

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392160** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.11.15

(51) Int. Cl. *C12N 1/14* (2006.01)
C09B 61/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.12.08

(54) **СПОСОБ ИЗГОТОВЛЕНИЯ КОМПОЗИЦИОННОГО ПИГМЕНТА НА ОСНОВЕ КРАСНОГО, ФИОЛЕТОВОГО, ОРАНЖЕВОГО И КОРИЧНЕВОГО КРАСИТЕЛЕЙ С АНТИОКСИДАНТНЫМ ДЕЙСТВИЕМ И ПОЛУЧЕННЫЙ КОМПОЗИЦИОННЫЙ ПИГМЕНТ**

(31) PV 2021-89

(32) 2021.02.28

(33) CZ

(86) PCT/CZ2021/000055

(87) WO 2022/179646 2022.09.01

(71) Заявитель:

ГЕСМЕД БАЙОТЕК С.Р.О.;
САРДАРЯН ГУРГЕН; САРДАРЯН
ГАРЕГИН (CZ)

(72) Изобретатель:

Сардарян Гурген, Сардарян Гарегин
(CZ)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Решение касается способа получения композиционного пигмента на основе красного, фиолетового, оранжевого и коричневого красителей с антиоксидантным действием из культивируемой биомассы штаммов микроорганизмов *Penicillium oxalicum* var. *Armeniasa* ССМ 8242 и ССМ 8374, в частности для пищевой, фармацевтической и косметической промышленности, характеризующегося исходной биомассой, содержащей по меньшей мере 10% мас./мас. смеси альфа- и бета-глюканов, 3% мас./мас. ниацина, 7% мас./мас. пантотеновой кислоты и 1,5% мас./мас. пиридоксина в сухом веществе. Полученный композиционный пигмент характеризуется типичными максимумами на спектрофотометрической диаграмме, полученной методом молекулярной абсорбционной спектрофотометрии в видимой области спектра в диапазоне длин волн от 400 до 800 нм, т.е. двумя максимумами в водном растворе со значениями рН 7-7,5, где первый максимум на Lambda max_1 соответствует $\lambda = 494$ нм и второй, самый высокий, максимум на Lambda max_2 соответствует $\lambda = 420$ нм, и двумя максимумами в спиртовом растворе, где первый максимум на Lambda max_1 соответствует $\lambda = 502$ нм и второй, самый высокий, максимум на Lambda max_2 соответствует $\lambda = 415$ нм.

A1

202392160

202392160

A1

СПОСОБ ИЗГОТОВЛЕНИЯ КОМПОЗИЦИОННОГО ПИГМЕНТА НА ОСНОВЕ
КРАСНОГО, ФИОЛЕТОВОГО, ОРАНЖЕВОГО И КОРИЧНЕВОГО КРАСИТЕЛЕЙ С
АНТИОКСИДАНТНЫМ ДЕЙСТВИЕМ И ПОЛУЧЕННЫЙ КОМПОЗИЦИОННЫЙ
ПИГМЕНТ

Область техники, к которой относится изобретение

Техническое решение касается способа изготовления композиционного пигмента на основе красного, фиолетового, оранжевого и коричневого красителей с антиоксидантным действием, и применяющегося, в частности, в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности.

Предшествующий уровень техники

В патенте Чехии № 285721 описан микроскопический гриб *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* CCM 8242, полученный из почвы долины под горой Арарат; патент № 302696 относится к микроскопическому грибу CCM 8374. Оба гриба продуцируют экзогенный красный пигмент, который можно применять в различных формах в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности.

Существующие на сегодняшний день способы применения вышеупомянутых штаммов грибов приводят к более низкому выходу пигмента и его нестабильному качеству, что является нежелательным.

Оба вышеупомянутых штамма хранились в Международном депозитарии Чешской коллекции микроорганизмов (CCM) университета Мазарик в Брно, Чешская Республика (ЧР).

Сущность изобретения

Отмеченные выше недостатки были устранены с помощью способа получения композиционного пигмента на основе красного, фиолетового, оранжевого и коричневого красителя с антиоксидантным действием после культивирования биомассы из штаммов микроорганизмов *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* CCM 8242 и CCM 8374, при этом суть решения состояла в исходной биомассе, содержащей по меньшей мере 10% масс./масс. смеси альфа- и бета-глюканов, 3% масс./масс. ниацина, 7% масс./масс. пантотеновой кислоты и 1,5% масс./масс. пиридоксина в сухом веществе.

В соответствии с изобретением композиционный пигмент на основе красного, фиолетового, оранжевого и коричневого красителей с антиоксидантным действием, полученный из биомассы штаммов микроорганизмов *Penicillium oxalicum* var. *Арменияка* CCM 8242 и CCM 8374, применяющийся, в частности, для пищевой, фармацевтической и косметической промышленности, также является предметом изобретения на основе

представления максимальных значений характеристики на спектрофотометрической диаграмме, полученной методом молекулярной абсорбционной спектрофотометрии в видимой части спектра в диапазоне длин волн от 400 нм до 800 нм – два максимума в водном растворе, pH 7-7,5, где первый максимум на λ_{max1} соответствует $\lambda = 494$ нм, и второй самый высокий максимум на λ_{max2} соответствует $\lambda = 420$ нм, и два максимума в спиртовом растворе, где первый максимум на λ_{max1} соответствует $\lambda = 502$ нм, и второй самый высокий максимум на λ_{max2} соответствует $\lambda = 415$ нм.

Биомасса из штаммов микроорганизмов *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* ССМ 8242 и ССМ 8374 для получения антиоксидантных композиционных пигментов в соответствии с изобретением также содержит глюканы в минимальном количестве, составляющем от 10% масс./масс.

Новые композиционные пигменты получают путем ферментации инокулята, из которого выделяют пигменты с антиоксидантным действием.

Композиционные пигменты в соответствии с изобретением применяют, в частности, в пищевой промышленности, например, в копченном мясе и в качестве пищевых добавок, а также в фармацевтической и косметической промышленности, где они стабилизируют и окрашивают продукты. Антиоксидантное действие этих пигментов значительно продлевает срок годности и срок службы всех продуктов, в которые их добавляют.

Композиционные пигменты в соответствии с изобретением и их получение обеспечивают конечный продукт с воспроизводимым стабильным составом. Пока это нельзя считать само собой разумеющимся. На сегодняшний день их получают путем повышенного насыщения ферментационной среды воздухом, обработки ферментационной среды дрожжевым экстрактом (например, NY YEST 412 Kerry) и регулирования размера пор микрофилтрационного оборудования. Путем модификации процесса ферментации, мы получаем биомассу мицелия, содержащую вещества, которые являются полезными для здоровья, так как она содержит по меньшей мере 10% глюкана; см. фиг. 2.

Пояснения к фигурам

Фиг. 1 представляет собой диаграмму спектрофотометрического определения состава конечного основного продукта (масс-спектрофотометрия) - красного пигмента. Следующие пигменты – фиолетовый, оранжевый и коричневый – определяют хроматографически.

Фиг. 2 представляет собой диаграмму, показывающую FTIR-спектр грибного глюкана и мицелия *Penicillium oxalicum* и *Pleurotus* (вешенка обыкновенная), где

сплошная линия представляет глюкозу, а фигурная линия представляет *Penicillium oxalicum*. Спектр образца лежит в пределах волновых чисел 4000-450 см⁻¹, разрешение 2 см⁻¹. Это сравнение спектра глюкозы грибов с глюкозами, содержащимися в биомассе *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca*.

На диаграмме на фиг. 3 показан спектр, полученный при анализе на масс-спектрофотометре образца, полученного в результате экспериментальной ферментации номер 2 (партия 2 натурального красного (NR)), выполненной в Институте микробиологии Академии наук ЧР, ЧР.

На диаграмме на фиг. 4 показан спектр, полученный при анализе на масс-спектрофотометре образца, полученного на опытно-промышленной установке в результате ферментации номер 125 (партия 125 натурального красного (NR)), выполненной в Научно-исследовательском институте пищевых продуктов Прага, ЧР.

Композиционные пигменты в соответствии с изобретением испытывали в работе в лабораториях Микробного института Академии наук ЧР с хорошими результатами.

Примеры осуществления изобретения

Пример 1

Получение композиционных пигментов в соответствии с изобретением осуществляли из биомассы, содержащей по меньшей мере 10% масс./масс. глюкозы, после ферментации микробиологических штаммов *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* ССМ 8242 и ССМ 8374 согласно базовой схеме получения:

- RO подготовка DEMI-воды для производства
- Парогенератор и подготовка горячего пара для стерилизации
- Воздушный компрессор для производства
- Оборудование для дезинфекции
- Система охлаждения
- Микробиологическая лаборатория, работа со штаммом и подготовка инокулята
- Биотехнологический ферментер – получение активного ингредиента
- Линия обработки продукта – центрифуга, MF, NF – выделение активного ингредиента
- Распылительная сушилка – сушка продукта на подходящем носителе.

Весь процесс ферментации происходит в стерильных условиях.

Получение начинают в микробиологической лаборатории, где штаммы микроскопических грибов *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* ССМ 8242 и ССМ 8374 активируют из лиофилизированного состояния. Их инокулируют в чашки Петри, а затем культивируют в термостате при температуре 28-29°C в течение 5 дней.

Критериями оценки мицелия являются:

- Однородная бархатистая поверхность мицелия
- Мицелий зеленого цвета
- обильное спорообразование
- цвет агара под мицелием темно-красный

Однородное вещество спор с мицелием соскребают лабораторной петлей с поверхности чашки Петри и стерильно переносят в колбу Эрлана Майера емкостью 500 мл. Инокулят культивируют в колбах на шейкере, вращающемся со скоростью 220-240 оборотов в минуту, в течение 36-48 часов.

Ферментационная среда для инокуляции содержит дрожжевой экстракт (например, NY YEST 412 Kerry) в количестве 6 г/л среды, свекловичный сахар - сахарозу в количестве 18 г/л среды и агар-агаровую массу 20 г/л среды.

Полученный отобранный инокулят стерильно переносят в инокуляционный ферментер. Объем загрузки инокуляционного ферментера составляет приблизительно от 0,1% до 2% объема технологического ферментера.

Условия проведения процесса в инокуляционном ферментере представляют собой следующие:

Температура внутри установки 28-29°C; давление внутри установки 0,02-0,03 МПа; расход воздуха 15-30 м³ воздуха/м³ ферментационной среды в час; перемешивание лопастной мешалкой со скоростью 250 об/мин; рН среды 5,8-6,2. Ферментационная среда для инокуляции содержит дрожжевой экстракт NY YEST 412 Kerry в количестве 6 г/л среды, свекловичный сахар - сахарозу 18 г/л среды.

Активность гриба необходимо сохранять в пробирках при регулярном цикле инокуляции каждые 3 месяца. Гриб следует хранить при температуре 3-5°C.

Инокулят культивируют в течение 36-48 часов; мицелий должен иметь ватную структуру с длинными волокнами, обильным спорообразованием и равномерно суспендироваться в ферментационной среде. В процессе ферментации контролируют значения рН, количество красителя, количество биомассы мицелия и микробную чистоту образца - монокультура, плесень. По истечении вышеуказанного периода стерильно переносят инокулят в стерилизованную ферментационную среду в технологическом ферментере.

Условия в технологическом ферментере представляют собой следующие:

Объем инокулята в технологическом ферментере составляет приблизительно от 0,1% до 3% объема технологического ферментера.

Температура внутри установки 28-29°C, давление внутри установки 0,07-0,08 МПа, расход воздуха 30-50 м³ воздуха на м³ ферментационной среды в час, перемешивание лопастной мешалкой со скоростью 250-400 оборотов в минуту, рН среды 5,8-6, растворимость кислорода 80-100%.

Ферментационная среда для инокуляции содержит дрожжевой экстракт HY YEST 412 Kerry в количестве 6 г/л среды, свекловичный сахар - сахарозу в количестве 18 г/л среды, пеногаситель PPG по необходимости.

Таким образом, мицелий культивируют в течение 68-72 часов, пока сахароза в среде не израсходуется; во время ферментации контролируют рН, количество остаточной сахарозы, количество пигмента, количество биомассы мицелия и микробную чистоту образца - монокультура, плесень.

По окончании ферментации резко повышают температуру в ферментере до 45-50°C, доводят рН аммиачной водой до рН 8,5-9,5 и перемешивают со скоростью 35-40 об/мин.

Далее идут завершающие стадии, т.е. отделение мицелия с использованием центрифуги, скорость 15000 об/мин, или возможно путем фильтрации под давлением ферментационной жидкости, содержащей требуемый продукт - красные пигменты. Содержание мицелия составляет приблизительно 3-5% от объема загрузки. Далее следует очистка среды от фрагментов мицелия и нерастворимых веществ путем пропускания ее через микрофильтрационное устройство (размер пор мембраны 0,45-0,60 мкм), и на заключительной стадии концентрирование продукта до объема, составляющего 1/10 объема загрузки, в установке нанофильтрации (размер пор 300-350 Дальтон).

Концентрированный продукт затем сушат распылением на подходящем носителе. Температура распыляемого материала 35-45°C, рН 9,0-9,5. Температура воздуха на входе в сушильную камеру 200°C; температура на выходе из сушильной камеры 98°C.

В результате получают красный порошок со слегка горьким вкусом вместе с фиолетовыми, оранжевыми и коричневыми пигментами, определяемыми методом хроматографии.

Анализ конечного продукта - красного пигмента после ферментации штаммов *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* ССМ 8242 и ССМ 8374 - полученного в оптимальных условиях ферментации, показал выход 6-10 г красного пигмента на литр среды. Величина поглощения, рассчитанная с помощью предложенного FAO способа, составляет 1,05. В этом случае концентрация красного пигмента определяется по следующей формуле:

$$\% = (100 \times A \times 100) / 1,05 \times W,$$

где

A - обозначает поглощение лямбда-макс при 494 нм,

W - обозначает массу образца кристаллического пигмента 100 мг,

1,05 - константа скорости поглощения.

Полученный красный пигмент анализировали спектрометрически методом молекулярной абсорбционной спектрофотометрии в видимой области электромагнитного спектра в диапазоне частот от 400 нм до 800 нм, где 2 характеристических максимума были достигнуты в водном растворе, pH 7-7,5, и первый максимум на Lambda max_1 соответствовал $A = 494$; второй самый высокий максимум на Lambda max_2 соответствовал $A = 420$ нм.

Другой спектрометрический анализ проводили на спиртовом растворе красного пигмента, где первый максимум на Lambda max_1 соответствовал $A = 502$ нм, и второй самый высокий максимум на Lambda max_2 соответствовал $A = 415$ нм.

Качество (чистота) пигмента отражается значением $A_1/A_2 = 1,3-1,5$, при котором антиоксидантная активность составляет 2,65.

Качество слегка горьковатого красного порошка одновременно с фиолетовыми, оранжевыми и коричневыми пигментами иллюстрируется диаграммой на фиг. 1.

Пример 2

Получение происходило также, как в примере 1, но со следующими модификациями:

Источником азотистых веществ, используемых в ферментационной среде, был дрожжевой экстракт NY-YEST 412 Kerry. При аэрации в процессе ферментации использовали 30-50 м³ воздуха на м³ ферментационной среды в час. Температура составляла 28-29°C и среду перемешивали со скоростью 250-400 оборотов в минуту. Ферментированная среда проявляла красное окрашивание уже через 22 часа. Ферментация завершилась через 68-72 часа. Для окончательной обработки продукта использовали микрофльтрацию с использованием мембран с размером пор 45-0,60 мкм и нанофльтрацию с использованием мембран с размером пор 300-350 Дальтон.

Пример 3

Биомасса, используемая при получении композиционных пигментов в соответствии с изобретением, должна содержать по меньшей мере 10% масс./масс. глюканов для достижения необходимого подходящего применения в питании.

В таблице 1 представлен состав мицелий = биомасса (может быть использована для комплексной сушки):

Таблица 1

содержание/фактор	мицелий
	г/100 г сухого вещества
Сухое вещество	
Зола	6,5
Жир	3,9
Белки	32,1
Общее содержание пищевых волокон	37,0
Растворимые пищевые волокна	26,8
Нерастворимые пищевые волокна	10,3
Витамины в биомассе	г/100 г сухого вещества
Ниацин	3,7
Пантотеновая кислота	7,10
Пиридоксин	1,81

Примечание:

Пенегаситель жирного происхождения

Белки – возможно, незначительное влияние оказывает добавление аммиака

Антиоксидантная активность (мг АА/1 г сухого вещества) (DPPH) = 2,65

В таблице 2 показано сравнение содержания глюканов в биомассе – см. фиг. 2:

Таблица 2

содержание/фактор	Мицелий
	г/100 г сухого вещества
Сухое вещество	
Общее содержание глюканов	13,25
Альфа-глюканы	3,40
Бета-глюканы	9,85
Гриб рода <i>Pleurotus</i> (лиофилизированный мицелий)	
Общее содержание глюканов	17%
Альфа-глюканы	3%
Бета-глюканы	14%

На фиг. 2 показаны FT-IR-спектры глюкана гриба и мицелия *Penicillium oxalicum*. FT-IR-спектр образца измеряли в диапазоне волновых чисел от 4000 до 450 см^{-1} с разрешением 2 см^{-1} , и спектры сравнивали со спектром глюкана гриба, где было подтверждено присутствие глюкана, содержащего 1,3 и 1,6 связи; образец также содержит жиры (область 3000 см^{-1}) и белки (область 1700 см^{-1}). Полученные композиционные пигменты в соответствии с изобретением в виде красного пигмента подвергали анализу, как представлено на фиг. 2.

Образцы композиционных пигментов (Natural Red), маркированные как неочищенный экстракт, и исходный образец тестировали с использованием клеточно-биологических методов (флуоресцентная микроскопия, проточная цитометрия) на первичных фибробластах кожи человека. Эксперимент проводили дважды для каждого образца; полученные данные не показали значительного разброса, это является биологическим повтором.

Метод:

Для достижения оптимального физиологического состояния клетки размораживали из маточных культур, хранившихся в жидком азоте за неделю до эксперимента. Затем клетки 1 раз пассировали до оптимальной клеточной плотности (слияние около 50%) в планшетах с 24 лунками со вставленным покровным стеклом (Nunc). Для проверки биоактивности/токсичности реагенты, хранящиеся в концентрации 50 мг/мл (4°C), разводили в стерильных условиях в среде для тканевых культур (D-MEM, 10% FCS) и добавляли в необходимых концентрациях к испытываемым фибробластам. Испытание продолжалось 24 часа/72 часа при температуре 37°C и в атмосфере с содержанием CO₂ 5%.

Для проточной цитометрии (FACS) клетки отделяли от планшета для культивирования с помощью 0,1% раствора трипсина, немедленно маркировали флуоресцентным красителем DAPI, используемым для идентификации некротических и апоптотических клеток (HY YEST 412 Kerry), и затем анализировали с использованием FACS Aria (Becton Dickinson). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo.

Для флуоресцентной микроскопии клетки фиксировали 4% PFA в PBS в течение 10 минут, пермеабелизировали 0,01% Triton X-100 в PBS, RT, блокировали 5% BSA в PBS и маркировали моноклональными антителами против Lamp-3 (MEM 259) и флуоресцентным фаллоидином Alexa 594. Затем мышинное моноклональное антитело идентифицировали с помощью вторичного антитела GAM-Alexa 488. Визуализацию выполняли с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus и чувствительной цветной камеры DP50 (объектив 40x).

Проточная цитометрия:

Анализ точечного графика показывает результат одного из повторов в течение 24-часовой инкубации с концентрациями, охватывающими диапазон 8-1000 микрограмм/мл.

Заключение: Проточная цитометрия не выявила значительной цитотоксичности в диапазоне концентраций 8-1000 микрограмм/мл. Самая высокая протестированная концентрация является чрезмерной; лишь немногие вещества типа вторичных метаболитов являются сравнительно бионейтральными. Биологический повтор показал аналогичные результаты как в 24-часовом, так и в 72-часовом эксперименте.

Флуоресцентная микроскопия:

Первичные фибробласты кожи были протестированы на экстракты Natural Red в диапазоне концентраций 1-500 микрограмм/мл. Была визуализирована целостность и структура актинового цитоскелета (который чрезвычайно чувствителен к воздействиям

окружающей среды), а также поздняя эндосомальная/лизосомальная везикулярная система и ядра.

Заключение:

Выбранная комбинация характеристик подходит для чувствительной идентификации нарушений клеточной физиологии. Последнее не было зарегистрировано, может быть за исключением самой высокой концентрации, которая привела к небольшому изменению адгезии и удлинению клеток; эндосомальная/лизосомальная система не была затронута, а также не наблюдалось некроза или апоптоза (в любом временном аспекте, т.е. 24 и 72 часа) в обеих фракциях в биологическом повторе.

Исследованные фракции Natural Red демонстрируют исключительную биосовместимость/отсутствие цитотоксичности по отношению к первичной клеточной линии фибробластов кожи человека. Никаких существенных клеточных патологий не было зарегистрировано в широком диапазоне концентраций, применяемых в течение нескольких дней и проверенных с помощью чувствительных количественных (проточная цитометрия), а также качественных методов (флуоресцентная микроскопия).

Промышленная применимость

Решение касается нового способа получения композиционных красных, фиолетовых, оранжевых и коричневых пигментов с антиоксидантным действием, полученных в результате культивирования и ферментации биомассы из штаммов *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* ССМ 8242 и ССМ 8374; кроме того, оно также касается новых композиционных пигментов для применения в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности.

Перечень сокращений, использованных в тексте:

FT-IR спектры - детектор флуоресценции в инфракрасной области спектра

RO - обратный осмос

DEMI - деминерализованный

MF – микрофльтрация

NF - нанофльтрация

PPG - полипропиленгликоль

DPPH - дифенилпикрилгидразил

CO₂ - диоксид углерода

FCS - корреляционная спектроскопия флуоресценции

FACS - проточная цитометрия с возбуждением флуоресценции

DAPI - 4,6-диамино-2-фенилиндол - флуоресцентный краситель

PFA - белки плазмы

PBS - буфер (фосфаты) для тканевых культур

Triton X-100 - неионогенное поверхностно-активное вещество

RT - обратная транскриптаза

BSA - бычий сывороточный альбумин

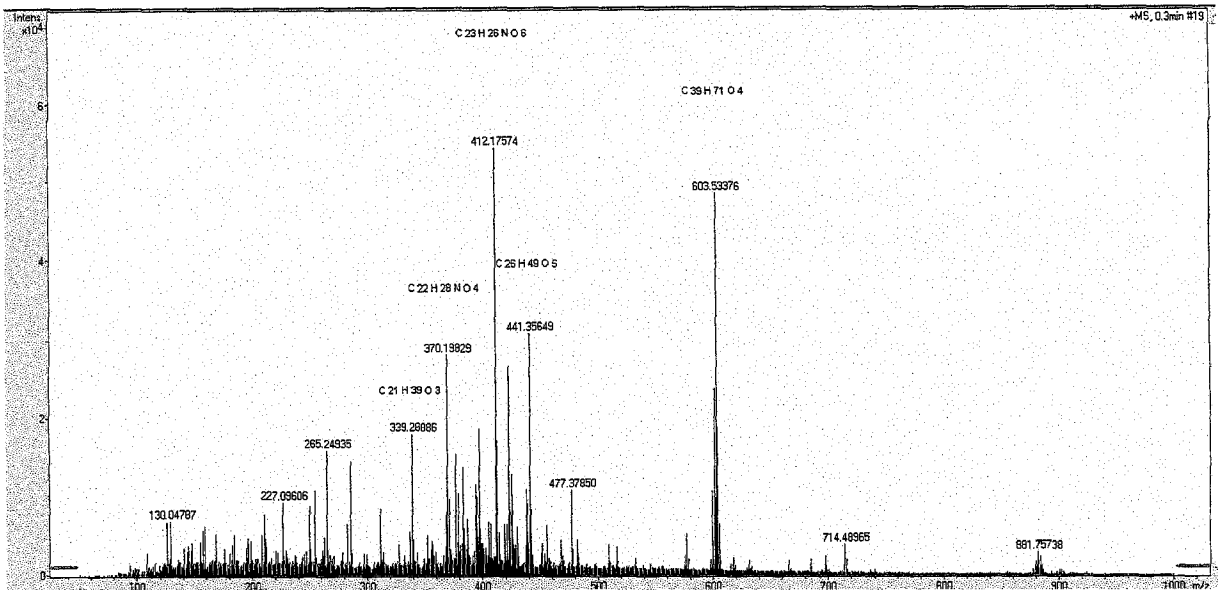
MEM - моноклональное антитело

GAM-Alexa 488 - название антитела

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

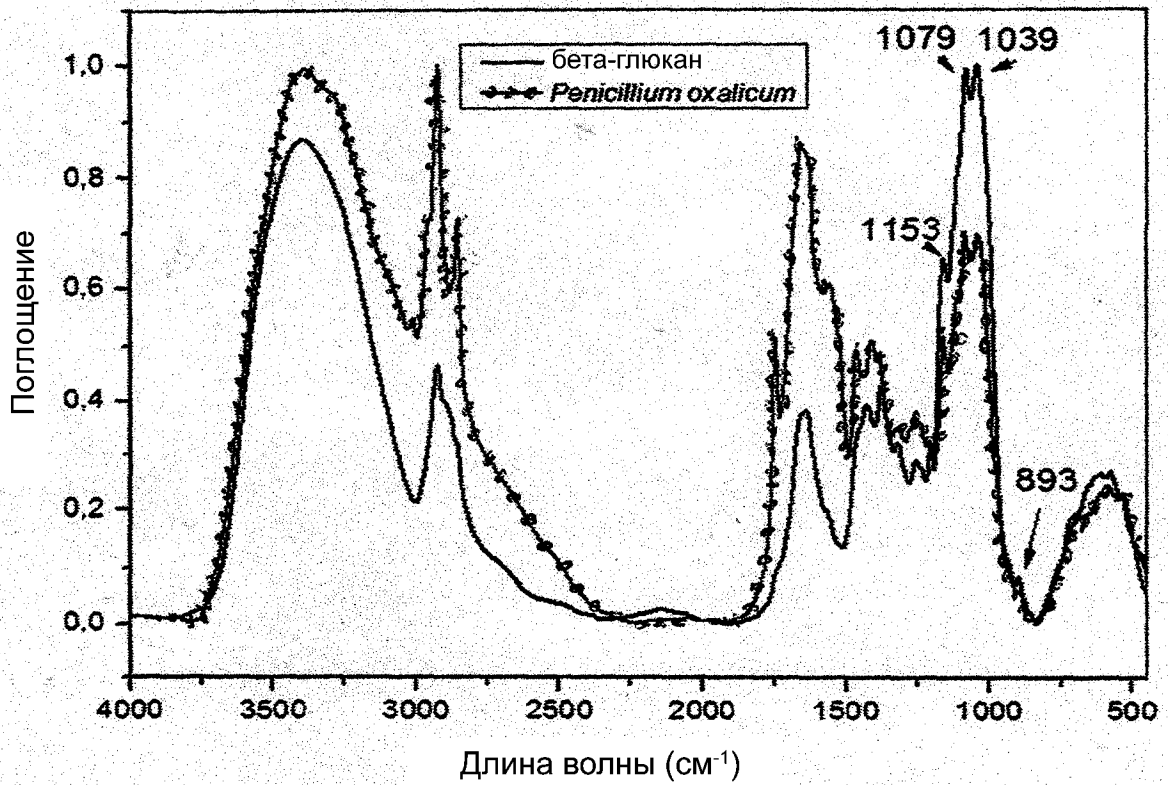
1. Способ получения композиционного пигмента на основе красного, фиолетового, оранжевого и коричневого красителей с антиоксидантным действием из культивируемой биомассы штаммов микроорганизмов *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* ССМ 8242 и ССМ 8374, отличающийся тем, что исходная биомасса содержит по меньшей мере 10% масс./масс. смеси альфа- и бета-глюканов, 3% масс./масс. ниацина, 7% масс./масс. пантотеновой кислоты и 1,5% масс./масс. пиридоксина в сухом веществе.

2. Композиционный пигмент на основе красного, фиолетового, оранжевого и коричневого красителей с антиоксидантным действием, полученный из биомассы штаммов микроорганизмов *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* ССМ 8242 и ССМ 8374, по п. 1, в частности, для пищевой, фармацевтической и косметической промышленности, характеризующийся типичными максимумами на спектрофотометрической диаграмме, полученной методом молекулярной абсорбционной спектрофотометрии в видимой области спектра в диапазоне длин волн от 400 нм до 800 нм, то есть двумя максимумами в водном растворе со значениями рН 7-7,5, где первый максимум на Lambda max_1 соответствует $\lambda = 494$ нм, и второй самый высокий максимум на Lambda max_2 соответствует $\lambda = 420$ нм, и двумя максимумами в спиртовом растворе, где первый максимум на Lambda max_1 соответствует $\lambda = 502$ нм, и второй самый высокий максимум на Lambda max_2 соответствует $\lambda = 415$ нм.

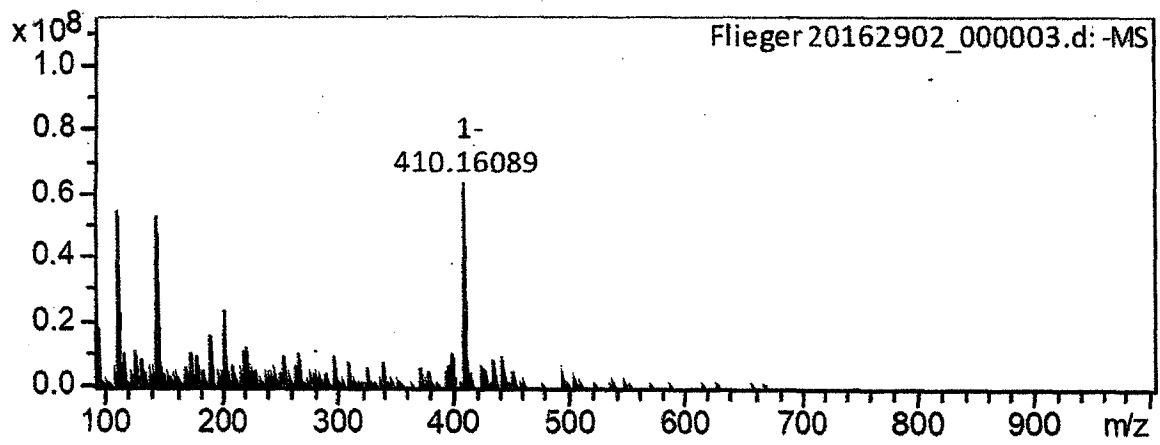


Фиг. 1

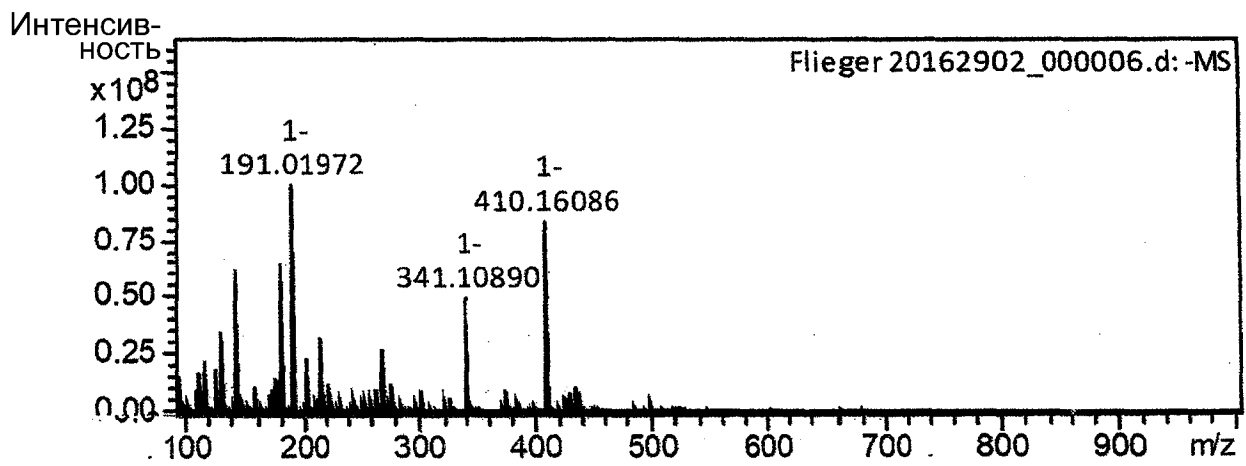
Инфракрасная спектроскопия



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4