six of sixteen metabolites are not reactive, i.e. for them were not found structural alerts by DNA binding (the QSAR Toolbox). The following structural alerts (thiols, epoxides and aziridines) were found for the ten metabolites in several mechanistic domains (radical and S_N²) with mechanistic alerts (radical mechanism via ROS

formation and alkylation, direct acting epoxides and related).

Prediction results of protein binding (rat liver S9 metabolism simulator) of hepatic generated metabolites of 2-methylthiophene are present in Table 6.

Table 6. Protein binding of hepatic metabolites of 2-methylthiophene by QSAR Toolbox (rat liver S9 metabolism simulator)

Number of metabolite	Protein binding by OASIS (mechanism of reaction)		
	Structural alert	Mechanistic alert	Mechanistic domain
1, 3, 4, 13, 14	No alert found		
2, 8, 16	(thio)acetates	Direct acylation involving a leaving group	Acylation
5, 7, 10, 15	polarised alkenes - sulfinyl	Michael addition on polarised alkenes	Michael addition
6, 7, 9-11	epoxides, aziridines and sulfuranes	Ring opening S _N ² reaction	S _N ²
12	aldehydes	Schiff base formation with carbonyl compounds	Schiff base formation

For five of sixteen metabolites were not found structural alerts, i.e. they are not reactive by DNA binding (the QSAR Toolbox). The eleven generated metabolites that are reactive are in the following mechanistic domains (acylation, Michael addition, S_N² and Schiff base formation) as the mechanistic alerts are direct acylation involving a leaving group, Michael addition on polarised alkenes, ring opening S_N² reaction and Schiff base formation with carbonyl compounds with structural alerts ((thio)acetates, polarised alkenes – sulfinyl, epoxides, aziridines and sulfuranes, and aldehydes).

Conclusion

The presence of sulfur compounds in oil can lead to a number of harmful effects, as well as toxic effects on living organisms. The probability of the derivative of thiophene (2-methylthiophene) to generate metabolites in the liver and their probable reactivity was investigated using the QSAR Toolbox software. Some of the generated metabolites in the liver of 2-methylthiophene are reactive to DNA and protein, i.e. have an electrophilic effect. Therefore, the derivative of thiophene would have toxic effects on living organisms.

Acknowledgements

This study was financially supported by the Burgas University through the Scientific Research Sector – Project 2021.

References

1. Duissenov, D. Production and processing of sour crude and natural gas - challenges due to increasing stringent regulations, Norwegian University of Science and Technology, June 2013.

2. Collins, F. M., A. R. Lucy, C. Sharp. 1997. Oxidative desulphurisation of oils via hydrogen peroxide and heteropolyanion catalysis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 117:397–403.

3. Mei, H., B. W. Mei, T. F. Yen. 2003. A new method for obtaining ultra-low sulfur diesel fuel via ultrasound assisted oxidative desulfurization. *Fuel*. 82:405–14.

4. García-Gutiérrez, J. L., G. A. Fuentes, M. E. Hernández-Terán, P. García, F. Murrieta-Guevara, F. Jiménez-Cruz. 2008. Ultra-deep oxidative desulfurization of diesel fuel by the Mo/Al₂O₃–H₂O₂ system: the effect of system parameters on catalytic activity. *Applied Catalysis A: General*. 334: 366–73.

5. Khenkin, A. M., R. Neumann. 2011. Desulfurization of hydrocarbons by electron transfer oxidative polymerization of heteroaromatic sulfides catalyzed by H₅PV₂Mo₁₀O₄₀ polyoxometalate. *ChemSusChem*. 4:346–8.

6. Caero, L. C., E. Hernández, F. Pedraza, F. Murrieta. 2005. Oxidative desulfurization of synthetic diesel using supported catalysts: part I. Study of the operation conditions with a vanadium oxide based catalyst. *Catalysis Today*. 107:564–9.

7. Stanislaus, A., A. Marafi, M. S. Rana. 2010. Recent advances in the science and technology of ultra-low sulfur diesel (ULSD) production. *Catalysis Today*. 153:1–68.

8. ChemIDplus Advanced: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/>

9. The OECD (Q)SAR Toolbox: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/oecd-qsar-toolbox.htm>

доц. д-р Яна Колева Колева

Университет „Проф. д-р Асен Златаров“- Бургас
Катедра по химия
гр. Бургас, п.к. 8010
ул. Проф. Якимов №1
yanuriana@abv.bg



ВЪЗМОЖНОСТ ЗА ОЦЕНКА НА ИЗОЛАЦИОННАТА И АКУМУЛАЦИОННАТА СПОСОБНОСТ НА ПОМЕЩЕНИЕ ПО ДАННИТЕ ОТ ПРЕХОДНИЯ ПРОЦЕС СЛЕД ИЗКЛЮЧВАНЕ НА ОТОПЛЕНИЕТО

Румен Янков

OPPORTUNITY TO EVALUATE INSULATION AND ACCUMULATION ROOM CAPACITY ACCORDING TO THE TRANSITION PROCESS AFTER SWITCHING OFF HEATING

Rumen Yankov

ABSTRACT: Based on the comment on the energy meaning of the generalized factor (D) for the insulation capacity of the enclosing elements and the coefficient (B) of heat absorption, a method for their practical determination is proposed. The method refers to a room in an existing residential building and is based on obtaining certain technical information experimentally. The final results are obtained after graphoanalytical processing of the experimental data. A numerical is presented which confirms the usefulness of the method.

Key words: insulating ability, heat absorption, energy efficiency

1. Въведение

Енергийната ефективност на сградите се оценява по изолационната способност на заграждащите елементи на всяко помещение (външни стени, прозорци, врати, таван, под, междинни стени и др.) и по затихването на амплитудата на температурата в тях през времето на изключване или намаляване на топлоподаването. Данните за количествена оценка се получават по изчислителен, опитен или комбиниран път.

Температурата в жилищното помещение ($t_{\text{п}}$) се определя по санитарно-хигиенни норми в зависимост от предназначението му (всекидневна, баня, спалня, кухня, детска и т.н.). През отоплителния сезон тези температури се поддържат в определени граници чрез подаване на необходимото количество топлина от съответните отоплителни устройства (радиатори, печки, климатици; конвертори и т.н.). В същите хигиенни норми се препоръчват допустимите отклонения (Δ) на температурата от зададената номинална стойност ($t_{\text{п.н}}$). Например, за споменатите помещения това отклонение е $\Delta = \pm 3^\circ\text{C}$.

Както е известно, количеството на подаваната в помещението топлина при стационарен режим е равна на топлинните загуби и е максимално, когато температурата в помещението е равна на максимално допустимата ($t_{\text{п}} =$

$t_{\text{п.н}} + \Delta$), а външната температура е равна или по-ниска от изчислителната ($t_{\text{из.}}$) за климатичния район, където е разположена сградата.

В следващото се предлага една възможност за оценка на изолационната и акумулиращата способност на съществуващо жилищно помещение, като се използват данни за хода на температурата ($t_{\text{п}}$) в него след изключване на топлоподаването.

2. Постановка на задачата

2.1. Изолационната способност на помещението се оценява чрез фактора (D), който има смисъла на обобщаващ коефициент на топлопреминаване за изчисляване на сумарните топлинни загуби [1]:

$$Q_3 = (\sum k_i \cdot F_i + \sum a_j \cdot l_j \cdot c_B) \cdot (t_{\text{п}} - t_{\text{из.}}). \quad (1)$$

или

$$Q_3 = D \cdot F \cdot (t_{\text{п}} - t_{\text{из.}}) \quad (2)$$

откъдето, след приравняване на десните страни се получава:

$$D = \frac{(\sum k_i \cdot F_i + \sum a_j \cdot l_j \cdot c_B)}{F} \left[\frac{\text{W}}{\text{m}^2 \cdot ^\circ\text{C}} \right]. \quad (3)$$

Тук: $-\sum k_i \cdot F_i$ -- топлинните загуби през i -я заграждащ елемент (стена, прозорец, врата и т.н.) за $\Delta t = 1^\circ\text{C}$;

$-\sum a_j \cdot l_j$ -- топлинните загуби от инфильтрация на въздуха през фугите на прозорци и външни врати, също за $\Delta t = 1^\circ\text{C}$;

- c_v -масов топлинен капацитет на въздуха;
 $-F$ -сумата от площите на всички заграждащи елементи;

$-t_n$ -температурата в помещението;

$-t_{из}$ -изчислителната стойност на външната температура. Дава се в справочник за съответния климатичен район.

$-a_j$ (kg/m.s) – пропускателната способност на един метър от фугата на j – я заграждащ елемент (врата, прозорец).

В уравнение (1) не е отчетен пренос на топлина през междинни стени към съседни помещения. Прието е, че такъв пренос липсва.

2.2. Акумулиращата способност се определя по количеството топлина, която погълщат или отдават заграждащите елементи (стени, таван, под) при изменение на температурата им в интервала ($t_{п.н} \pm \Delta$). **Предлага се**, акумулиращата способност да се оценява по количеството топлина Q_a , отдадена от стената за 1s., т.е. по мощността на отдавания топлинен поток непосредствено след изключването на топлоподаването:

$$Q_a = \sum c_i \cdot m_i \cdot \frac{dt}{dt} \quad (4)$$

Тук: c_i и m_i са топлинния капацитет и масата на i -я заграждащ елемент. Не влизат прозорци и леки врати като незначителни спрямо стените, подовите, таваните, както и други масивни тела в помещението, които имат висок топлинен капацитет (c_i) и голяма маса;

$-t_{ст}$ – повърхностна температура на заграждащия елемент отвътре;

$-t$ -време;

Приема се, че във всички точки от вътрешната повърхност на заграждащия елемент, както и на въздуха в помещението промяната на температурата е едновременна, с една и съща стойност и знак.

Очевидно, мощността на топлинния поток (Q_a) е максимална в началния момент, веднага след изключване на отоплителното тяло, когато е налице максимална външна температурна разлика ($t_{max} - t_{из}$).

Полага се:

$$Q_a = \sum c_i \cdot m_i \cdot \frac{dt_n}{dt} = B \cdot F \cdot (t_{max} - t_{min}), \quad (5)$$

откъдето

$$B = \frac{\sum c_i \cdot m_i}{F \cdot (t_{max} - t_{min})} \cdot \frac{dt}{dt} \quad (6)$$

$$t_{min} = t_{п.н} - \Delta; \quad t_{max} = t_{п.н} + \Delta.$$

Съгласно предложеното, B е постоянна величина. Нейната стойност се определя от ма-

сата и топлофизическите свойства на използваните строителни материали. Това е количеството топлина, необходима за повишаване на температурата с 1°C на стена с площ 1m^2 .

От (6) се вижда, че коефициентът B има дименсия $[\text{W}/\text{m}^2\text{C}]$.

В уравнение (5) Q_a е изразена чрез градиента на повърхностната температура на стената ($t_{ст}$).

2.3. Термостабилността на помещението се оценява по стойностите на отношението между факторите D и B .

3. Решение на задачата.

Същността на предложеното се базира на следните предпоставки:

а) в началото, при включване на отоплението, цялата мощност на топлинния източник се изразходва за загряване на заграждащите стени на помещението (за повишаване на тяхната температура), т.е. подадената топлина изцяло се акумулира. С повишаване на температурата на въздуха в помещението и на стените част от подаваната топлина се изразходва за покриване на нарастващите топлинни загуби. След достигане на максималната температура в помещението ($t_{max} = t_{п.н} + \Delta$) процесът на акумулиране завършва, разпределението на температурата напречно в стените става стационарно. Подаваната топлина изцяло се използва за компенсиране на топлинните загуби на помещението, които в този момент са максимални. Налице е установен режим;

б) непосредствено след изключване на отоплението, топлинните загуби се компенсират чрез акумулираната в стените топлина. Това води до понижаване на температурата им, респективно до намаляване на температурата в помещението. Приема се, че от момента на изключване на отоплението топлинният баланс е:

$$Q_3 = -Q_a. \quad (8)$$

Процесът отново става нестационарен, поради постепенното понижаване на температурата в помещението и на стените;

в) мощността на топлинния поток, отдаван от стените (Q_a) се изразява чрез фактора B по (5), в която производната на температурата по повърхността на стената се изразява чрез производната на температурата в помещението (dt_n/dt). За целта се използва лесно доказуемият поправъчен коефициент $[1 - (k/\alpha_1)]$, който с първо приближаване се приема за 1, както е направено по-нататък в изложението.

Тук: k -обобщеният коефициент на топлопреминаване ($k=D$) съгласно (2);

- α_1 - коефициент на топлоотдаване от въздуха в стаята към вътрешната страна на стената.

Следователно, от (2) и (4) се получава:

$$\frac{dt_{\text{п}}}{(t_{\text{п}} - t_{\text{из}})} = -A \cdot d\tau; \quad (9)$$

$$t_{\text{п}} = t_{\text{из}} + (t_{\text{max}} - t_{\text{из}}) \cdot e^{-A\tau} \quad (10)$$

От последната зависимост се намира производната $dt_{\text{п}}/d\tau$ за $\tau=0$ и ($t_{\text{из}}=\text{const.}$):

$$\frac{dt_{\text{п}}}{d\tau} = -A \cdot (t_{\text{max}} - t_{\text{из}}). \quad (11)$$

По аналогичен начин се описва изменението на топлинния поток през стените като функция от времето, като се използва факторът B :

$$\sum(c_i \cdot m_i) \frac{dt}{d\tau} = B \cdot F \cdot (t_{\text{п}} - t_{\text{min}}). \quad (12)$$

Полага се

$$\frac{B \cdot F}{c_i \cdot m_i} = K. \quad (13)$$

След заместване в (12) и интегриране, се получава

$$t_{\text{п}} = t_{\text{min}} + (t_{\text{max}} - t_{\text{min}}) \cdot e^{K\tau} \quad (14)$$

Производната от последния израз при $\tau = 0$ е

$$\frac{dt_{\text{п}}}{d\tau} = K \cdot (t_{\text{max}} - t_{\text{min}}). \quad (15)$$

Зависимостите (11) и (15) имат важно практическо значение. Те дават възможност за получаване на бърза и достатъчно точна информация от сравнително лесно проведени измервания в реални условия.

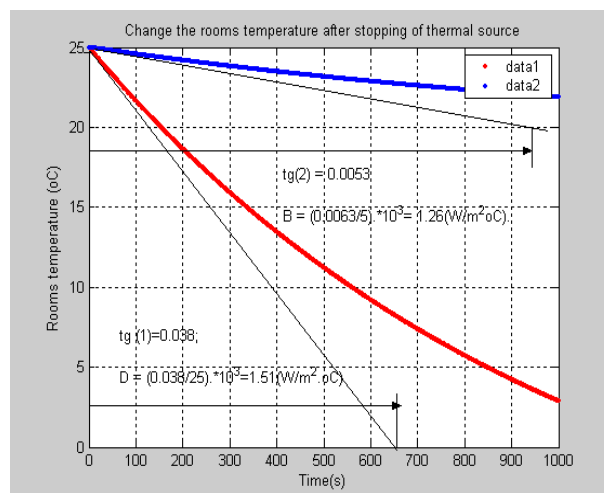
На фиг.1 е представен графичният вид на уравнение (10). Той показва апериодичния характер на функцията $t_{\text{п}}(\tau)$ след изключване на отоплението.

Линията ($dt_{\text{п}}/d\tau$) по (11) е допирателната линия към графиката $t_{\text{п}}(\tau)$ по (10) при $\tau = 0$, т.е. в началната ѝ точка.

Както е известно [2], допирателната в точка от графиката е права линия, чийто ъглов коефициент числено е равен на тангенса на ъгъла с абсисната ос. Ъгловият коефициент по (15) е равен на производната на функцията $t_{\text{п}}(\tau)$ в тази точка по (14). В конкретния пример това е

$$dt/d\tau = -\text{tg} \beta. \quad (16)$$

Необходимо е да се знае, че $\text{tg} \alpha$, съгласно фиг.1, има дименсия $[\text{°C/s}]$, т.е. както на производната ($dt/d\tau$) - скорост на охлаждане.



Фиг.1

На фиг.1 са показани графиките на стайната температура за съществуващо помещение с нормална температура $t_{\text{п,н}} = 22\text{°C}$ и амплитуда $\pm\Delta = \pm 3\text{°C} = 6\text{°C}$ и $t_{\text{из}} = -10\text{°C}$. Долната графика се отнася за действителните топлинните загуби, изразени с фактора (D) и температурна разлика ($t_{\text{max}} - t_{\text{из}}$). Определеният по графичен начин $\tan(1) = 0,038$. От тук и съгласно (3), по конкретни данни, се определя $D = 0,264 \left[\frac{\text{W}}{\text{m}^2 \text{°C}} \right]$. Според известното в литературата [1] тази стойност е благоприятна и не се препоръчва допълнителна изолация на тази стена.

Графиката се отнася за топлинните загуби, изразени чрез коефициента (B) за акумулационната способност и амплитудата на температурата в стаята. Според справочната литература получената стойност за $B = 1,26 \left[\frac{\text{W}}{\text{m}^2 \text{°C}} \right]$ влиза в границите, макар и към ниските стойности, които са неблагоприятни.

Чрез показния числен пример убедително се доказва възможността за приблизителна оценка на енергоспестяващите показатели на помещението.

Заклучение

Изложеното в настоящата статия обосновава един приблизителен начин за изчисляване на стойностите на (D) и на отношението между фактора на изолационната способност на сградата (D) и на акумулиращата ѝ способност (B), като се използва уравнението за топлинния баланс през време на преходния процес след изключване на топлоподаването. Методът се базира на експериментално установяване на действителните топлинни загуби и изменението на температурата в помещението

през времето на този период, за произволно избрана външна температурна разлика ($t_n - t_{вн}$).

Получените по този метод стойности на отношението (B/D) дават възможност за обобщена оценка на термостабилността на помещението (сградата), което тук не е представено. Точното спазване на условията на експеримента и измерванията обуславят достоверността на резултатите.

Методиката на експеримента авторът представя в друга статия.

Литература:

1.Иванов,В. „Отопление и вентиляция“-Техника,С.1992;

2.Семендяев, „Справочник по математика“-Наука,М.1989;

3.Иванов, В. и др. „Уедрени показатели за определяне на топлинните загуби в обществени и битови сгради“. Известия на БАН, 2002.

Румен Янков

Университет: ТУ-София, Колеж-Сливен

Катедра: „Автотранспорт, текстил и дизайн“

Адрес: гр.Сливен, „Бургаско шосе“ 59

e-mail: r.yankov_@abv.bg



БИОИНФОРМАТИКАТА И СЪЗДАВАНЕТО НА МИКРОСАТЕЛИТНИ МАРКЕРИ В СЕЛЕКЦИЯТА НА КУЛТУРИ ОТ СЕМЕЙСТВО SOLANACEAE

Андрей Попатанасов, Нася Томлекова

BIOINFORMATICS AND MICROSATELLITE MARKER DEVELOPMENT FOR SOLANACEAE CROPS BREEDING

Andrey Popatanasov, Nasya Tomlekova

ABSTRACT: Nowadays the molecular markers play important role in the crops breeding. Many markers systems were developed over the years – some became obsolete, while others are still used and developed. Among them the microsatellite markers gained respectable popularity and became one of the most used marker system since their introduction several decades ago. During this period their development strategies and workflow underwent significant progress and transformation. This progress to some extent was driven by several technological breakthroughs and innovations in the sequencing technologies and the information processing hardware and software. During the evolution of the microsatellite molecular markers developmental process and strategy in the last couple decades the role of the bioinformatics underwent significant change gaining pivotal importance in it. With the help of the bioinformatics it became possible significant part of microsatellite markers development to be performed in silico which greatly reduces the cost of the application of this marker system in crop breeding programs and also offers new possibilities for usage and progress.

Some of the most important crops worldwide belong to Solanaceae family and as of today the number of their varieties is in the range of thousands. It was found that the microsatellites have rather abundant distribution in many of their genomes which partly makes the microsatellite markers appealing system of choice for many researchers and crop breeders.

Keywords: Capsicum spp., Solanum spp., Solanaceae, genome, SSR, microsatellite

Molecular markers in plant breeding - microsatellites and other common systems used

The plant genetic variations and their identification and utilization for the crop improvement are fundamental in plant breeding. To select the most appropriate parents, to cross them and to assess and select the most desirable individuals in the resulted progeny can be rather time consuming, laborious and expensive. Since their introduction in the plant breeding in XX-th century the molecular markers proved they are able to simplify, improve and speed up this process and reduce the costs to some extent.

The molecular markers are used to: A/. track loci, genes and/or genome regions; B/. detect polymorphisms; C/. track loci in backcross breeding to eliminate specific genetic defects; D/. build crucial parents or enrich F1s from complex crosses in progeny breeding; F/. improve strategies for gene deployment or improve understanding of gene control of complex traits

etc. (Lörz & Wenzel, 2006; Farooq & Azam, 2002; Senan et al., 2014).

Generally molecular markers can be characterized as assays that provide detection of specific sequence differences between two or more individuals of interest. The early molecular markers methods were protein-based as the isoenzyme ones which were popular before the introduction of the DNA-based molecular markers in the 80s. DNA-based molecular markers gradually replaced the protein based ones. So far various DNA-based molecular markers systems were invented and are in use in plant breeding. In each one of them is detected DNA sequence variation, but each one analyzes different aspects of DNA sequence variations and different regions of the genome. The decision which molecular markers system to use depends on many factors as the species of interest, objective of the work/study, the available resources etc. (Senan et al., 2014; Nadeem et al., 2017; Lörz & Wenzel, 2006). To provide base for comparison with microsatellites (table 1) are presented briefly some

of the most common DNA-based molecular markers system used in the plant breeding.

Table 1: Comparison of the most popular molecular markers. Abbreviations: cD – co-dominant; D - dominant; H – high; M – Medium; L – low; LG – large; S – small; SS – specific sequence; PM - Physical mapping; GT - Gene tagging; GM - Genetic diversity.

	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	ISSR	SNP
Genomic abundance	H	H	H	H	H	VH
Inheritance/ expression	cD	D	D/cD	cD	D	cD
Reproducibility	H	H	H	M-H	L	H
Polymorphism	M	M-H	M-H	M-H	H	H
Number of loci	S	S	M	H	M	VH
Technical requirements	M	L	M	L	L	H
DNA amount	LG	S	M	S	S	S
DNA quality	H	M	H	M-H	H	H
Type of probes/ primers	cDNA clone	10bp PR	SS	SS	SS	allele spec.
PCR-based	no	yes	yes	yes	yes	yes
Ease of automation	L	M	M-H	H	M-H	H
Cost per analysis	H	L	M	L	L	L
Development cost	M-H	L	M	M-H	M	H
Major application	PM	GT	GT	GD		GD

RFLP (restriction fragment length polymorphism) technique is historically the first DNA-based molecular marker system which was introduced in 1980 (Botstein, et al., 1980). The method is based on the usage of restriction enzymes. Mutations can occur at the restriction sites of some enzymes or in the fragments cleaved by them which results in fragment size differences. The different restriction products are detected by electrophoresis and DNA probing techniques.

RFLP markers are very useful for comparative and syntenic mapping. The usage of radioactive materials, laboriousness and large amounts DNA make it less preferred method nowadays (Farooq & Azam, 2002; Senan et al., 2014).

The discovery of the polymerase chain reaction (PCR) (Mullis et al., 1986) created a breakthrough in the field of the DNA-based molecular markers. Due to its efficiency, simplicity and ease of use and many molecular marker systems were developed based on it as random amplified polymorphic DNA, amplified fragment length polymorphism, microsatellites etc.

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was introduced in 1990 by Williams et al. and Welsh and McClelland (Williams et al., 1990; Welsh & McClelland, 1990). This PCR-based method uses single short (10nucleotides) and random primer to amplify matching parts of the total genomic DNA of the individual. Polymorphisms are observed through electrophoresis and are result from mutations or rearrangements which occurred either between or at the primer-binding sites (Nadeem et al., 2017; Agarwal, et al., 2008). This method can be used without prior knowledge of the analyzed genome and can be employed across species by using universal primers. It also is rather simple and cost effective and is still used in many crops breeding programs. However its major drawbacks are the very low reproducibility and lack of capacity to detect allelic differences in heterozygotes (Farooq & Azam, 2002; Senan et al., 2014; Nadeem et al., 2017).

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique was introduced in 1995 by Vos et al. (Vos et al., 1995). It overcomes the limitations of RFLP by using PCR with limited set of primers to amplify the restricted DNA fragments which are ligated with primer recognition sequences (adaptors) to them. Usually an AFLP fingerprint consist of 50-100 amplified fragments produced by used primer pairs per assay. This technique also does not require a priori knowledge of the genomic DNA. It is helpful in establishing linkage groups in crosses, assessing the degree of relatedness or variability among cultivars etc. Among its disadvantages are the demand for high quality DNA, higher complexity and cost, low polymorphic information for for bi-allelic markers, dense clustering in some chromosome regions etc. (Farooq & Azam, 2002; Senan et al., 2014; Jiang, 2013).

Single nucleotide polymorphism (SNP) technique was introduced at the beginning of the

XXI-st century (Gupta et al., 2001). It is based on the single nucleotide variations in genome sequence of individuals of a population of interest. The estimated frequency of these variations is very high for example – 1 SNP per 100-300bp in general in plants, 1 SNP per 60-120bp for maize and 1SNP per 1000bp in humans, however most of them are located in the non-coding regions (Nadeem et al., 2017; Agarwal, et al., 2008).

Various techniques were developed for the detection of the SNPs, however the most promising and thorough are the high-throughput genotyping methods. However their cost and equipment is still prohibitive for many low income countries.

They can be used for many purposes as construction of ultra high-density genetic maps, rapid identification of crop cultivars and etc. (Nadeem et al., 2017; Agarwal, et al., 2008; Senan et al., 2014).

Most of these methods are decreasingly popular nowadays according to Schlötterer, C. and Grover & Sharma (Schlötterer, 2004; Grover & Sharma, 2016). With exception of the SNPs they do not rely on bioinformatics' tools as core part of their workflow.

Microsatellites – properties and usefulness as molecular markers

Microsatellites also termed - simple sequence repeats (SSRs), Short Tandem Repeats (STRs) or just simple sequences - are tandemly arranged repeats of short DNA motifs with length 1–6 bp. (Farooq & Azam, 2002; Senan et al., 2014; Jiang, 2013). They were discovered in the 1980s and since then they were found in many prokaryotic and eukaryotic genomes in consequent studies (Zane et al, 2002). There is huge amount of simple sequence repeats spread out all over the genome and especially in the euchromatin of the eukaryotes. They are distributed in the protein-coding nuclear DNA and as well in the non-coding one and they are also found in the organellar DNA. However it has been shown that simple sequence repeats are more abundant in non-coding regions than in coding regions (Popatanasov & Tomlekova, 2019).

Microsatellites or simple sequence repeat (SSR) technique emerged as molecular marker system in the early 90s shortly after the discovery of the microsatellites.

The simple sequence repeats have relatively high mutation rates with range from 10^{-2} to 10^{-6} .

This results in alterations in their length. Such length variability of the simple sequence repeats is one of the reasons for their wide usage as markers for use in genetic mapping and breeding. Since their discovery microsatellites became one of the most attractive markers for plant genetics and breeding. Because of some of their properties as their ease of detection by PCR, being locus-specific and multi-allelic, exhibiting co-dominant transmission, and their high rates of transferability across species microsatellites have several appealing advantages as molecular markers. (Farooq & Azam, 2002; Senan et al., 2014; Nadeem et al., 2017).

Inter simple sequence repeat (ISSR) technique is derivative of the microsatellites method introduced in 1994 by Zietkiewicz et al. (Nadeem et al., 2017). It uses two identical but oppositely oriented microsatellite repeat regions for the amplification of the DNA sequence located in between them. The used primers with length 15-30 bases are part of the microsatellite regions whose adjacent segments will be amplified. Typically the used primers are anchored i.e. have 1-4 degenerate bases at one of their ends which disturb the microsatellite motif repetitive pattern (Senan et al., 2014; Nadeem et al., 2017).

ISSR is simple to use and unlike the closely related microsatellites technique it does not require a prior knowledge of the genome of interest. However as dominant markers they have lower reproducibility with homology of co-migrating amplification products (Nadeem et al., 2017).

Microsatellites in the some crops from *Solanaceae* family

Some of the most important crops in the world belong to the *Solanaceae* family. Some of them as tomato (*Solanum lycopersicum* L.), eggplant (*Solanum melongena* L.), pepper (*Capsicum annuum* L.) and etc. with the advance the whole genome sequencing methods got their whole genomes sequenced and assembled. Thus high quality reference or draft genomes of them became available to the scientific community (Fernandez-Pozo, et al., 2015). Tomato has been found to have over 1,400,000 SSRs spread over the draft genome of 760 megabases (while its total predicted size is over 900MB) (Tomato Genome Consortium, 2012); the eggplant has over 133,000 SSRs distributed in 74% of the draft genome (whose total size is predicted to be approx. 1.1GB) (Hirakawa, et al., 2014; Portis, et

al., 2018); the pepper has over 3,000,000 SSRs distributed in the draft genome of 3GB (with estimated genome size of 3.48GB) (Popatanasov & Tomlekova, 2019; Kim, et al. 2014). As we can see the microsatellites are considerably abundant especially in the pepper's genome which also is 3-4 fold larger than the other mentioned genomes, something which should give more opportunities for SSR-marker design for use in the breeding practices. However regardless this wealth of microsatellites the number of them which is utilized as molecular markers so far is negligibly low – for the eggplant it is less than 1%, and for pepper is even lower (Portis, et al., 2018; Popatanasov & Tomlekova, 2019; Kim, et al. 2014).

Such low level of utilization of the microsatellites is mostly due to the fact that unlike most of the discussed molecular marker systems this one needs a priori knowledge at least for part of the genome of interest. To gain such knowledge even today is expensive and time consuming for most of the species with less studied genomes.

However regardless such hinders SSRs are still one of the most common markers in use even though there are newer marker systems as SNPs (Grover & Sharma, 2016).

The evolution of the microsatellite marker system

As in many areas of the science the progress of the microsatellite molecular markers development is helped or driven by the breakthroughs and innovations in other fields. In order to understand the role and the possibilities of the bioinformatics in the microsatellite marker development will be presented briefly in historical fashion the key periods of the strategies for the molecular marker development. The proposed key periods are divided based on significant changes in the methods utilized in such marker development, the changes in the workflow etc. Typically the transition is marked with some technological breakthroughs in DNA-technologies or information processing tools and facilities. As it will be shown the role of the bioinformatics changes dramatically and becomes nowadays a cornerstone for the development of these type molecular markers.

Development microsatellites molecular markers in the era of the “unknown” DNA-sequence code

In the pre-genomic era at the end of XX-th century the available sequencing technologies permitted rather slow and expensive sequencing of short fragments of DNA. The majority geneticist were focused mostly on the coding regions of the genomes of the organisms of interest. However the majority of microsatellites were found mostly in the non-coding regions, so the sequencing efforts of the geneticists were of little value for the development of microsatellite based molecular markers. Therefore in most cases the part of the genome of the organism of interest had to be sequenced de novo with the purpose of development of microsatellite markers for it. This in most cases was rather time-consuming and laborious and costly process. The role of the bioinformatics was secondary at most – to analyze and process statistically relatively short DNA-sequences of approx. few hundred bases in length. Personal computers were scarce and with command line interface and only general DNA-analyzing tools as Repeatmasker were available (Grover & Sharma, 2016; Gauthier et al., 2019; Ouzounis, 2009). Many protocols have been developed and here schematically is presented one of the most common (Senan, et al., 2014; Kalia, et al., 2011):

- 1/. Fragmenting high quality genomic DNA using restriction enzymes or by sonication.

- 2/. Size-selection of the fragmented DNA to obtain small fragments (300—700 bp)

- 3/. Ligation of the DNA fragments into some common plasmid vector directly or after ligation to specific adaptors.

- 4/. Bacterial cells transformation with the ligation products. This usually yields thousands of recombinant clones.

- 5/. Screening for positive clones for the presence of microsatellite sequences usually with Southern hybridization and repeat-containing probes.

- 6/. After the identification of the repeat containing clones, are designed specific primers.

- 7/. Optimization of the PCR conditions in order to allow the amplification of each locus from different individuals of a given population.

Development microsatellites molecular markers in genes era

By the end of XX-th and the beginning of the XXI-st century the quest for gene decoding with the advance of the sequencing technologies lead to accumulation of increasing amount of sequenced genomic data for many organisms.

Since microsatellite in lower extend occur in the coding regions and increasing number expressed sequence tags (EST) became available free of charge gradually it was developed and gained popularity EST-simple sequence repeats (EST SSR) markers. Computer hardware and software became more powerful and available for more scientists and labs. Desktop stations became smaller and were developed more dedicated to DNA-sequence analysis software tools with better user interface, which probably helped more researchers even without programming skills to get involved in such type research (Gauthier et al., 2019; Ouzounis, 2009). Many specialized software tools for microsatellite searching and analysis in DNA-sequence data were developed as MISA, tools as VNTRfinder, Poly also attempted to predict the polymorphic potential of the microsatellites (Grover & Sharma, 2016). Web resources as DNA sequence libraries and sequence analyzing tools as WebSat became better and available to the researchers under the Richard Stallman's philosophy of free software for the scientific community (Gauthier et al., 2019; Martins et al., 2009). All this opened new possibilities and strategies for microsatellite markers development. The bioinformatics took more prominent role in the microsatellite markers development process and schematically the workflow can be divided in the following stages (Senan, et al., 2014; Kalia, et al., 2011):

- 1/. Acquiring/building database of available sequenced expressed sequence tags produced mostly for non-SSR marker purposes.
- 2/. In silico data mining and analysis:
 - 2.1/. Sequence data analysis and processing (trimming, contig assembly etc. if needed)
 - 2.2/. SSR identification using bioinformatics tools
 - 2.3/. Primer design
- 3/. Primer synthesis
- 4/. Screening and optimization of PCR conditions
- 5/. Testing primers for polymorphism in genetically related and distant individuals

Development microsatellites molecular markers in the genomic era

The field of the molecular markers development in second decade of the XXI-st century was changed further by the significant advances in the DNA sequencing technologies. The world welcomed the BigData revolution - Moore's Law

stopped being a good predictor of DNA sequencing costs, since they dropped several orders of magnitude (Gauthier et al., 2019).

These sequencing technologies became better in their capacity, quantity and quality output, the equipment and some consumables became cheaper plus the speed and cost of DNA-sequencing was dramatically reduced and more research centers and labs increased their interest in larger scale DNA sequencing as is the task of sequencing the often huge non-coding regions or even whole genomes. This change was also possible and boosted by the parallel advances in the computer industry. Multi-core processors and high density processing units were invented and produced, while jointly increasing their calculation capacity per core. The old software was rebuilt and new one was created to benefit and implement the multi-thread capacity of the new processors. Also the capacity and speed of the storage hardware was greatly increased, while the cost was reduced. (Esteban, et al., 2011; Gauthier et al., 2019; Ouzounis, 2009). Bioinformatics web-tools and web-resources as NCBI, BLAST etc. which facilitate the microsatellite research were further developed and made accessible under the Richard Stallman's philosophy of free software for the scientific community (Gauthier et al., 2019). Gradually increasing number of crops including the some of the *Solanaceae* got their whole genome sequenced and available to the scientific community (Fernandez-Pozo, et al., 2015; Tomato Genome Consortium, 2012; Hirakawa, et al., 2014; Kim, et al. 2014). Special web-tools as GMATo capable to more efficiently process whole-genome search and analysis of microsatellites were developed (Wang, et al. 2013).

The bioinformatics took fundamental role in the microsatellite markers development strategy and schematically the workflow can be divided in the following stages (Senan, et al., 2014; Kalia, et al., 2011):

- 1/. Next generation sequencing
- 2/. Generating short reads of the genomic sequence/s of interest
- 3/. In silico data mining and analysis:
 - 3.1/. Sequence data analysis and processing (trimming, contig assembly etc.)
 - 3.2/. SSR identification using bioinformatics tools.
 - 3.3/. Primer design
- 4/. Primer synthesis
- 5/. Screening and optimization of PCR conditions

6/. Testing primers for polymorphism in genetically related and distant individuals

Current trends in the development microsatellites molecular markers

In the last few years we observed the global revolution of the cloud computing progress and its worldwide implementation in many fields of life. The field of the molecular markers development greatly benefited from it. Now even research centers with limited funds can become more engaged in the microsatellite markers development with low to moderately powerful personal computer stations and sufficiently good broadband access to the internet. These innovations further change the process of the microsatellite markers development.

Recently as part of the international G2P-SOL project: “Linking genetic resources, genomes and phenotypes of Solanaceous crops” was developed the web resource “Eggplant Microsatellite DataBase” (EgMiDB). The team analyzed the whole genome of the eggplant and mapped all the microsatellites. As a result it was found that almost 5000 genes have at least one perfect or imperfect microsatellite. With such information in the cloud it permits identification of SSR markers in terms of their location on the genome, type of repeat (perfect vs. imperfect), motif type, sequence, repeat number and genomic/gene context. It also suggests forward and reverse primers.

This will further revolutionize the microsatellite marker development since it will help the researcher to narrow and place it microsatellite marker development goals in advance and look for the appropriate solution in the genome-microsatellite database. Something which was impossible few decades ago when the researcher was mostly blind of the position of the found candidate microsatellite markers which he discovered after long and tedious process as can be inferred from the related studies (Nunome et al., 2003a,b; Nagy et al., 1995) from that era.

So depending on the research goal/s a possible scenario of workflow for the microsatellite markers development with the usage of the EgMiDB web resource will schematically look like:

1/. Select and define the trait/s of interest.

2/. Find as much as possible, which genes are involved in it.

3/. In silico mining and analysis.

3.1/. Identify the position of the genes in the pseudo-chromosomes.

3.2/. Find the microsatellites in the coding region or in the adjacent non-coding regions. Choose the most appropriate/s.

3.3/. Primer design

4/. Primer synthesis

5/. Screening and optimization of PCR conditions

6/. Testing primers for polymorphism in genetically related and distant individuals.

Conclusion

The microsatellite marker system has evolved considerably since its introduction in the 90s. And regardless there are newer molecular marker systems which are better in some aspects, the microsatellites are still the most used molecular marker system as a recent comparative study showed (Grover & Sharma, 2016). With its simplicity, good reproducibility, high polymorphism and increasingly dropping costs it will continue to be among the choices of the researchers in the future. And with the additional benefit of the nowadays almost free marker selection and design of markers for the crops with sufficiently available genomic information and data in the web-resources and services it is expected that this marker system will be further maintained and developed.

References

- Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant cell reports*, 27(4), 617-631.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3), 314.
- Esteban, F. J., Díaz, D., Hernández, P., Caballero, J. A., Dorado, G., & Gálvez, S. (2011, March). Many-Core Processor Bioinformatics and Next-Generation Sequencing. In: International Conference on IT Revolutions (pp. 172-188). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Farooq, S., & Azam, F. (2002). Molecular markers in plant breeding-I: concepts and characterization. *Pakistan journal of biological sciences*, 5(10), 1135-1140.
- Fernandez-Pozo, N., Menda, N., Edwards, J. D., Saha, S., Tecle, I. Y., Strickler, S. R., ... & Mueller, L. A. (2015). The Sol Genomics Network (SGN)—from genotype to phenotype to

- breeding. *Nucleic acids research*, 43(D1), D1036-D1041.
- Gauthier, J., Vincent, A. T., Charette, S. J., & Derome, N. (2019). A brief history of bioinformatics. *Briefings in bioinformatics*, 20(6), 1981-1996.
- Grover, A., & Sharma, P. C. (2016). Development and use of molecular markers: past and present. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 290-302.
- Gupta, P. K., Roy, J. K., & Prasad, M. (2001). Single nucleotide polymorphisms: a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Current science*, 524-535.
- Hirakawa, H., Shirasawa, K., Miyatake, K. O. J. I., Nunome, T., Negoro, S., Ohya, A. K. I. O., ... & Fukuoka, H. (2014). Draft genome sequence of eggplant (*Solanum melongena* L.): the representative solanum species indigenous to the old world. *DNA research*, 21(6), 649-660.
- Jiang, G. L. (2013). Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. *Plant breeding from laboratories to fields*, 45-83.
- Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R., & Dhawan, A. K. (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177(3), 309-334.
- Kim, S., Park, M., Yeom, S. I., Kim, Y. M., Lee, J. M., Lee, H. A., ... & Choi, D. (2014). Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nature genetics*, 46(3), 270-278.
- Lörz, H., & Wenzel, G. (Eds.). (2006). Molecular marker systems in plant breeding and crop improvement. Springer, Berlin.
- Martins, W. S., Lucas, D. C. S., de Souza Neves, K. F., & Bertioli, D. J. (2009). WebSat-A web software for microsatellite marker development. *Bioinformation*, 3(6), 282.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R. K., Horn, G. T., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 51, pp. 263-273). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., ... & Baloch, F. S. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), 261-285.
- Nagy, I., Krackhardt, M., Buchema, N., Fari, M., & Andrasfalvy, A. (1995). Studies on molecular polymorphism of pepper and eggplant. In: EUCARPIA: IXth meeting on genetics and breeding on *Capsicum* and eggplant (Budapest Aug 21-25, 1995, Hungary). EUCARPIA.
- Nunome, T., Suwabe, K., Iketani, H., Hirai, M., & Wricke, G. (2003). Identification and characterization of microsatellites in eggplant. *Plant Breeding*, 122(3), 256-262.
- Nunome, T., Suwabe, K., Ohya, A., & Fukuoka, H. (2003). Characterization of trinucleotide microsatellites in eggplant. *Breeding science*, 53(1), 77-83.
- Ouzounis, C. A. (2009). The emergence of bioinformatics: historical perspective, quick overview and future trends. In: *Bioinformatics in cancer and cancer therapy* (pp. 1-11). Humana Press, New York.
- Popatanasov, A. & Tomlekova, N. (2019). Microsatellites in the genome of *Capsicum annum* L.. *Academic Journal of Industrial Technologies*, 6(1), 18-23.
- Portis, E., Lanteri, S., Barchi, L., Portis, F., Valente, L., Toppino, L., ... & Acquadro, A. (2018). Comprehensive characterization of simple sequence repeats in eggplant (*Solanum melongena* L.) genome and construction of a web resource. *Frontiers in plant science*, 9, 401.
- Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers—just a matter of fashion?. *Nature reviews genetics*, 5(1), 63-69.
- Senan, S., Kizhakayil, D., Sasikumar, B., & Sheeja, T. E. (2014). Methods for development of microsatellite markers: an overview. *Notulae Scientia Biologicae*, 6(1), 1-13.
- Tomato Genome Consortium. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. V. D., Hornes, M., ... & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23(21), 4407-4414.
- Wang, X., Lu, P., & Luo, Z. (2013). GMATo: a novel tool for the identification and analysis of microsatellites in large genomes. *Bioinformation*, 9(10), 541.
- Welsh, J., & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research*, 18(24), 7213-7218.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers

are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535.

Zane, L., Bargelloni, L., & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular ecology*, 11(1), 1-16.

Andrey Popatanasov

Plovdiv University

Biology

2 T. Samodumov St.

e-mail: and_atanasov@abv.bg

Nasya Tomlekova

Agricultural Academy

Maritsa Vegetable crops Institute

32 Brezovsko Shose St.



НОВИ ПЕРСПЕКТИВИ ЗА ПРИЛОЖЕНИЕТО НА ПЧЕЛНИЯ ПРАШЕЦ В АЛТЕРНАТИВНИ НАПРАВЛЕНИЯ

Марияна Топузова, Мина Тодорова, Надежда Петкова, Иван Иванов

NEW PERSPECTIVES FOR THE APPLICATION OF BEE POLLEN IN ALTERNATIVE DIRECTIONS

Mariyana Topuzova, Mina Todorova, Nadezhda Petkova, Ivan Ivanov

ABSTRACT: Recently, interest in bee pollen is growing due to the recognition of its nutritional and biological potential. The bee pollen has a valuable chemical composition that varies depending on the flora and climate in the latitudes from which it is collected. It contains carbohydrates, proteins and all essential amino acids. In the beehive, pollen is the only food for bees and larvae and is important for their survival. The collected pollen of bees attracts attention as a "functional food" due to its high content of bioactive substances. In the human nutrition it is most often used as a dietary supplement, providing a feeling of well-being and contributing to the functional and nutritional balance of the body. It is rich in polyphenols, flavanoids, β -carotene, vitamin C, as well as micro- and macroelements, as a result of which it has a wide range of pharmacological activities (antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, immunomodulatory, antiallergic, etc.). All this predetermines the interest in this bee product and its great potential in its application to various areas of life such as pharmacy, alternative medicine, cosmetics and food industry. The study of detailed information about its chemical composition is important for both nutrition and medical cosmetics.

Key words: bee pollen, functional foods, cosmetics.

Пчелен прашец и неговия химичен състав

Пчелният прашец се произвежда като медоносните пчели (*Apis mellifera*) събират цветен прашец, който се смесва със секрет от техните слюнчени жлези и нектар. Поленът се събира от разнообразни растения, така че съдържанието на пчелен прашец може да варира значително в зависимост от географския регион и климатичните условия. В кошера го оформят като топчета, покрити с мед и восък и се получава така наречения пчелен прашец или перга. При такива условия анаеробната ферментация протича с образуването на млечна киселина, която служи като консервант. пчелите се хранят с прашеца в кошера през всички етапи на развитие [1-3].

Поленът е единственият източник на протеини и липиди и основен източник на макро- и микроелементи за пчелното семейство [4]. В състава му са открити над 250 биологично-активни вещества - протеини, въглехидрати, липиди, фенолни съединения, ензими, както и витамини и микроелементи. Химичният състав на пчелния прашец, зависи силно от рас-

тителния източник и географски произход, заедно с други фактори като климатични условия, характеристиките на почвата, видът на пчелите и работата на пчеларя [5,6].

В състава на прашеца влизат белтъци, както и всички незаменими аминокиселини, необходими на човешкия организъм и затова е и определена като „идеално пълноценна храна“ [7]. В масово консумиран и изнасян на световния пазар китайски прашец съдържанието на белтък е над 20% [8], както и в проби прашец, събиран в южната част на Бразилия [9]. Във всички проби от изследвания китайски прашец се съдържат незаменимите аминокиселини, като техните стойности са близки или надвишават препоръчаните количества от Световната здравна организация. Освен това се съдържат и неесенциални аминокиселини – серин, пролин, глицин, аланин, цистеин, тирозин, хистидин, аргинин, аспаргинова и глутаминова киселина [8]. В индийски монофлорен пчелен прашец захарите са около 50% [10], а в 22 проби полени, събрани в международния природен парк *Douro* в Португалия – от 62 до 70%[11]. В китайски проби прашец мазнините са от 0.66 до 6.56 % [8], а в

бразилски - 6% [9]. В индийски монофлорен пчелен прашец липидите са около 10% [10]. Във всички дванадесет вида, изследван китайски монофлорен пчелен прашец са открити палмитинова ($C^{16:0}$), олеинова ($C^{18:1}$), линолова ($C^{18:2}$) и арахидинова ($C^{20:0}$), заедно с малки количества каприлова ($C^{8:0}$), капринова ($C^{10:0}$), лауринова ($C^{12:0}$) и мирисинова ($C^{14:0}$). а в определени проби – γ -лененова ($C^{18:3}$) [8]. Поленът, събран от цветовете на кестен се характеризира с високо съдържание на омега-6 мастни киселини, докато този от цвят от върба е с висока концентрация на омега-3 мастни киселини [12]. В проби китайски пчелен прашец е установено високо съдържание на полезни елементи K, Ca, Mg, Zn, Fe, Mn и Cu. В изследваните проби е открито високо количество на Al с концентрация 100 mg/kg сухо тегло. Количеството на откритите Pb, Cd и Hg е ниско или не е открито [8]. В минимални количества са установени и Na, Cr, Sr, Sn, Ni и V [13].

Пчелният полен съдържа както водоразтворими витамини от В-комплекса, витамин С, витамин РР (рутин) и В8 (инозитол), така и мастноразтворими витамини като А (главно β -каротен), витамин Е и витамин D [14]. Soares de Arruda и съавт. изследват чрез HPLC с флуоресцентен детектор В-витаминния комплекс (В1-тиамин, В2-рибофлавин, В3-никотинова киселина и никотинамид, В6 (пиридоксин, пиридоксал и пиридоксамин) на значими видове полен *Arecaceae*, *Cecropia*, *Cestrum*, *Cyperaceae*, *Eucalyptus*, *Ilex*, *Myrcia*, *Piper*, *Vernonia* и *Trema* от щата Сао Пауло, Бразилия. В полени съотношението между компонентите на В-комплекса е различно, но като влага, пепел, липиди и протеини са близки. Информацията, която се получава служи за показател за хранителното качество на търговския пчелен прашец [15].

Пчелният прашец е храна/добавка, която не се консумира веднага и понякога се съхранява продължително време преди да достигне до потребителя. Съдържанието на антиоксидантните витамини С, Е и β -каротен в изсушен полен се повлиява сериозно от вида на опаковката, условията и времето на съхранение. Трите витамина най-добре се запазват при съхранение във фризер. Витамин Е е най-устойчив при тези условия [16].

Антиоксидантна активност

Антиоксидантната, както и антимикробната активност на пчелния полен е свързана с ботаническия произход на растенията и със съдържащите се фенолни и полифенолни съединения [13]. В проби от португалски пчелен полен съдържанието на общи феноли е в границите 18.55 до 32.15 mg галова киселина/g прашец, общите флавоноиди – от 3.92 до 10.14 mg катехин еквиваленти/g прашец. Антиоксидантната активност, измерена спрямо 1,1-дифенил-2-пикрилхидразилевия радикал (DPPH метод) и инхибиране на пероксидното окисление на липидите с реагенти, които взаимодействат с тиобарбитуровата киселина. Направена е корелационна зависимост между съдържанието на полифеноли и флавоноиди с проведените два метода. Установено е, че антиоксидантната активност слабо се повлиява от съдържанието на тези съединения. Вероятно обяснение за това наблюдение е хетерогенността на изследваните проби [22].

Leja и съавтори установяват, че съдържанието на феноли, флавоноиди и антиоксидантната активност на пчелния прашец се повлиява от поленовите видове около кошерите [23]. Тези наблюдения се потвърждават и от Blaise и съавтори, които изследват пчелен полен и флората около кошери в пустинята Соноран северно от Тусон, Аризона, САЩ. Поленовите гранули са събирани от март до ноември. Установено е, че събраният полен в летните месеци юли и август проявява по-голяма антиоксидантна активност в сравнение с този – през есенните месеци. Метанолните поленови екстракти абсорбират УВ-В лъчението, а това се дължи на съдържащите се флавоноиди и производни на кафеената киселина [24]. Saral и съавт. изследват прашеца на четири пчелни раси в Турция (*Apis mellifera caucasica*, *Apis mellifera anatoliaca*, *Apis mellifera syriaca* и *Apis mellifera carnica*). Проведените изследвания показват, че флората оказва по-съществено влияние върху антиоксидантната активност в сравнение с вида на пчелите [25].

Антимикробна активност

Интересът към пчелния прашец се увеличава поради неговата биоактивност и възможността за приложението му в алтернативната медицина и апитерапията. Редица изс-

ледвания показват, че пчелният прашец проявява антимикробни свойства, те са важни вследствие на възникваща антимикробна резистентност от патогени. Изследванията сочат, че грам (+) бактерии са по-чувствителни спрямо прашеца в сравнение с грам (-).

Fatrco и съавт. изследват съдържанието на полифеноли, антиоксидантна и антимикробна активност на полени от мак, рапица и слънчоглед, събрани от западната част на Словения, район Нитра. Цветният прашец на мак проявява антибактериални свойства срещу *Staphylococcus aureus*, от рапица срещу *Salmonella enterica*, а най-добра антимикробна активност се наблюдава при полен от слънчоглед срещу *Listeria monocytogenes* и *Salmonella enterica* [17]. Полен от Турция показва антибактериална активност срещу *S. aureus* и *L. monocytogenes* [18]. Mărgăoan и съавт. изследват антибактериалната активност на полени срещу *Staphylococcus aureus* в етанолни и метанолни разтвори (60, 70, 80%) с концентрация на прашеца 5%, 10% и 15%. Установено е, че 70% метанолен екстракт с 15% цветен прашец проявява най-висока инхибираща активност срещу бактерията [19]. Katarzyna и съавт. анализират пчелни поленови продукти - пчелни гранули, микронизирани пчелни гранули, цветен прашец таблетки, пчелен хляб и пчелен хляб в мед от търговската мрежа в Полша. Етанолните и метанолните екстракти проявяват активност срещу *S. aureus*, а етанолният и метанолният екстракт на пчелен хляб в мед срещу *Salmonella sp.* [20]. Kacáňiová и съавт. тестват етанолни и метанолни екстракти на полен от територията на Словакия срещу грам (+) и грам (-) бактерии. *Listeria monocytogenes* CC M 4699, *Pseudomonas aeruginosa* CC M 1960, *Staphylococcus aureus* CC M 3953, *Salmonella enterica* CC M 4420 са най-чувствителни по отношение на 70% метанолен екстракт на полен, докато *Escherichia coli* CC M 3988 - 96% етанолен екстракт. *Candida krusei* е чувствителна към 70% метанолен и 96% етанолен екстракт. 70% метанолен екстракт инхибира растежа на дрождите - *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, а 70% етанолен - *Geotrichum candidum* и *Rhodotorula mucilaginosa*. Плесените *Aspergillus fumigatus* и *Aspergillus niger* се повлияват спрямо 70% етанолен поленов екстракт, а *Aspergillus flavus* - 70% метанолен [21].

Приложения на пчелния прашец в хранителни продукти

Млечни храни Пчелният прашец е богат източник на биологично-активни съединения, а това предопределя използването му като функционална диетична храна [26]. Karabagias и съавт. разработват нови биофункционални храни с тенденция да се превърнат в алтернативни варианти за лечение на хронични заболявания. Екипът от учени разработва кисели млека от краве, козе и овче мляко с добавен пчелен прашец с различни концентрации. *In vitro* антиоксидантният капацитет и общото съдържание на полифеноли са значително увеличени в сравнение с конвенционалните кисели млека. Вкусът, мирисът и външният вид на тези продукти са значително подобрени и много добре се възприемат от потребителя [27]. Fuenmayor и съавт. получават пробиотични продукти с внесен пчелен прашец [29].

Включване полена в покрития Skowron и съавт. изследват покрития с включени в състава им прополис и комбинация прополис с пчелен прашец върху развитието на *L. Monocytogenes*. Включването на пчелните продукти подобрява антилистериалната активност [28].

Тестени изделия Krystyjan и съавт. получават бисквити с добавен прашец до 5%, тъй като това количество е оптимално и не повлиява допълнително органолептичната характеристика на крайния продукт. Функционалните бисквити се отличават с повишено съдържание на захари, белтъци, пепел и фибри в сравнение с контролата. Вложеният прашец не оказва влияние върху количеството на липидите. Вероятна причина за това е, че пчелният прашец има положително въздействие, предпазвайки от липидно окисление. Бисквитите с полен съдържат от 2 до 4 пъти повече полифеноли в сравнение с контролата, а оттам и по-висока антиоксидантна активност [30]. Conte и съавт. обогатяват безглутенов хляб с 3% пчелен прашец и подобряват неговата сензорна характеристика и възприемчивост от потребителя [31]. Те установяват, че безглутеновият хляб с добавен прашец има по-голямо количество белтък, пепел, макроеlementи като К и Са, полифеноли и каротеноиди [32].

Месни продукти Прашец е добавен и в кюфтета и е установено, че той инхибира липидното окисление [33]. Същият научен екип

се опитват да контролират липидното окисление на късчета месо при съхранението им при замръзване [34]. Almeida и съавт. прилагат прашеца при съхранение на колбаси от свинско месо [35]. Използван е също и при приготвянето на черен пудинг за възпрепятстване на липидното окисление [36]. Черният пудинг е различен регионален тип кренвирши с произход от Обединеното кралство и Ирландия. Приготвя се от свинска кръв, със свинска мазнина или говеждо месо и зърнени храни, обикновено овесени ядки, овесени ядки или ечемичени [37]. Пчелният прашец може да се характеризира като функционален храна с различни подобряващи ефекти върху човешкото здраве поради неговите хранителни свойства [38].

Приложения на пчелния прашец в апитерапията

Апитерапията е клон на алтернативната медицина, използващ пчелни продукти като мед, пчелен прашец, пчелно млечице, прополис, восък, пчелна отрова [39]. Пчелният прашец се използва в апитерапията, тъй като той притежава противовъзбична, антимикробна, антивирусна, противовъзпалителна, и имуностимулираща активност [40]. Пчелният прашец притежава широк спектър от терапевтични свойства, като: антимикробен, антиоксидантен, хепатопротективен, химиопротективен и антиканцерогенни, антиатеросклеротични, противовъзпалителни, антиалергични и имуномодулиращи дейности [41]. Пчелните продукти са включени в медицинската практика, където фокусът на вниманието е профилактиката на заболяванията [42].

Trumbeckaite и съавт. са направили проучване сред студенти бакалаври по фармация в Литва как се възприема апитерапията при лечението и превенцията на различни болести. Положително се възприема, че пчелният прашец стимулира имунната система и може да се употребява като профилактика срещу следните заболявания: инфекции на дихателните пътища, сърдечно-съдови заболявания, рак, нарушения на ендокринната система, стареене на кожата, анемия, повишаване на плодовитостта при мъжете / жените и повишаване на умствената дейност. Изследванията сред мнението на студентите относно познаването и използването на пчелен прашец за лечение показва, че за инфекции на дихателните пътища, 19.1 % използват пчелния пра-

шец като основна терапия (ОТ), а 54.4 % като допълнителна терапия (ДТ); кожни заболявания - 13.2 % (ОТ) и 33.9 % (ДТ). При стомашно-чревни нарушения, артрит, туберкулоза, онкология, анемия, херпес, гинекологични възпаления, доброкачествена хиперплазия на простатата и офталмологични нарушения употребата на прашеца е като допълнение към основното лечение [43].

Huda и съавт. показват потенциала в приложението на пчелния прашец в съвременната клинична практика при профилактична и / или адювантна терапия при лечението на разстройства от аутистичния спектър [44]. Akkol и съавт. в своето изследване установяват, че „медния пчелен прашец“ (смес от мед и пчелен прашец) има благоприятни ефекти срещу възпалителни, имунни и инфекциозни заболявания [45].

Поради установената мощна противовъзбична, антимикробна, антивирусна, противовъзпалителна и имуностимулираща активност на пчелния прашец, той намира терапевтично приложение при лечение на редица кожни заболявания като дерматофитоза, изгаряния, атопичен дерматит и акне [46].

Приложения на пчелния прашец в козметиката

Съществуват редица изследвания, които са изследвали механизмите на благотворното влияние на компонентите на пчелния прашец върху човешката кожа като аминокиселини, белтъци, въглехидрати, полиненаситени мастни киселини, витамини, гликолипиди, полифеноли. Те ефективно подобряват защитните механизми срещу стареенето и сухотата на кожата, дезактивират UV-B лъчението, намаляват окислителното увреждане и процеса на образуване на цветния пигмент меланин, а това предполага и големия потенциал на прашеца в приложението му в различни козметични продукти [47]. Kim и съавт. проучват възможността за прилагане на пчелния прашец в козметичната терапия за намаляване на оксидативния стрес и хиперпигментацията като оценяват инхибирането на тирозиназата и антиоксидантната активност, които корелират със съдържанието на общите полифеноли [48]. В козметичните продукти обикновено пчелният прашец се влага под формата на водни или липидни екстракти (пропилен гликол, глицерин и масла), както и като лиофилизат, като концентрацията му е 0,5–5% [46].

Алергични ефекти

Въпреки че пчелният прашец притежава много полезни свойства и намира приложение в различни области на живота, някои хора се оказват чувствителни при консумацията му и проявяват алергични реакции. Поленът се смята за алерген и е кръстосано реактивен с много алергени [49].

Choi и съавт. описват алергична реакция на пациенти със сезонен ринит с чувствителност към полените от цариче, амброзия, хризантема и глухарче. Доказано е, че екстрактите от пчелен прашец имат силна кръстосана реактивност с представителите на семейство Сложноцветни. Хора с алергии или с предразположение към такива трябва да са изключително внимателни по отношение на консумацията на пчелен прашец [50]. Чести наблюдавани алергични реакции са подуване на гърлото, устните, задух, затруднено преглъщане, чувство на слабост [49]. При естествените продукти, какъвто е и пчелният прашец, е трудно да се преценят оптималните дози, които са ефективни и безопасни. Това произхожда от факта, че съставът на такива продукти може да варира в зависимост от географското положение, флората и климатичните условия. От голямо значение е и как пчелата събира, съхранява и обработва цветния прашец. Въз основа на всичко това може да се заключи, че продукти от различни региони са разнообразни по състав и не могат да бъдат сравнени по отношение на техните ефекти. Поради това е много сложно да бъдат стандартизирани такива продукти. Препоръчителният прием на пчелен полен за възрастни над 18 години е 1/8 до 1/4 чаена лъжичка на ден. Дозировката може постепенно да се увеличи до 1-2 чаени лъжички веднъж до три пъти на ден. За деца под 18 години няма достатъчно информация [51].

Заключение

Пчелният прашец е ценен природен продукт, който се използва от пчелите и хората. Съдържа пълноценни макро- и микронутриенти, които му придават изключителни хранителни стойности.

Въз основа на направената справка в литературата от последните години се наблюдава интерес към пчелния полен, изразен като най-разнообразни възможности за приложението му. Освен че допринася за повишаване на

здравословния ефект на храната, в която е внесен, положително влияние има и върху нейните органолептични характеристики и възприемчивост от потребителя. В човешкия живот поленът намира приложение не само като хранителна добавка, а и в области като козметична и фармацевтична промишленост, както и в алтернативната медицина.

Литература

- [1] Kocot, J., M. Kielczykowska, D. Luchowska-Kocot, et al. 2018. Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. *Hindawi, Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, s. 1-29.
- [2] Rogala, R., B. Szymas. 2004. Nutritional value for bees of pollen substitute enriched with synthetic amino acids. Part I. *Chemical methods. J Apic Sci.*, № 48(1): s. 19-27.
- [3] Szczesna, T., 2006. Protein content and amino acid composition of bee-collected pollen from selected botanical origins. *J Apic Sci.*, № 50(2), s. 81-90.
- [4] Brodschneider, R., K. Crailsheim. 2010. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, № 41, 278-294.
- [5] Nogueira, A., X. Féas, L. Estevinho. 2012. Commercial bee pollen with different geographical origins: a comprehensive approach. *International Journal of Molecular Sciences*, vol 13, № 9, s. 11173-11187.
- [6] Guiné, R. 2015. Bee Pollen: Chemical Composition and Potential Beneficial Effects on Health. *Current Nutrition & Food Science*, № 11(4), s. 301-308.
- [7] Komosinska-Vassev, K., P. Olczyk, J. Kafmierzak L. et al. 2015. Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application, Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. *Complementary and Alternative Medicine*, s. 1-7.
- [8] Yang, K., D. Wu, X. Ye, et al. 2013. Characterization of Chemical Composition of Bee Pollen in China. *Agric. Food Chem.*, № 61(3), s. 708-718.
- [9] Almeida-Muradian, L., L. Pamplona, S. Coimbrã et al. 2005. Journal of Food Composition and Analysis № 18, s. 105-111.
- [10] Sameer K., A. Rathore, S. Lohidasan et al. 2014. Investigation of the nutraceutical potential of monofloral Indian mustard bee pollen. *J Integr Med.*, № 12(4), s. 379-389.

- [11] Xesús F., M. Vázquez-Tato, L. Estevinho et al. 2012. Organic Bee Pollen: Botanical Origin, Nutritional Value, Bioactive Compounds, Antioxidant Activity and Microbiological Quality, *Molecules*, № 17, s. 8359-8377.
- [12] Conte G., G. Benellia, A. Serra et al. 2017. Journal of Food Composition and Analysis № 55 s. 12–19.
- [13] Mărgăoan R., M. Stranț, A. Varadi et al. 2019. Bee Collected Pollen and Bee Bread: Bioactive Constituents and Health Benefits. *Antioxidants*, № 8(12), s. 568.
- [14] Farag, S., T. El-Rayes. 2016. Effect of Bee-pollen Supplementation on Performance, Carcass Traits and Blood Parameters of Broiler Chickens. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, № 11, s. 168–177.].
- [15] Soares de Arruda, V., A. Santos Pereira, A. Silva de Freitas et al. 2013. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, № 29, s. 100–105.
- [16] Pereira de Melo, I., L. Bicudo de Almeida-Muradian. 2010. Stability of antioxidants vitamins in bee pollen samples, *Quim. Nova*, Vol. 33, № 3, s. 514-518.
- [17] Fatrcová-Šramková K., J. Nôžková, M. Kačániová et al. 2013. Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, № 48, s. 133–138.
- [18] Karadal F., N. Onmaz, S. Abay et al. 2018. A Study of Antibacterial and Antioxidant Activities of Bee Products: Propolis, Pollen and Honey Samples. *Ethiop. J. Health Dev.* № 32(2), s. 116-122.
- [19] Mărgăoan R., L. Mărghițaș, D. Dezmirean et al. 2015. Antimicrobial Activity of Bee Pollen Ethanolic and Methanolic Extracts on Staphylococcus aureus Bacterial Strain. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies* № 72(1)
- [20] Borycka K., D. Grabek-Lejko, I. Kasprzyk. 2015. Antioxidant and antibacterial properties of commercial bee pollen products. *Journal of Apicultural Research*, № 54 (5) , s. 491-502.
- [21] Kačániová M., N. Vuković, R. Chlebo et al. 2012. The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from slovakia, *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, № 64 (3), s. 927-934.
- [22] Pascoal A., S. Rodrigues, A. Teixeira et al. 2014. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*, № 63, s. 233–239).
- [23] Leja M., A. Mareczek, G. Wyzgolik et al. 2007. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*, № 100, s. 237–240.
- [24] LeBlanc, B., O. Davis, S. Boue et al. 2009. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chemistry*, № 115, s. 1299–1305.
- [25] Saral, Ö., M. Kiliçarslan, H. Şahin et al. 2019. Evaluation of antioxidant activity of bee products of different bee races in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, № 43, s. 441-447.
- [26] Yildiz, O., Z. Can, O. Saral, et al. 2013. Hepatoprotective potential of chestnut bee pollen on carbon tetrachloride-induced hepatic damages in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 461478, 1–9. doi:10.1155/2013/461478).
- [27] Karabagias, I., V. Karabagias, I. Gatzias et al. 2018. Bio-Functional Properties of Bee Pollen: The Case of “Bee Pollen Yoghurt. *Coatings*, № 8, s. 42)
- [28] Skowron, K., J. Nska-Piróg, K. Grudlewska et al. 2019 Antilisterial Activity of Polypropylene Film Coated with Chitosan with Propolis and/or Bee Pollen in Food Models. *BioMed Research International*, s. 1-12.
- [29] Vamanu, E., A. Vamanu, O.Popa et al. 2010. The antioxidant effect of a functional product based on probiotic biomass, pollen and honey. *Sci. Pap. Anim. Sci. Biotechnol.*, № 43, s. 331–336.
- [30] Krystyjan, M., D. Gumul, R. Ziobro et al. 2015. The fortification of biscuits with bee pollen and its effect on physicochemical and antioxidant properties in biscuits. *LWT - Food Science and Technology*, № 63, s. 640-646.
- [31] Conte, P., A. Del Caro, F. Balestra et al. 2018. Bee pollen as a functional ingredient in gluten-free bread: A physical-chemical, technological and sensory approach. *LWT Food Sci. Technol.*, № 90, s.1–7.
- [32] Conte, P., A. Del Caro, P. Urgeghe et al. 2020. Nutritional and aroma improvement of gluten-free bread: Is bee pollen effective? *LWT Food Sci. Technol.*, № 118, s. 108711.
- [33] Turhan, S., F. Yazici, F. Saricaoglu et al. 2014. Evaluation of the nutritional and storage quality of meatballs formulated with bee pollen. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.*, № 34, s. 423–433.
- [34] Turhan, S., F. Saricaoglu, M. Mortas et al. 2017. Evaluation of color, lipid oxidation and microbial quality in meatballs formulated with

bee pollen during frozen storage. *J. Food Process. Preserv.*, № 41, s.12916.

[35] Almeida, J., A. Reis, L. Heldt et al. 2017. Lyophilized bee pollen extract: A natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in refrigerated sausages. *LWT Food Sci. Technol.*, № 76, s. 299–305.

[36] Anjos, O. 2019. Bee pollen as a natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in black pudding. *LWT Food Sci. Technol.*, № 111, s. 869–875

[37] Jaime, T., A. Davidson. 2006. The Oxford companion to food. *OUP*, p.104

[38] Bogdanov, S. 2004. Quality and standards of pollen and beeswax. *Apiacta*, № 38, s. 334–341.

[39] Pascoal A., S. Rodrigues, A. Teixeira et al. 2014. Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 63, s. 233–239.

[40] Meyer-Rochow, V. 2017. Therapeutic arthropods and other, largely terrestrial, folk-medicinally important invertebrates: a comparative survey and review. *J Ethnobiol Ethnomed.*, 13: 9.

[41] WHO. 2013. *Traditional Medicine Strategy: 2014–2023*, WHO, Geneva, Switzerland.

[42] Nascimento, A., G. Luz Jr. 2018. Bee pollen properties: uses and potential pharmacological applications-a review. *J Anal Pharm Res.*, № 7(5), s. 513–515.

[43] Trumbeckaite, S., J. Dauksiene, J. Bernatoniene et al. 2015. Knowledge, Attitudes, and Usage of Apitherapy for Disease Prevention and Treatment among Undergraduate Pharmacy Students in Lithuania. *Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, s. 1-9.

[44] Al-Salem, H., H. Al-Yousef, A. Ashour et al. 2020. Antioxidant and hepatorenal protective effects of bee pollen fractions against propionic acid-induced autistic feature in rats. *Food Sci Nutr.*, № 8, s. 5114–5127.

[45] Akkol, E., D. Orhan, I. Gürbüz et al. 2010. In vivo activity assessment of a “honey-bee pollen mix” formulation. *Pharmaceutical Biology*, № 48(3), s. 253–259.

[46] Kurek-Górecka, A., M. Górecki, A. Rzepecka-Stojko et al. 2020. Bee Products in Dermatology and Skin Care. *Molecules*, № 25, s. 556.

[47] Xi, X., J. Li, S. Guo et al. 2018. The Potential of Using Bee Pollen in Cosmetics: a Review. *Journal of Oleo Science*

[48] Kim, S., Y. Jo, Q. Liu et al. 2015. Optimization of Extraction Condition of Bee Pollen Using Response Surface Methodology: Correlation between Anti-Melanogenesis, Antioxidant Activity, and Phenolic Content. *Molecules*, № 20, s. 19764–19774

[49] Zarobkiewicz, M., M. Woźniakowski, M. Sławiński et al. 2017. Bee pollen in allergy and immunology. Short review. *Herba Pol*, № 63(1), s. 88-94.

[50] Choi, J.-H., Y.-S. Jang, J.-W. Oh et al. Bee Pollen-Induced Anaphylaxis: A Case Report and Literature Review. *Allergy Asthma Immunol Res.* № 7(5), s. 513-517.

[51] Ulbricht, C., J. Conquer, N. Giese et al. 2009. An Evidence-Based Systematic Review of Bee Pollen by the Natural Standard Research Collaboration, *JOURNAL OF DIETARY SUPPLEMENTS*, Vol. 6(3).

гл. ас. д-р Марияна Топузова

Университет по хранителни технологии

Катедра: Органична химия и неорганична химия

Адрес: гр. Пловдив, бул. „Марица“ 26, 4002

e-mail: marianagt@mail.bg

гл. ас. д-р Мина Тодорова

Университет по хранителни технологии

Катедра: Органична химия и неорганична химия

Адрес: гр. Пловдив, бул. „Марица“ 26, 4002

e-mail: mm_todorova@abv.bg

доц. д-р Надежда Петкова

Университет по хранителни технологии

Катедра: Органична химия и неорганична химия

Адрес: гр. Пловдив, бул. „Марица“ 26, 4002

e-mail: petkovanadejda@abv.bg

доц. д-р Иван Иванов

Университет по хранителни технологии

Катедра: Органична химия и неорганична химия

Адрес: гр. Пловдив, бул. „Марица“ 26, 4002

e-mail: ivanov_ivan.1979@yahoo.com



ИНДУСТРИАЛНИ ТЕХНОЛОГИИ

Технически редактор
Иван Димитров

Художник на корицата
Красимир Николов

Издателство
Университет „Проф. д-р Асен Златаров”
Формат – 206 / 290

INDUSTRIAL TECHNOLOGIES

Technical Editor
Ivan Dimitrov

Cover Design
Krasimir Nikolov

House Press
Prof. Dr Assen Zlatarov University
Format – 206 / 290