

АКВАКУЛЬТУРА

УДК 582.272.46–119:577.15

А.М. Рогов*

Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр,
690091, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФЕРМЕНТАЦИИ
САХАРИНЫ ЯПОНСКОЙ НА ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ
КОМБИКОРМОВ ДЛЯ МОЛОДИ ТРЕПАНГА**

Исследовали гидролиз сахарины японской комплексными ферментными препаратами: целлюлюкс F, оллзайм BG, оллзайм PT, оллзайм Вегпро при температуре 55 °С и рН 6 и вискофлю MG при 60 °С. Под действием ферментных препаратов в сахарине снижается содержание высокомолекулярных полисахаридов и увеличивается количество легкогидролизуемых углеводов. Использование водорослей после ферментации в составе комбикормов повышает их биологическую ценность за счет изменения соотношения легкогидролизуемых и высокомолекулярных полисахаридов. Ферментированная сахарина в составе комбикормов увеличивает прирост молоди трепанга по сравнению с комбикормом с натуральной сахариной.

Ключевые слова: сахарина японская, ферментация, химический состав, корм, молодь трепанга.

DOI: 10.26428/1606-9919-2017-190-196-203.

Rogov A.M. Study on influence of *Saccharina japonica* fermentation on chemical composition of mixed fodder for sea cucumber juveniles // *Izv. TINRO*. — 2017. — Vol. 190. — P. 196–203.

Enzymatic processing of laminaria *Saccharina japonica* by industrial enzymes of proteolytic, mixed and amylolytic (cellulosolytic) action (CelloLux-F, Viscoflu MG, Allzyme PT, Allzyme Vegpro, and Allzyme BG) is investigated. Alginase activity of enzyme preparations was measured by spectrophotometry with an anthrone reagent. Chemical composition of algae and fodder was determined by standard research methods. Total content of nitrogenous substances in the raw materials was determined by Kjeldahl method on the Kjeltex auto 10 SO Analyzer (Tecator, Japan). Alginic acid content was determined by titration method. Total lipid content was determined by Blight-Dayer method. The content of easily hydrolysable polysaccharides was determined by titration according to Bertrand. In the experiment, CelloLux-F had the highest alginase activity and Allzyme PT had the lowest activity. Activity of other enzymes lowered in the order: Viscoflu MG > Allzyme BG > Allzyme Vegpro. The alginase activity of enzyme preparations determines their concentrations necessary for hydrolysis. Following to recommendations of the enzyme preparations manufacturers and cited information on their usage, the raw alga materials was processed during 6 hours under pH 6, gm 1 : 10–1 : 12 and temperature 55 °C and 60 °C. Under the processing, the main changes occur in quantitative composition of carbohydrates, namely the alginic acid content is reduced in 17.2–25.3 %, the fiber content is reduced in 38.5–74.0 % and the amount of easily hydrolyzable carbohydrates is increased in 2.7–3.7 times. Degree of the polysaccharides hydrolysis after processing with different enzyme preparations has lowered in the order: Allzyme BG (36.9 %) > CelloLux-F

* Рогов Александр Максимович, младший научный сотрудник, аспирант, e-mail: aleksandr.rogov@tinro-center.ru.

Rogov Alexander M., junior researcher, post-graduate student, e-mail: aleksandr.rogov@tinro-center.ru.

(35.5 %) > Allzyme Vegpro (34.6 %) > Viscoflu MG. The fermented algae were introduced into the mixed fodder formula. Using the processed alga instead of natural one allows to increase the content of easily hydrolyzable polysaccharides and to decrease the content of high-molecular polysaccharides as alginic acid and cellulose. Food efficiency of the mixed fodder was examined by biological testing with using pigmented sea cucumber juveniles with weigh 40–90 mg as the test-objects; the testing was conducted on the basis of aquaculture research complex Zapovednoe in the Kievka Bay (northwestern Japan Sea). The mixed fodder with natural laminaria from the Kiyevka Bay was used as a control in examination. Value of the mixed fodder was estimated by gain in body weight of test-objects. The tests showed the 3–5 times higher gains of the sea cucumber juveniles fed by the mixed fodder with fermented laminaria in compare with the control mixed fodder based on unprocessed algae.

Key words: *Saccharina japonica*, fermentation, chemical composition, mixed fodder, sea cucumber juvenile.

Введение

Морские водоросли являются источником пищи почти для всех водных организмов, включая рыбу, беспозвоночных и моллюсков. Для решения проблемы обеспечения районов Дальнего Востока комбикормами для молоди трепанга необходимо использовать водоросли, имеющие промышленные запасы в Приморье, на Сахалине и Курильских островах. С этой точки зрения большой интерес в качестве основы для комбикорма имеет *Saccharina japonica* (McHugh, 2003; Титлянов, Титлянова, 2012; Uchida, Miyoshi, 2013; Wang et al., 2015). Однако натуральная *S. japonica* в корме для трепанга проигрывает в сравнении с саргассумом, цистозирой и анфельцией по усвояемости (Кадникова и др., 2015). В составе сахарины высокое содержание высокомолекулярных полисахаридов. Их усвоение молодыми организмами затруднено из-за отсутствия в пищеварительной системе ферментов, способных расщеплять эти полисахариды. Для гидролиза полисахаридов возможно применение физико-химических и ферментных способов обработки растительного сырья (Michel et al., 1996; Ермакова и др., 2001; Gupta et al., 2010; Hwang et al., 2011; Tan, Lee, 2014).

В рыбной промышленности широко используются физико-химические способы обработки водорослей для получения пищевой, технической и кормовой продукции. Ферментативная обработка водорослевого сырья находится на стадии изучения и проведения экспериментальных работ. Специфичные ферментные комплексы, в состав которых входят целлюлазы, альгинат-лиазы, фукоидаиназы и другие гидролазы, не производятся. Вопросам выделения и изучения специфичности ферментов, их свойств по отношению к полисахаридам бурых водорослей посвящены многочисленные труды отечественных и зарубежных ученых (Бакунина и др., 2000; Алексеева и др., 2009; Felix, Pradeepa, 2012; Gupta et al., 2012; Рассказов, 2014; Сильченко, 2014; Новикова и др., 2015).

В настоящее время ведется поиск ферментов для расщепления белково-полисахаридного комплекса морских водорослей. Одним из простых вариантов в этом случае является возможность подбора готовых промышленных форм ферментных комплексов, используемых при производстве кормовой продукции из наземного растительного сырья.

Цель настоящей работы — показать влияние ферментации сахарины японской на химический состав комбикорма и прирост молоди трепанга.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили: сахарина японская *S. japonica* сушеная, 5 промышленных форм ферментных препаратов, ферментированная сахарина и корма на ее основе.

На основании данных о химическом составе сахарины, соотношении белков и полисахаридов, литературных данных о составе и свойствах ферментов было принято решение использовать ферменты класса гидролазы: протеолитического, смешанного и амилитического (целлюлозолитического) действия (Ермакова и др., 2001; Усов и др., 2001; Аминина и др., 2007; Алексеева и др., 2009; Боголицын и др., 2012; Felix, Pradeepa, 2012; Рассказов, 2014; Сильченко, 2014; Перцева, 2015).

Ферментативную обработку водорослей проводили с использованием промышленных форм ферментов — целлолюкс F, вискофло MG, оллзайм PT, оллзайм Вегпро, оллзайм BG.

Вискофло MG содержит термостабильную β -глюканазу, ксиланазу, арабиноксиланазу, пентозаназу, целлюлазу, арабиназу, гемицеллюлазу и α -амилазу. Применяется при температуре 55–70 °С, pH 5,0–7,0, проявляет максимальную активность при pH 5,7.

Целлолюкс F — комплексный препарат, основными ферментами которого являются ксиланаза, β -глюканаза и целлюлаза. Рабочий диапазон препарата — pH 4,5–7,0; 50–70 °С, а оптимум действия препарата — pH 4,7; 60 °С.

Входящая в состав оллзайма PT ксиланаза расщепляет некрахмальные полисахариды класса ксиланов. Рабочий диапазон pH 4,5–7,1, при температурной обработке до 80 °С сохраняет заявленную активность. Оптимальные условия действия: pH 4,7; температура 40 °С.

Оллзайм Вегпро содержит протеазу и целлюлазу, рабочий диапазон pH составляет 4,5–7,1 при температуре до 80 °С. Оптимальные условия действия: pH 4,7; температура 40 °С.

Оллзайм BG содержит ферментативный экстракт, в состав которого входит в основном β -глюканаза, расщепляющая полисахариды класса глюканов в кормах. Рабочий диапазон pH составляет 4,5–7,1, при температуре до 80 °С сохраняет заявленную активность. Оптимальные условия действия препарата: pH 4,7; температура 40 °С.

Альгиназную активность ферментных препаратов исследовали методом спектрофотометрии с антроновым реактивом (Рухлядева, Польшгалина, 1981).

При выполнении исследований по химическому составу водорослей и кормов использовали стандартные методы исследований (ГОСТ 26185-84).

Общее содержание азотистых веществ в сырье определяли по методу Кьельдаля на приборе «Kjeltec auto» 10 SO Analyzer (Tecator, Япония).

Содержание альгиновой кислоты определяли титрометрическим методом согласно методическим рекомендациям (Методы..., 1991).

Общее содержание липидов определяли по методу Блайя-Дайера (Blight, Dayer, 1959).

Содержание легкогидролизуемых полисахаридов определяли титрованием по Бертрану (Бурштейн, 1963).

Для оценки эффективности расщепления полисахаридов была определена степень гидролиза по формуле

$$\alpha = \left(\frac{C_{\text{гидр}}}{C_{\text{общ}}} \right) \cdot 100\%,$$

где $C_{\text{гидр}}$ — количество гидролизованных полисахаридов, %; $C_{\text{общ}}$ — общее количество полисахаридов, %.

При проведении биологических испытаний комбикормов в качестве объектов исследований использовали пигментированную молодь трепанга массой от 40 до 90 мг. Эксперименты проходили с 18 сентября по 6 октября 2016 г. в цехе по воспроизводству трепанга на базе НПЦМ «Заповедное» (бухта Киевка).

При выборе концентрации промышленных форм препаратов для ферментации полисахаридных комплексов сахарины определяли их альгиназную активность колориметрическим методом по количеству образовавшихся восстанавливающих сахаров.

В качестве субстрата использовали 0,1 %-ный раствор альгината натрия. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализировало образование 1 мкмоль восстанавливающих сахаров (в пересчете на галактуроновою кислоту) за 1 ч.

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований установлена зависимость альгиназной активности от вида используемого ферментного комплекса (рис. 1). Наибольшей активностью (598,1 ед./мл) обладает препарат целлолюкс F, а наиболее низкой — оллзайм PT (230,4 ед./мл). Активность препарата оллзайм BG (413,3 ед./мл) выше, чем у оллзайм Вегпро (402,3 ед./мл), но ниже активности ферментного препарата вискофло MG (444,2 ед./мл).

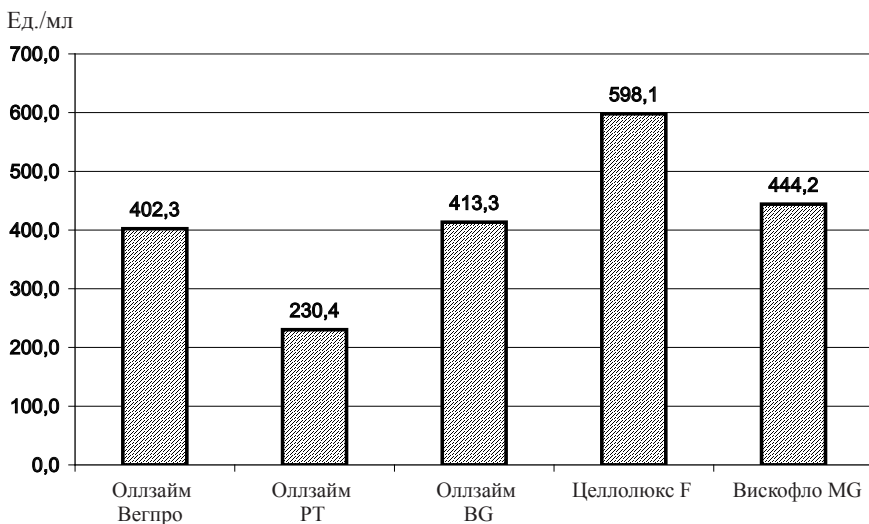


Рис. 1. Альгиназная активность комплексных ферментных препаратов, ед./мл
 Fig. 1. Alginase activity of complex enzyme preparations, un./ml

При исследовании процесса ферментации сахарины данные по альгиназной активности промышленных форм ферментов послужили основой для расчета их концентраций при гидролизе.

Расчет количества ферментного препарата производился с учетом массы обрабатываемого субстрата, времени обработки (6 ч) и активности препарата. Количество вносимого препарата на 10 г водорослевого порошка составило: для оллзайма РТ — 0,1644 г, оллзайма Вегпро — 0,0941 г, оллзайма ВГ — 0,0917 г, вискофлю МГ — 0,0853 г и целлолюкса F — 0,0633 г.

Режимы обработки были подобраны в соответствии с рекомендациями производителей ферментных препаратов и анализом источников литературы, в которых имелась информация об их применении. Измельченная сахарина заливалась дистиллированной водой с pH 6, гидромодулем 1 : 10–1 : 12. Ферментация проводилась при температурах 55 и 60 °C в течение 6 ч. Общая схема ферментативной обработки сахарины представлена на рис. 2.

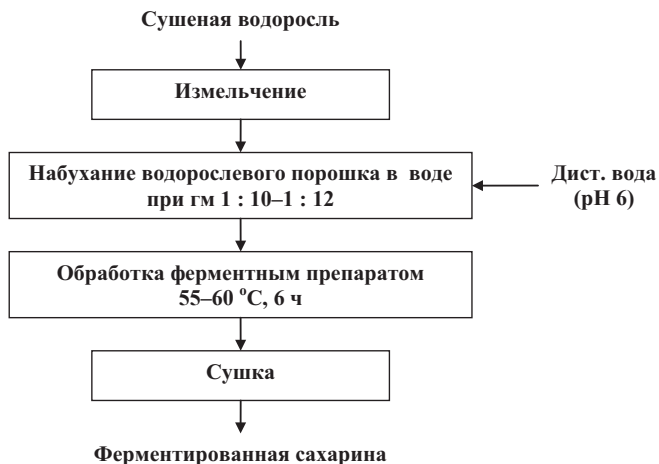


Рис. 2. Общая схема ферментативной обработки сахарины промышленными формами препаратов

Fig. 2. General scheme of *Saccharina japonica* enzymatic processing

Химический анализ образцов показал, что после обработки водорослей основные изменения происходят в количественном составе углеводов (рис. 3). При обработке сахарины целлолюксом F сильнее всего идет гидролиз клетчатки. При температуре 55 °C и pH 6 её содержание уменьшается до 5,9 %. В этих условиях одновременно с гидролизом клетчатки происходит деструкция альгиновой кислоты. Отмечается рост в 2,9 раза содержания ЛГП.

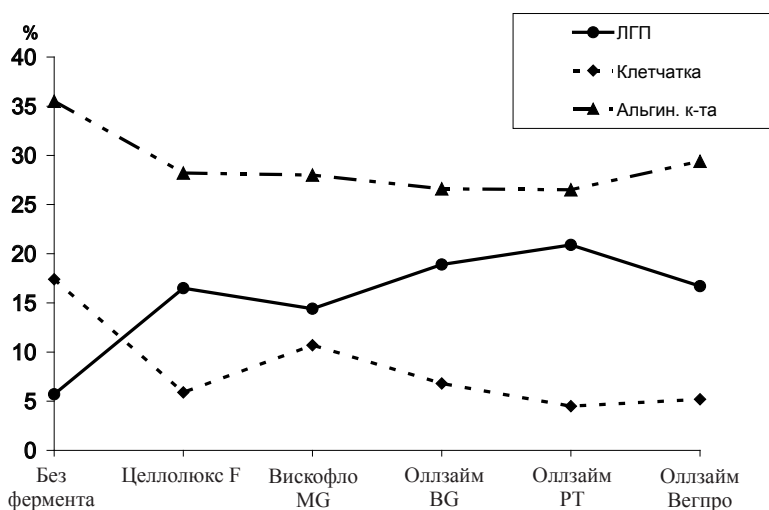


Рис. 3. Изменения содержания легкогидролизуемых полисахаридов (ЛГП), клетчатки, альгиновой кислоты в сахарине при гидролизе. Параметры гидролиза: вискофло MG — pH 6 и 60 °C; группа препаратов оллзайм и целлолюкс — pH 6 и 55 °C

Fig. 3. Changes of easily hydrolyzable polysaccharides (LGP) content, cellulose and alginic acid contents in *Saccharina japonica* during hydrolysis under pH 6, temperature 60 °C (with Viscoflor MG) or 55 °C (with allzymes and CelloLux-6)

При обработке сахарины препаратом вискофло MG при 60 °C содержание полисахаридов также снижается: клетчатки — до 10,7 %, альгиновой кислоты — до 28,0 %, количество ЛГП увеличивается до 13,2 % за счет перехода в эту категорию деструктурированных полисахаридов (рис. 3).

Препарат целлолюкс F более активно воздействует на клетчатку в сахарине по сравнению с препаратом вискофло MG, хотя эти препараты оказывают равное действие на альгиновую кислоту.

Обработка сахарины оллзаймом BG и оллзаймом PT при температуре 55 °C уменьшает содержание альгиновой кислоты до 26,6 % и в 3,9 раза количество клетчатки. Максимальное содержание ЛГП выявлено в образце, обработанном оллзаймом BG также при 55 °C (20,9 %). При обработке оллзаймом Вегпро содержание альгиновой кислоты снижается до 29,4 %, что выше, чем при обработке другими препаратами.

Максимальная степень гидролиза клетчатки и альгиновой кислоты выявлена при обработке препаратом оллзайм PT и составляет 41,4 % от исходного в сырье, минимальная — при обработке вискофло MG (26,8 %). Степень гидролиза при обработке препаратом оллзайм BG (36,9 %) выше, чем у целлолюкса F (35,5 %). Степень деструкции полисахаридов у оллзайма Вегпро (34,6 %) выше, чем у вискофло MG, но ниже ферментных препаратов оллзайм BG и целлолюкс F.

Полученные данные позволяют предположить, что использование обработанной промышленными формами ферментов сахарины в комбикормах для молоди трепанга будет более эффективно, чем натуральной водоросли.

Ферментированные водоросли вводили в ранее разработанную рецептуру производственного комбикорма (Кадникова и др., 2015). Было составлено 5 рецептов комбикормов, химический состав которых представлен в таблице.

Комбикорм на основе натуральной сахарины характеризуется высоким содержанием альгиновой кислоты (19,1 %) и клетчатки (18,0 %), а также низким содержанием ЛГП (3,8 %). Введение обработанных водорослей вместо натуральных в рецептуру комбикорма закономерно меняет его химический состав: увеличивается содержание легкогидролизуемых полисахаридов и снижается содержание высокомолекулярных полисахаридов — альгиновой кислоты и клетчатки.

Самое высокое содержание ЛГП наблюдается в комбикорме на основе сахарины, обработанной оллзаймом BG. При этом в комбикормах на основе сахарины,

Химический состав комбикормов на основе ферментированной сахарины
Chemical composition of mixed fodder based on fermented *Saccharina japonica*

Название препарата	Вода, %	Содержание, % сух. в-ва				
		Белок (Nx6,25)	ЛГП	Альгиновая кислота	Липиды	Клетчатка
Без фермента	10,8	17,8	3,8	19,1	3,0	18,0
Целлолюкс F	6,9	21,6	18,8	13,1	2,5	6,3
Вискофло MG	6,6	18,7	17,2	14,5	2,7	6,8
Оллзайм РТ	7,3	20,6	17,1	12,4	2,6	6,4
Оллзайм ВG	6,9	19,3	20,0	12,5	2,6	6,7
Оллзайм Вегпро	6,6	20,0	17,8	14,2	2,5	6,2

ферментированной оллзаймом РТ и ВG, меньше всего содержится альгиновой кислоты (12,4–12,5 %). Содержание клетчатки в комбикормах на основе обработанных водорослей мало различается при применении разных видов ферментов.

Полученные комбикорма были переданы на биологические испытания для оценки кормовой эффективности. Контролем служил продукционный комбикорм на основе натуральной сахарины. Эффективность комбикорма оценивали по приросту массы тела особей.

Испытания показали, что прирост молоди трепанга при питании комбикормом на основе ферментированной сахарины выше, чем при питании комбикормом на основе необработанной сахарины, в среднем в 3–5 раз (рис. 4). В зависимости от вида используемого фермента для обработки сахарины эффективность потребления комбикормов различна. Максимальный прирост массы тела трепанга наблюдается при кормлении комбикормом на основе сахарины, обработанной оллзаймом ВG, в среднем $73,3 \pm 5,3$ мг; достаточно высокий прирост дают комбикорма, полученные с применением вискофло MG ($64,3 \pm 10,3$ мг) и оллзайма РТ ($63,0 \pm 10,3$ мг); менее эффективен комбикорм при использовании фермента оллзайм Вегпро.

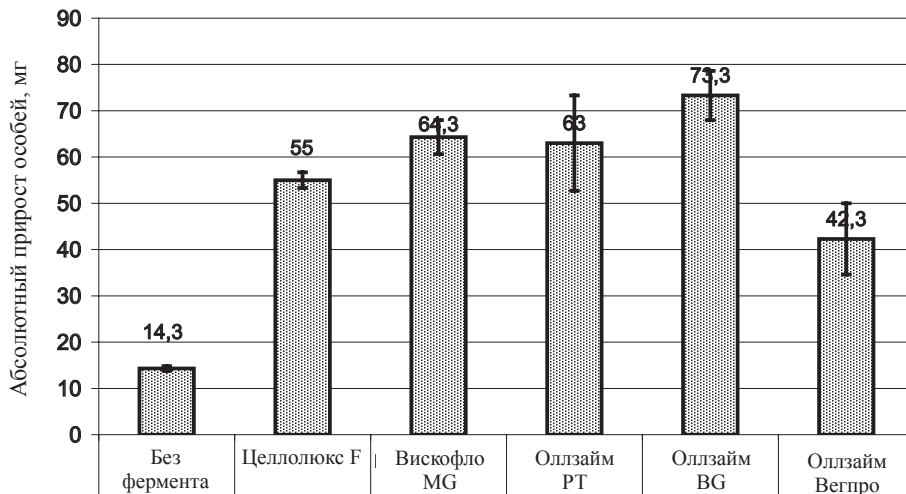


Рис. 4. Эффективность комбикормов на основе ферментированной сахарины
Fig. 4. Food efficiency of mixed fodder based on fermented *Saccharina japonica*

В любом случае комбикорма, приготовленные с применением сахарины после ее ферментации, становятся более пригодными для кормления молоди трепанга, чем с использованием натуральной сахарины.

Выводы

Исследовав процесс ферментации полисахаридного комплекса сахарины японской 5 промышленными формами препаратов. Установлено, что наиболее рациональными параметрами гидролитического расщепления являются: для целлолюкса F и препаратов

группы оллзайм — температура 55 °С при рН 6. Для обработки сахарины препаратом вискофло МГ рекомендована температура 60 °С при такой же рН. Обработка сахарины ферментным препаратом снижает содержание в ней альгиновой кислоты, клетчатки и увеличивает количество легкогидролизуемых углеводов, что в свою очередь меняет состав комбикормов. Прирост молоди трепанга при питании комбикормом на основе ферментированной сахарины выше, чем при питании комбикормом на основе необработанной сахарины. Максимальный эффект показал комбикорм с использованием сахарины, обработанной промышленным препаратом оллзайм ВГ.

Список литературы

- Алексеева З.Ю., Еникеев А.Х., Галынкин В.А. и др.** Полиферментативный гидролиз полисахаридов водорослей *Laminaria saccharina* // Изв. СПбГТИ (ТУ). — 2009. — № 6(32). — С. 50–53.
- Аминина Н.М., Вишневская Т.И., Гурулева О.Н., Ковкековдова Л.Т.** Состав и возможности использования бурых водорослей дальневосточных морей // Вестн. ДВО РАН. — 2007. — № 6. — С. 123–130.
- Бакунина И.Ю., Шевченко Л.С., Недашковская О.И. и др.** Поиск фукоидан-гидролаз среди морских микроорганизмов // Микробиология. — 2000. — Т. 69, № 3. — С. 370–376.
- Боголицын К.Г., Каплицин П.А., Ульяновский Н.В., Пронина О.А.** Комплексное исследование химического состава бурых водорослей Белого моря // Химия растительного сырья. — 2012. — № 4. — С. 153–160.
- Бурштейн А.И.** Методы исследования пищевых продуктов : моногр. — Киев : Госмедиздат УССР, 1963. — 644 с.
- Ермакова С.П., Бурцева Ю.В., Сова В.В. и др.** Белки бурых водорослей — ингибиторы эндо-1-3-β-D-глюканаз морских беспозвоночных // Биохимия. — 2001. — Т. 66, № 2. — С. 234–241.
- Кадникова И.А., Аминина Н.М., Мокрецова Н.Д., Рогов А.М.** Применение разных видов водорослей в составе кормов для молоди трепанга // Вестн. АГТУ. Сер. Рыб. хоз-во. — 2015. — № 4. — С. 62–68.
- Методы определения содержания альгиновой кислоты и соотношения в ней урновых кислот** : метод. рекомендации / Н.М. Аминина, А.В. Подкорытова. — Владивосток : ТИПРО, 1991. — 16 с.
- Новикова Ю.С., Анохина Е.П., Корнеева О.С.** Выбор источника фукоидана и оптимизация его ферментативного гидролиза // Вестн. ВГУИТ. — 2015. — № 2. — С. 224–228.
- Перцева А.Д.** Сравнительная характеристика активности ферментов тканей трепанга и кукумарии // Науч. тр. Дальрыбвтуза. — 2015. — Т. 34. — С. 135–138.
- Рассказов В.А.** Ферменты морских организмов и перспективы их использования в медицине и биотехнологии // Вестн. ДВО РАН. — 2014. — № 1. — С. 61–68.
- Рухляева А.П., Полюгалина Г.В.** Методы определения активности гидролитических ферментов : моногр. — М. : Лег. и пищ. пром-сть, 1981. — 288 с.
- Сильченко А.С.** Фукоиданазы и альгинат-лиазы морской бактерии *Formosa algae* КММ 3553Т и морского моллюска *Lambis* sp. : автореф. дис. ... канд. хим. наук. — Владивосток, 2014. — 24 с.
- Титлянов Э.А., Титлянова Т.В.** Морские растения стран Азиатско-Тихоокеанского региона, их использование и культивирование : моногр. — Владивосток : Дальнаука, 2012. — 377 с.
- Усов А.И., Смирнова Г.П., Клочкова Н.Г.** Полисахариды водорослей. Полисахаридный состав некоторых бурых водорослей Камчатки // Биоорган. химия. — 2001. — Т. 27, № 6. — С. 444–448.
- Blight E.G., Dayer W.J.** A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol. — 1959. — Vol. 37(8). — P. 911–917. DOI: 10.1139/o59-099.
- Felix S., Pradeepa P.** Lactic acid fermentation of seaweed (*Ulva reticulata*) for preparing marine single cell detritus (MSCD) // Tamilnadu J. Veterinary and Animal Sciences. — 2012. — Vol. 8(2). — P. 76–81.
- Gupta S., Abu-Ghannam N., Rajauria G.** Effect of heating and probiotic fermentation on the phytochemical content and antioxidant potential of edible Irish brown seaweeds // Botanica Marina. — 2012. — Vol. 55(5). — P. 527–537. DOI: 10.1515/bot-2011-0052.
- Gupta S., Abu-Ghannam N., Scannell A.G.M.** Growth and kinetics of *Lactobacillus plantarum* in the fermentation of edible Irish brown seaweeds // Food Bioprod. Process. — 2010. — Vol. 89, Iss. 4. — P. 346–355. DOI: 10.1016/j.fbp.2010.10.001.

Hwang H.J., Lee S.Y., Kim S.M., Lee S.B. Fermentation of seaweed sugars by *Lactobacillus* species and the potential of seaweed as a biomass feedstock // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. — 2011. — Vol. 16, Iss. 6. — P. 1231–1239. DOI: 10.1007/s12257-011-0278-1.

McHugh D.J. A guide to the seaweed industry : FAO Fish. Techn. Pap. — Roma, 2003. — № 441. — 105 p.

Michel C., Lahaye M., Bonnet C. et al. In vitro fermentation by human faecal bacteria of total and purified dietary fibres from brown seaweeds // *British Journal of Nutrition*. — 1996. — Vol. 75(2). — P. 263–280. DOI: 10.1079/BJN19960129.

Tan I.S., Lee K.T. Enzymatic hydrolysis and fermentation of seaweed solid wastes for bioethanol production: An optimization study // *Energy*. — 2014. — Vol. 78. — P. 53–62.

Uchida M., Miyoshi T. Algal Fermentation — The Seed for a New Fermentation Industry of Foods and Related Products // *Japan Agricultural Research Quarterly*. — 2013. — Vol. 47, № 1. — P. 53–63.

Wang X., Wang L., Che J. et al. Improving the quality of *Laminaria japonica* — based diet for *Apostichopus japonicus* through degradation of its algin content with *Bacillus amyloliquefaciens* WB1 // *Applied Microbiology and Biotechnology*. — 2015. — Vol. 99, № 14. — P. 5843–5853.

Поступила в редакцию 31.05.17 г.

Принята в печать 12.07.17 г.