



Biologiya in Agriculture

ISSN 2311-9322 (Print), ISSN 2311-9330 (Online)

Биология

в сельском хозяйстве №3, 2014

Научно-практический и теоретический журнал



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования

«Орловский государственный аграрный университет»

Фундаментальные и прикладные исследования по селекции, генетике, биотехнологии, физиологии,
этологии, микробиологии и многим другим отраслям современной науки

scientia, virtus, libertas

≡ Russian Federation ≡

<p>Учредитель: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Орловский государственный аграрный университет»</p>		
<p>Главный редактор: А. И. Шендаков, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, член Союза писателей России, тел. 8-953-816-78-84</p> <p>Редакционная коллегия: В. С. Буюров (председатель), д. с.-х. н., профессор (г. Орёл) И.А. Егоров, д. б.н., профессор, академик РАСХН (г. Москва) А. С. Делян, д. с.-х. н., профессор (г. Москва) Л. В. Калашникова, д. филолог. наук, профессор (г. Орёл) С. И. Кононенко, д. с.-х. н., профессор (г. Краснодар) А. А. Коровушкин, д. биол. н., профессор (г. Рязань) С. Д. Князев, д. с.-х. н., профессор (г. Орёл) В. И. Крюков, д. биол. н., профессор (г. Орёл) Р. Н. Ляшук, д. с.-х. н., профессор (г. Орёл) В. В. Обливанцов, д. с.-х. н., профессор (г. Севастополь) С. Н. Харитонов, д. с.-х. н., профессор (г. Москва) М. А. Shariati, Islamic Azad University (г. Тегеран)</p> <p>Техническая поддержка: С. А. Плыгун, к. с.-х. н. (г. Орёл)</p>	<p align="center">Содержание</p> <p align="center">Актуальные вопросы животноводства</p> <p>А. И. Шендаков, Т. И. Ханина <i>Генетические и средовые факторы при минимизации инбредной депрессии в стаде симментальского скота.....</i> 2</p> <p align="center">Современные аспекты биологии плодовых культур</p> <p>Sherzod Rajametov, Sam-Seok Kang, Karim Baymetov <i>Changing of the Water Regime, Leaf Anatomical Structure, Chlorophyll Composition and Electrolyte Leakage in Different Pear Cultivars during Summer Period under Natural Humidity Condition of Korea.....</i> 6</p> <p align="center">Биологические проблемы переработки и производства продуктов питания</p> <p>Saman Azizizadeh, Mohammadyar Hosseini, Somayeh Aziznia <i>The Application of Cloud Point Extraction in Food Industries.....</i> 15</p> <p>Alireza Keshavarzian, Mohammad Hojjatoleslami, Hooman Moulavi, Saeed Sekhavatizadeh, Abbas Esmaceli, Mohammad Ali Shariati <i>Microencapsulation of probiotic Bacteria by sodium alginate and investigation of in batter of Probiotic Wafer.....</i> 18</p> <p>Saman Azizizadeh, Mohammadyar Hosseini, Somayeh Aziznia, Mohammad Ali Shariati <i>Biodegradable packages; good replacer of synthesized packages from oil compounds</i> 22</p> <p align="center">Требования к публикациям в журнале..... 25</p>	<p align="right">стр.</p>
<p>Адрес учредителя и редакции: 302019, Россия, г. Орёл, ул. Генерала Родина, д. 69, каб. 1-413 Периодичность выхода, объём: 4 раза в год, до 100 страниц, А4. Тираж: 300 экземпляров. Свидетельство о регистрации: ПИ №ФС 77-54372 от 29.05.2013 г. Отпечатано в издательстве ОрёлГАУ Язык: русский, английский Телефон: гл. редактор – 8-953-816-78-84, факс: +7 (4862) 45-40-64 E-mail: bio413@ya.ru (для материалов), aish78@yandex.ru (для переписки) Сдано в набор: 20.09.2014 г. Подписано в печать: 30.09.2014 г. Формат: 60x84/8 Фото на обложке: симментальский молодняк Орловской области на ежегодной выставке племенных животных, г. Орёл (30.08.2014, фото А. И. Шендакова)</p> <p>Сайт журнала: http://agro-bio.ru Автор логотипа: А. И. Шендаков</p>		
<p>© ФГБОУ ВПО ОрёлГАУ, 2014</p>		

A. I. Shendakov, Doctor of Agricultural Sciences
T. I. Hanina, Post-graduate student
Orel State Agrarian University, Orel City, Russia,
E-mail: bio413@ya.ru, 8-953-816-78-84

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И СРЕДОВЫЕ ФАКТОРЫ ПРИ МИНИМИЗАЦИИ
ИНБРЕДНОЙ ДЕПРЕССИИ В СТАДЕ СИММЕНТАЛЬСКОГО СКОТА***

(Genetic and environmental factors on minimization of inbreeding depression in a herd of Simmental cattle)

В статье приводятся результаты оценки интенсивности роста симментальского молодняка при использовании разных степеней инбридинга, в том числе ин-энд-инбридинга, боттомкроссинга, топкроссбридинга, инбредлайнкроссинга. Определено, что при боттомкроссинге и топкроссинбридинге влияние генетических факторов на живую массу от рождения до 6 месяцев у бычков возрастает до 73,7-75,8%.

Ключевые слова: симментальской скот, генетические факторы, ин-энд-инбридинг, топ-кросс-инбридинг, боттомкроссинг, инбредлайнкроссинг.

В отличие от отечественных авторов зарубежные исследователи уделяют большое внимание анализу генетических параметров: Abe H, Masuda Y, Suzuki M. (2009), Andersen-Ranberg I.M., Klemetsdal G., Heringstad B., Steine T. (2006), Banos G., Coffey M.P., Wall E., Brotherstone S. (2009), Berry D.P., Buckley F., Dillon P., Evans R.D., Rath M., Veerkamp R.F. (2003), Berry D.P., Buckley F., Dillon P., Evans R.D., Rath M., Veerkamp R.F. (2002-2003), Berry DP, Buckley F, Dillon P, Evans RD, Veerkamp RF. (2004), Bloemhof S., de Jong G., de Haas Y. (2009), Cassandro M., Comin A., Ojala M., Dal Zotto R., De Marchi M., Gallo L., et al. (2008), de Roos, A. P. W., and G. de Jong. (2006), Dematawewa C.M.B., Berger P.J. (1998), Estrada-León R.J., Magana J.G., Segura-Correa J.C. (2008), Haile-Mariam M, Bowman PJ, Goddard ME. (2004), Heriazon, A. (2007), Jensen J., Hohenboken W.D., Madsen P., Andersen B.B. (1995), Kadarmideen H.N., Wegmann S. (2003), Loker S., Bastin C., Miglior F., Sewalem A., Schaeffer L.R., Jamrozik J., et al (2011), Oseni S., Tsuruta S., Misztal I., Rekaya R. (2004), Samoré A.B., Rizzi R., Rossoni A., Bagnato A. (2010), Stoop, W. M., H. Bovenhuis, and J. A. M. van Arendonk. (2006), Vallimont J.E., Dechow C.D., Daubert J.M., Dekleva M.W., Blum J.W., Barlieb C.M., et al. (2010) и др. При этом неотъемлемой частью исследований при анализе генетических параметров в зарубежных работах является изучение проблем инбридинга: Adamec V, Cassell B.G., Smith E.P., Pearson R.E. (2006), Biffani S., Samoré A.B., Canavesi F. (2009), Bijma P.J., van Arendonk A.M., Woolliams J.A. (2001), Croquet C., Mayeres P., Gillon A., Vanderick S., Gengler N. (2006), Daetwyler H.D., Villanueva B., Bijma P., Woolliams J.A. (2010), Gulisija D., Gianola D., Weigel K.A. (2007), König S., Tsehay F., Sitzenstock F., Borstel U.Uv., Schmutz M., Preisinger R., et al. (2010), Kearney JF, Wall E, Villanueva B, Coffey MP. (2004), Mc Parland S, Kearney JF, Rath M, Berry DP. (2007), Meuwissen T.H.E, Luo Z.

The article presents the results of the evaluation of the intensity of growth Simmental calves using different degrees of inbreeding, including in-and-inbreeding, bottom crossing, top-cross inbreeding, in-breed-line-crossing. Determined that at bottom crossing, top-cross inbreeding, in-breed-line-crossing the influence of genetic factors on live weight from birth to 6 months in bulls increases to 73,7-75,8%.

Keywords: Simmental cattle, genetic factors, in-and-inbreeding, bottom crossing, top-cross inbreeding, in-breed-line-crossing.

(1992), Meuwissen T.H.E. (1997), Meuwissen, T. H. E. (2002), Miglior F., Szkotnicki B., Burnside E.B. (1992), Miglior F. (2000), Pulkkinen TI, van der Lende T, Groen AF, Kaal LMTE, Zonderland J.J. (1998), Rutten M.J.M., Bijma P., Woolliams J.A., van Arendonk J.A.M. (2002), Sewalem A., Kistemaker G.J., Miglior F., Van Doormaal B.J. (2006), Smith L.A., Cassell B.G., Pearson R.E. (1998), VanRaden P.M. (2005), VanRaden P.M. (1992), Pong-Wong R., Woolliams J.A. (2007), Thompson J.R., Everett R.W., Hammerschmidt N.L. (2000), Thompson J.R., Everett R.W., Wolfe C.W.. (2000), VanRaden P.M., Smith L.A. (1999), Weigel K.A., Lin S.W. (2002), вычисление и использования коэффициента инбридинга в селекции голштинского скота в США посвящена работа Wiggans G.R., Van Raden P.M., Zuurbier J. (1995) [15]. В практике молочного скотоводства России инбридинг применяется достаточно давно, однако его варианты дают разные результаты в селекции [2, 3], которые могут быть не только отрицательными, но и противоречивыми [1, 2]. Эти и другие генетические аспекты селекции скота раскрывают статьи, приведённые в списке литературы [2-14]. В связи с активным использованием искусственного осеменения данный вопрос является актуальным во многих странах мира.

Материалы и методы.

Для решения задач минимизации инбредной депрессии нами были проведены исследования в ООО «Фатнево» Болховского района Орловской области. Для совершенствования симментальского поголовья в данном хозяйстве в последние годы применялись преимущественно симментальские и красно-пёстрые голштинские быки ОАО «Орловское» по племенной работе. При исследовании интенсивности роста тёлочек контрольной группой были животные, полученные методом кровосмешения, при изучении интенсивно-

сти роста бычков контролем выступала группа, полученная в результате ин-энд-инбридинга (т.е. в нескольких поколениях) и комплексного инбридинга. Все животные были одного возраста. Коэффициент инбридинга вычисляли по формуле Райта [16]. Статистический анализ проводили в компьютерной программе «Microsoft Excel».

Результаты исследований.

Проведённые ранее исследования показали, в инбредном поголовье симментальского и симментал-голландского скота ООО «Фатнево» наибольшей живой массой при рождении обладали тёлки, полученные в результате кровосмешения (32,5 кг), однако тёлки (n=30), полученные при топбридинге и топкроссбридинге (т.е. с применением инбредных отцов в степени IV-IV и V-V), также дали более высокую живую массу – 31,2 кг. В конце первого месяца выращивания наибольшую живую массу имели тёлки, полученные при кровосмешении и умеренном родстве: живая масса от 1 до 12 месяца возросла у них от 57,0 и 53,5 до 268,0 и 266,0 кг соответственно. Причём в 7, 8, 9 и 10 месяцев тёлки с $F_x=25,0\%$ превосходили тёлочек с $F_x=0,781\%$ на 24,8, 31,0, 41,7 и 43,2 кг соответственно ($p<0,1-0,05$).

Впоследствии животные этих групп смогли набрать к 18 месяцам живую массу, необходимую для нормального оплодотворения, а тёлки, полученные в результате боттомкроссинга (т.е. при оплодотворении инбредных матерей семенем аутбредных быков), к 12 месяцам дали худший показатель – всего 211,5±5,7 кг, что уступило тёлкам с $F_x=25,0\%$ 56,5 кг ($p<0,001$).

Среди инбредного поголовья бычков (см. таблицу 1) при рождении отличалась группа, полученная методом топбридинга и топкроссбридинга (n=28) – 29,9±0,2 кг, хотя по всем группам существенных различий получено не было. Со 2 по 4 месяц в стаде лидировали по интенсивности роста животные, полученные при спаривании инбредных матерей и аутбредных отцов (рост составил с 48,3 до 86,6 кг), однако к 5 и 6 месяцам наибольшую живую массу снова показала группа, полученная с использованием семени инбредных отцов – 99,1±2,5 и 113,6±3,0 кг, что превысило животных контрольной группы на 13,2 и 18,3 кг соответственно ($p<0,001$). Вариация живой массы по группам и месяцам была недостаточно стабильной, что может быть подтверждением сильной зависимости инбредного поголовья бычков от условий кормления и содержания.

Таблица 1. – Влияние вариантов родственного спаривания на интенсивность роста симментальских бычков в ООО «Фатнево»

Разновидность инбридинга	n	Параметры	Живая масса по месяцам, кг					
			при рождении	1	2	3	4	5
Ин-энд-инбридинг (т.е. в нескольких поколениях) и комплексный инбридинг	8	M	29,7	45,1	61,5	80,2	85,9	95,3
		±m	0,1	1,8	3,1	3,7	1,5	2,7
		σ	0,43	5,08	8,79	10,53	4,15	7,67
		C _v , %	1,45	11,27	14,29	13,12	4,84	8,05
Умеренное родство (III-IV и IV-IV)	7	M	29,4	45,9	64,4	84,9	96,0	103,9
		±m	0,49	4,15	6,65	7,10	7,89	9,93
		σ	0,2	1,6	2,5	2,7	3,0	3,7
		C _v , %	1,68	9,06	10,32	8,37	8,22	9,56
Боттомкроссинг (т.е. инбредные матери)	19	M	29,5	48,3	67,4	86,6	96,1	105,6
		±m	0,2	1,1	2,1	3,0	2,4	3,3
		σ	1,09	4,75	9,37	13,01	10,57	14,33
		C _v , %	3,71	9,85	13,90	15,01	11,00	13,56
Топбридинг и топкроссбридинг (т.е. инбредные отцы)	28	M	29,9	48,1	66,7	84,5	99,1	113,6
		±m	0,2	0,8	1,4	1,9	2,5	3,0
		σ	1,13	4,05	7,27	10,13	13,02	15,80
		C _v , %	3,78	8,43	10,90	11,99	13,14	13,91
Инбредлайнкроссинг и инкроссбридинг	10	M	29,3	46,2	62,9	83,2	96,3	104,8
		±m	0,1	1,2	2,4	2,4	3,5	4,7
		σ	0,46	3,87	7,46	7,64	11,10	14,99
		C _v , %	1,56	8,37	11,86	9,18	11,53	14,31
Всё инбредное поголовье	72	M	29,6	47,3	65,6	84,5	96,2	107,5
		±m	0,1	0,5	1,0	1,2	1,4	1,8
		σ	0,97	4,51	8,29	10,65	11,69	15,28
		C _v , %	3,28	9,53	12,64	12,61	12,15	14,22

Однако изучение корреляций между живой массой бычков (см. таблицу 2) показало, что влияние генетических факторов на интенсивность роста возрастает при спаривании инбредных матерей и аутбредными быками и наоборот (73,7%). Это может быть подтверждением снижения инбредной депрессии. Ин-

бредлайнкроссинг и инкроссбридинг также способен уменьшать инбредную депрессию по живой массе у бычков в связи со сложными формами наследования в при спаривании животных разных пород и линий.

Анализ роста до 6 месяцев показал, что у тёлочек, в отличие от бычков, при боттомкроссинге, топбри-

динге и топкроссинбридинге влияние генетических факторов на живую массу было выше, чем у бычков, полученных аналогичным методом родственного спаривания (77,9-78,9%). Это может быть подтверждением того, что при спаривании, направленном на разрыв инбредной депрессии, при выращивании в одинаковых

условиях кормления тёлочки реагирует интенсивнее на 4,2-5,2%. Достаточное количество животных в этих группах позволяет сделать вывод о возможном увеличении тенденции по этому различию влияния генетических и средовых факторов на живую массу.

Таблица 2. - Влияние вариантов родственного спаривания на повторяемость роста симментальских бычков и тёлочек в ООО «Фатнево»

Разновидность инбридинга	Голов	Параметры	Корреляции живой массы в смежные периоды выращивания (от рождения до 6)								Влияние генетических и средовых факторов, %	
			при рожд. – 1 месяц	1 месяц – 2 месяц	2 месяц – 3 месяц	3 месяц – 4 месяц	4 месяц – 5 месяц	5 месяц – 6 месяц	r_w	1- r_w		
											r	$\pm m_r$
Бычки												
Ин-энд-инбридинг Контрольная группа	8	r	0,695	0,953	0,888	-0,616	0,728	0,956	60,1	39,9		
		$\pm m_r$	0,840	0,040	0,055	0,094	0,082	0,035				
Умеренное родство (III-IV и IV-IV)	7	r	0,099	0,886	0,915	0,734	0,789	0,924	72,5	27,5		
		$\pm m_r$	0,119	0,055	0,048	0,081	0,073	0,046				
Боттомкоросинг (т.е. инбредные матери)	19	r	-0,166	0,930	0,967	0,862	0,894	0,936	73,7	26,3		
		$\pm m_r$	0,102	0,044	0,030	0,061	0,054	0,042				
Топбридинг и топкроссинбридинг (т.е. инбредные отцы)	28	r	-0,007	0,887	0,825	0,886	0,888	0,941	73,7	26,3		
		$\pm m_r$	0,001	0,055	0,068	0,055	0,055	0,040				
Инбредлайнкроссинг и инкроссбридинг	10	r	0,248	0,992	0,811	0,634	0,917	0,947	75,8	24,2		
		$\pm m_r$	0,116	0,015	0,070	0,092	0,048	0,039				
Всё инбредное поголовье инбредных бычков	72	r	0,025	0,924	0,883	0,828	0,885	0,945	74,8	25,2		
		$\pm m_r$	0,120	0,046	0,056	0,067	0,056	0,039				
Тёлочки												
Ин-энд-инбридинг Контрольная группа	8	r	-0,142	0,979	0,959	0,915	0,869	0,907	74,8	25,2		
		$\pm m_r$	0,107	0,022	0,030	0,044	0,053	0,046				
Умеренное родство (III-IV и IV-IV)	6	r	-0,099	0,981	0,794	0,838	0,955	0,981	74,2	25,8		
		$\pm m_r$	0,107	0,021	0,066	0,06	0,032	0,021				
Боттомкоросинг (т.е. инбредные матери)	34	r	0,201	0,908	0,876	0,868	0,933	0,950	78,9	21,1		
		$\pm m_r$	0,106	0,040	0,055	0,055	0,053	0,030				
Топбридинг и топкроссинбридинг (т.е. инбредные отцы)	28	r	0,344	0,893	0,772	0,886	0,846	0,932	77,9	22,1		
		$\pm m_r$	0,100	0,045	0,071	0,055	0,055	0,045				
Инбредлайнкроссинг и инкроссбридинг	6	r	-0,094	0,974	0,782	0,254	0,883	0,973	62,9	37,1		
		$\pm m_r$	0,110	0,024	0,067	0,105	0,055	0,024				
Всё инбредное поголовье инбредных тёлочек	88	r	0,281	0,916	0,845	0,866	0,909	0,947	79,4	20,6		
		$\pm m_r$	0,110	0,043	0,054	0,054	0,045	0,035				

Таблица 3. - Генетическая и паратипическая изменчивость живой массы в инбредных группах симментальского молодняка ООО «Фатнево»

Группа молодняка	Голов	Параметры	Изменчивость живой массы в разные периоды выращивания, кг						
			при рождении	1 месяц	2 месяц	3 месяц	4 месяц	5 месяц	6 месяц
Бычки	72	σ_G	0,726	3,373	6,201	7,966	8,744	11,429	15,332
		σ_e	0,246	1,145	2,106	2,705	2,969	3,881	4,915
		σ_P	0,972	4,518	8,307	10,671	11,713	15,31	20,247
Тёлочки	88	σ_G	1,588	4,875	8,019	8,829	10,743	12,688	16,428
		σ_e	0,412	1,265	2,081	2,291	2,787	3,292	4,262
		σ_P	2,001	6,140	10,100	11,120	13,531	15,981	20,690

Генетическая изменчивость живой массы тёлочек от рождения до 6 месяцев была выше, чем у бычков, и

составила от 1,588 до 16,428 кг (см. таблицу 3), в то время как паратипическая изменчивость была выше у

бычков, начиная со второго месяца выращивания (от 2,106 до 4,915 кг), что может быть свидетельством того, что для инбредных бычков следует особенно тщательно балансировать рацион.

Подводя итог проведённым исследованиям, следует заметить, что в селекции симментальского скота по интенсивности роста результаты зависят в большей степени не от варианта инбридинга, а от индивидуальной сочетаемости родительских пар. Крайне нежелательным остаётся инбридинг в нескольких поколениях и комплексный инбридинг, поскольку при нём инбредная депрессия проявляется максимально. Спаривание инбредных коров с аутбредными быками и аутбредных коров с инбредными быками не даёт однозначных результатов, однако можно предположить, что способ боттомкроссинга может быть применим только на крупных быков-производителей, а при топбридинге и топкроссбридинге можно избежать серьёзных

последствий только в тех вариантах спаривания, когда высокой живой массой обладают коровы. Бесконтрольное использование родственного спаривания недопустимо, однако умеренное родство при спаривании не ведёт к существенной инбредной депрессии по интенсивности роста у тёлочек и бычков. Случаи применения кровосмешения в селекции симментальского скота допустимы только при наличии выдающихся качеств у спариваемых родителей. Боттомкроссинг, топкроссинбридинг, инбредлайнкроссинг и инкроссбридинг позволяют усилить влияние генетических факторов на живую массу телят от рождения до 6 месяцев. Инбредные тёлочки растут несколько интенсивнее за счёт влияния генетических факторов, в отличие от бычков. В целом, проведённые исследования позволяют ослабить негативные последствия инбридинга в молочно-мясном скотоводстве Орловской области.

Литература

1. **Айсанов З. М.** Определение эффекта инбридинга у крупного рогатого скота молочных и комбинированных пород. *Вестник РАСХН*. 2004;5:19-21.
2. Винничук, Д. Парадоксы инбридинга. *Молочное и мясное скотоводство*. 2003;5:18-22.
3. **Сельцов В. И., Сермягин А. А.** Продуктивные качества инбредных и аутбредных коров симментальской породы. *Зоотехния*. 2011;10:2-4.
4. **Miglior F., Szkotnicki B., Burnside E.B.** Analysis of levels of inbreeding and inbreeding depression in Jersey cattle. *J. Dairy Sci.* 1992;75:1112-1118.
5. **Parland, S. Mc., Kearney J. F., Rath M., Berry D. P.** Inbreeding effect on milk production, calving performance, fertility, and conformation in Irish Holstein-Friesians. *J. Dairy Science*. 2007;90:4411-4419.
6. **Pedersen L.D., Sørensen A.C., Berg P.** Marker-assisted selection reduces expected inbreeding but can result in large effects of hitchhiking. *J. Anim. Breed. Genet.* 2010;127:189-198.
7. **Pulkkinen T.I., van der Lende T, Groen A.F., Kaal LMTE, Zonderland J.J.** The effect of inbreeding on components of dairy cattle fertility as calculated from non-return data, using a multiphasic logistic function. *Interbull Bull.* 1998;18:74-77.
8. **Roxström A., Strandberg E., Berglund B., Emanuelson U., Philipsson J.** Genetic and environmental correlations among female fertility traits and milk production in different parities of Swedish red and white dairy cattle. *Acta Agric. Scand. A.* 2001; 51:7-14.
9. **Samoré A.B., Rizzi R., Rossoni A., Bagnato A.** Genetic parameters for functional longevity, type traits, somatic cell scores, milk flow and production in the Italian Brown Swiss. *Ital. J. Anim. Sci.* 2010;9:145-152.
10. **Thompson J.R., Everett R.W., Hammerschmidt N.L.** Effects of inbreeding on production and survival in Holsteins. *J. Dairy Sci.* 2000;83:1856-1864.
11. **Thompson J.R., Everett R.W., Wolfe C.W.** Effects of inbreeding on production and survival in Jerseys. *J. Dairy Sci.* 2000;83:2131-2138.
12. **VanRaden P.M.** Efficient methods to compute genomic predictions. *J. Dairy Sci.* 2008;91:4414-4423.
13. **VanRaden P.M.** Inbreeding adjustments and effect on genetic trend estimates. *Interbull Bull.* 2005;33:81-84.
14. **Weigel K.A., Lin S.W.** Controlling inbreeding by constraining the average relationship between parents of young bulls entering AI progeny test programs. *J. Dairy Sci.* 2002;85:2376-2383.
15. **Wiggans G.R., Van Raden P.M., Zuurbier J.** Calculation and use of inbreeding coefficients for genetic evaluation of United States dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 1995;78:1584-1590.
16. **Wright S.** Coefficients of inbreeding and relationship. *Am. Nat.* 1922; 56:330-338.

Поступила в редакцию: 13.09.2014 г.

Шендаков Андрей Игоревич, доктор сельскохозяйственных наук, профессор
ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет»,
bio413@ya.ru, aish78@yandex.ru, 8-953-816-78-84

*- исследования проведены в рамках темы, выполняемой по заказу Министерства сельского хозяйства Российской Федерации.

УДК 58.032.1

Sherzod Rajametov^{1,2}, Sam-Seok Kang² and Karim Baymetov^{3*}

¹National Agrobiodiversity Center, NAAS, RDA, Suwon, 441-853, Republic of Korea

²Pear Research Station, NHRI, RDA, Naju 520-821, Korea

³Uzbek Research Institute of Plant Industry, UzSPCA, Tashkent 111202, Uzbekistan

*Corresponding author (E-mail: baymetov40@mail.ru, Tel: +99871-260-11-69)

CHANGING OF THE WATER REGIME, LEAF ANATOMICAL STRUCTURE, CHLOROPHYLL COMPOSITION AND ELECTROLYTE LEAKAGE IN DIFFERENT PEAR CULTIVARS DURING SUMMER PERIOD UNDER NATURAL HUMIDITY CONDITION OF KOREA

(Изменение водного режима, анатомического строения листа, состава хлорофилла и утечки электролита в разных сортах груш в летний период в условиях естественной влажности Кореи)

Running Title: Water Regime and Morpho-Physiological Process in Different Pear Cultivars

ABSTRACT

The present study was conducted to evaluate the dynamics of the water regime in association with morpho-physiological activity in the different pear cultivars during the summer of 2013, such as: water content in leaves (WCL) and annual shoots (WCS), water deficit in leaves (WDL) and annual shoots (WDS), electrolytic leakage (EC), leaf anatomical structure and stomata parameters, total chlorophyll content. There were revealed some pattern in water regime so, regardless of the climatic condition WCL, WCS in all cultivars was decreased from early June to late August, however, WDL and WDS were differed significantly in comparison with WCL and WCS, where WDL seasonally fluctuated in all cultivars except Bartlett, which distinguished with high stable rate and there is an imbalance between WDL and WDS. According to results was not found the significant relationship between water regime and EC, stomata parameters, the anatomical structure and total chlorophyll content of the leaves in the summer period, whereas there RH of air and soil condition was sufficiently moistened which might be protected to show real ability of cultivars.

Therefore, pear cultivars cannot show their real ability in water regime and physiology especially under humid condition, and cannot be detected of resistance to stress factor and some patterns which are manifested in the dry season or in special controlled condition experience.

Keywords: water content, chlorophyll content, electrolyte conductivity, epidermis, stomata pore, mesophyll.

В данном исследовании была проведена оценка динамики водного режима в связи с морфофизиологической активностью в различных сортах груши в течение лета 2013 года, были изучены такие показатели, как: содержание воды в листьях и однолетних побегах, дефицит воды в листьях и однолетних побегах, электролитическая утечка, анатомическая структура листа и параметры устьиц, общее содержание хлорофилла. Были выявлены некоторые тенденции в водном режиме: так, независимо от климатических условий содержание воды в листьях и однолетних побегах во всех сортах груш было уменьшено с начала июня до конца августа, однако дефицит воды в листьях и однолетних побегах существенно отличался по сравнению с содержанием воды в листьях и однолетних побегах. При этом дефицит воды в листьях сезонно колебался во всех сортах, кроме сорта Бартлетт, который отличался высокой стабильностью и дисбалансом между дефицитом воды в листьях и однолетних побегах. По результатам исследований не было найдено значимой взаимосвязи между водным режимом и электролитической утечкой, параметров устьиц, анатомического строения и общего содержания хлорофилла в листьях в летний период, поскольку воздух и почва были достаточно увлажненными. Это могло несколько исказить реальную способность сортов груш к изменению водного режима.

В связи с этим сорта груш не смогли показать свою реальную способность в водном режиме и физиологии в условиях влажного климата, также не может быть подтверждена устойчивость сортов груш к стресс-факторам и некоторые закономерности, которые проявляются в сухой сезон или в специальных условиях, регулируемых проводимым экспериментом.

Ключевые слова: содержание воды, содержание хлорофилла, проводимость электролита, эпидермис, устьица, мезофилл.

Introduction

Water availability is one of the major factors that effect on plant productivity. The necessity regulation of this factor, particularly through irrigation, is primarily concerned with the actual need of plants in water, and to investigate the characteristics of their water regime (Petinov, 1962, Kushnirenko, 1964). The water content in

the tissues of fruit plants depends on the growing conditions, as well as associated with the age changes in organ and whole organism and shortage of water in the plant is significantly effect on morpho-physiological properties of the plant organs (Bahanova, 2003; Rajametov et al., 2010, Zayseva, 2011). Water regime of leaves is an underlying factor to determine physiological state of the trees, as in drought years when falling relative humidity reduces the

activity of the root system, and against this background that marked inhibition of growth of leaves and shoots (Trunov, 2005; Ulyanovskaya et al., 2005).

Plants usually respond to their changing environment in a complex, integrated way allowing them to respond and adapt to the specific set of conditions and constraints present at a particular time. It involves an array of physiological and biochemical modifications in plants including leaf wilting, reduction in leaf area and stomata, leaf abscission, stimulation of root growth, changes in relative water content, electrolytic leakage, generation of reactive oxygen species, and accumulation of free radicals which disrupt cellular homeostasis by reacting with lipids, proteins, pigments, and nucleic acids resulting in lipid peroxidation, membrane damage, and the inactivation of enzymes, thus affecting cell viability (Bajji, et al., 2001; Bahanova, 2003; Bartels and Sunkar, 2005; Zakharchuk and Ryazanova, 2013). Molecular responses to abiotic stresses, on the other hand, include stress perception, signal transduction to cellular components, gene expression, and, finally, metabolic changes imparting stress tolerance (Agarwal et al., 2006, Lata and Prasad, 2011). The genes thus induced by stress not only function in protecting cells from stress by the production of important metabolic proteins but also in regulating the downstream genes for signal transduction (Ingram and Bartels, 1996; Bray, 1997; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997, Nakashima et al., 2000; Bohnert et al. 2001).

Also, chlorophyll and stomata is vital for photosynthesis, gas exchange and respiration and so on, which plays very important role in plants physiology (Trejo et al., 1991, 1993; Rotondi and Predieri, 2002; Pruzinska et al., 2007). In whole on the water balance and physiological properties of plants are passed under influence many factors and in literature are presented limit information about tendency of water potential and physicochemical composition of pear organs during summer period, and many researchers are concentrated they investigation only in certain period and under special treatments. Therefore in this paper we presented research work on water regime in leaves and annual shoots in association with leaves anatomical parameters, total chlorophyll content and electrolyte conductivity of leaves is held during vegetation period in natural condition of Republic Korea.

Materials and the methods

Experiment was carried out in Naju Pear research station (RDA) during the summer of 2013 year and used different originated pear cultivars Bartlett (USA), Nashvati iz Pishkarina (UZB), Niitaka (JAP) and Chuwhangbae (KOR). It should be noted that all cultivars originated under humid area except Nashvati iz Pishkarina which genealogic was formatted in the dry area. All experiments were not subjected to a special treatment and conducted under natural conditions. The main purposes were to study of the occurring physiological features such as: changing water regime, electrical conductivity, total leaf chlorophyll content etc. Water regime in the leaves and shoots studied afternoon at 03⁰⁰PM from the annual shoot with leaves from position

between 30 and 70 cm, where each shoot was about 0.80-1.0 m with length and diameter 0.7-1.0 mm.

Water contents was estimated as a percentage of its total content in annual shoots and leaves and calculated by the formula:

$$WC\%=(W_1 - W_2) \times 100/W_1,$$

where WC%-water content, W₁-initial mass of shoots or leaves, W₂ - dry mass of shoots or leaves.

Water deficit in the shoots and leaves is determined as a percentage of its total content a state of complete saturation (shoots and leaves should be kept in water 24 hour) and are expressed as:

$$WD\% = (WA \times 100)/W,$$

where WD- water deficit, WA- water absorbed at saturation of the shoots and leaves, which is determined by the difference of mass of shoots and leaves before and after complete saturation, W- presence of water, the difference between the mass of shoots and leaves after complete saturation with water and dry mass of sample.

Electrical conductivity (EC) was measured afternoon at 03⁰⁰PM by using an Orion conductivity TDS meter model 124 conductimeter (Orion, Germany). In order to determine of electrolyte leakage for each treatment 3 leaves from cultivar was collected, weighed and cut into segments (ca. 0.5 cm) on 5.0 gram. Segments originating from the same shoot was put into 40 ml of distilled water in a test tube and allowed to stand for 15 h in the dark at 20°C. An initial electrical conductivity measure (EC_i) was taken at the beginning of this rehydration period. All tubes were heated for 30 min in water under 95°C. Then, the tubes containing the segments was returned into the dark at 20 °C and kept for 15 h. Following these readings, the total electrical conductivity (EC_t) will be measured. Electrolyte leakages (%) are expressed as: (EC_i/EC_t) × 100.

The stomata area was determined from middle part of annual shoot leaves low part morning at 08⁰⁰AM and afternoon at 03⁰⁰PM by electron microscope AXIO (Carl Zeiss, Germany, and magnification- x50-400). The leaf area (cm²) was measured in mid-August from middle part leaves of annual shoots by LI-3100 Area meter (USA) and to determine leaf anatomical structure the leaf samples were initially fixed in 2.5% glutaraldehyde for 90 min at 4°C and then rinsed four or five times with 0.1M phosphate buffer (pH 7.2). The second fixing process was achieved using 1% osmium tetroxide for 90 min and rinsed again with 0.1 M phosphate buffer five times. The fixed samples were dehydrated in the alcohol series with increasing concentrations. Dehydrated samples were laid in a silicon mold with epon + D.M.P. 30 for 4 days at 60°C After polymerization, the embedded samples were sectioned into 1 μm thickness using an ultramicrotome (Ultracut R. Leica Co., Austria) and observed under light microscopy AXIO (Carl Zeiss, Germany, and magnification- x200).

Total chlorophyll content was analyzed morning at 08⁰⁰AM and afternoon at 03⁰⁰PM by Eon Microplate Spectrophotometer USA- at 651 and 664 nm (mg/g-¹ fresh weight). Leaf disks each 6.25 mm in diameter, were punched from the medium part of annual shoot leaves. The disks were placed immediately into 25 mL of 100%

methanol, and pigments were allowed to be extracted in dark at 4.0°C for 14 h.

Results and discussion

South Korean environment conditions of summer are usually distinguished with warm, long sunny day and high rate of precipitation. During carry out the experiment were recorded air temperature and humidity. Dynamics of the data shows that the temperature increased from June to mid-August and reached a maximum in August about 35°C (Fig. 1). Relative humidity (RH) distinguished with consistently high during the summer especially at night time, and reached 99%, whereas the afternoon its rate was also relatively high over 50%. Monthly mean rainfall was generally higher in July and in August and total rainfall was about 700 mm during the summer and soil moisture content in all cultivars was well supplied with water, where at depth 1.0 m exceed 30-40% (data not presented).

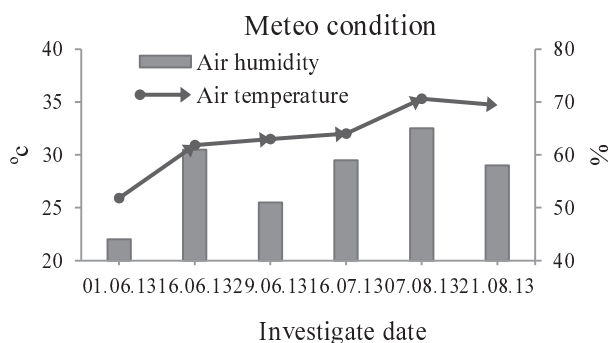


Fig. 1. Climatic condition of the investigation time of 2013, Naju.

According to results the water regime in leaves and annual shoots was unstable and ranged depending on period and features of cultivars. So, regardless of the climat-

ic condition WCL in all investigated cultivars decreased from early June to late August where was reported (Bahanova, 2003; Zakharchuk and Ryazanova, 2013) in fruit crops and the same pattern was detected in WCS however was detected the saving of varietal difference in this trait (Fig. 2 and 3). It should be noted that WCL in association with WCS was declining from early June to late August. Niitaka and Nashvati iz Pishkarina in comparison with cultivars Chuwhangbae and Bartlett was determined with relatively low WCL and WCS. High concentration of the water in leaves and shoots are related with physiological activity of the plant organs and absolute maximal levels characterized in the beginning of the blossom (Bahanova, 2003) and further the water content reducing due to aging of the organs but it should be noted that the cultivars which has showed high WCL in blossom cannot show high stable value during vegetation period. Gradual decline values of the water regime during the summer period associated with biological features of cultivars, by the weakening of the water availability of the plant organs which controlled by some plant regulators, hormones and genes and contribute to physiological and biochemical modifications in plants including leaf wilting, reduction in leaf area, leaf abscission, induces leaf stomata closure to reduce water loss through transpiration and decreases the photosynthetic rate in order to improve the water-use efficiency, root growth, changes in relative water content, inactivation of enzymes, thus affecting cell viability and so on (Gomez et al., 1988; Agarwal et al., 2006; Bartels and Sunkar, 2005; Lata et al., 2011 and 2011a; Zakharchuk and Ryazanova, 2014). On the basis of the above, it can be assumed that the physiological and biochemical processes in the plants are held differently and according to that water regime is different in cultivars.

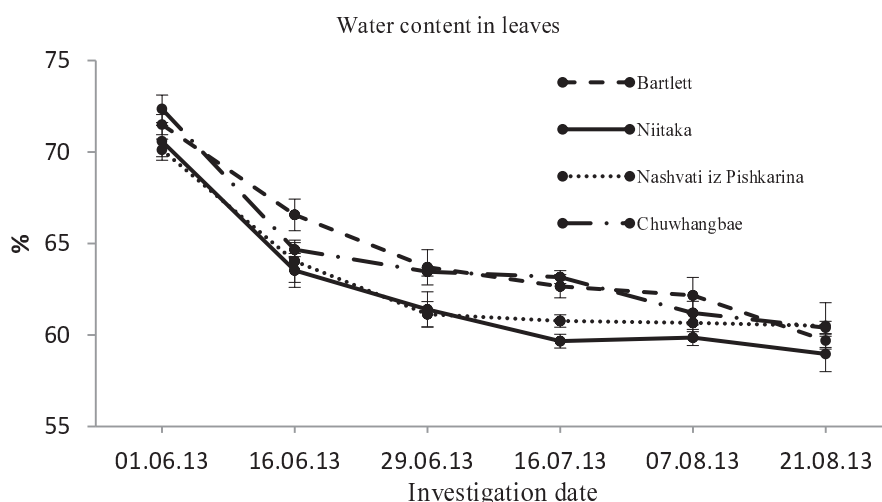


Fig. 2. Dynamic of the changing water content in leaves, 2013.

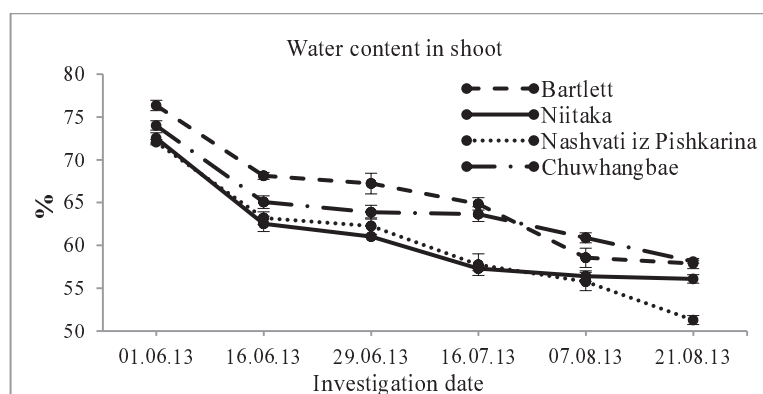


Fig. 3. Dynamic of the changing water content in annual shoots, 2013.

Water shortage is an important and integral physiological index reflecting as the degree under saturation tissue the water with insufficient water supplies, indicating the needs of plants in moisture. However, WDL and WDS were differed significantly in comparison to WCL and WCS. So, WDL seasonally fluctuated in all cultivars except Bartlett (Fig. 4), which distinguished with high stable rate. Additionally, from early June to August detected relatively high unstable values in all cultivars, where in this period in the plant organs are held a maximal intense of physiological activity with high progress of growth stage (Bahanova, 2003; Gegechkori et al., 2013.). In August regardless of high temperature WDL in Niitaka, Chuwhangbae and Nashvati iz Pishkarina

showed dynamics of decreasing whereas Bartlett had reverse pattern. Almost the same pattern was determined in our experiment which was done under condition of Uzbekistan (Rajametov, 2008; Rajametov et al., 2010) where East and Central Asian pear cultivars had been distinguished with low WDL compared to European. In comparison to Korean humid condition where in June and July detected high (over 15%) and fluctuated values of WDL, there was revealed stable dynamic relatively low (about 10%) rates of the WDL during the summer in Uzbekistan, and it might be attributed to the fact that the climate is characterized by the dry without precipitation and protective mechanism are activated to saving water (Cruz et al., 2012).

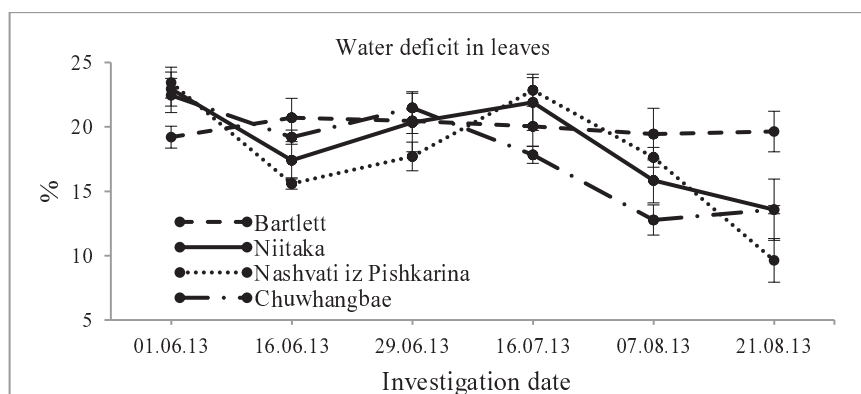


Fig. 4. Dynamic of the changing water deficit in leaves, 2013.

WDS was detected in cultivars with common tendency decreasing from June to August (Fig. 5), and a relatively low value determined in Nahsvati iz Pishkarina. However, early June determined in all cultivars absolute minimal WDS, hereinafter increased and revealed an absolute maximal values in mid-June, further WDS rates again started to reduce, where the same pattern was detected in WCL and WCS. A minimal WDS in early June it can be assumed with high ability of uptake water by plant organs to progress of growth stage, well saturated leaves and shoots with water, temperature and humidity condition. With increasing temperature plant require-

ments in water will be increased until certain period. And revealed that there is an imbalance between WDL and WDS, where have difference of water absorption that related with water demand in other plant organs, age, leaf anatomical structure, xylem and roots conductivity, transpiration rates etc. (Trejo and Davies, 1991; Rotondi and Predieri, 2002; Kosma et al., 2009; Cruz et al., 2012; Aroca et al., 2012; Gegechkori et al., 2013). Especially strong shortage of water observed in all cultivars annual shoots in the mid and at the end of June and there was not found relationship between water content and water deficit of leaves and shoots.

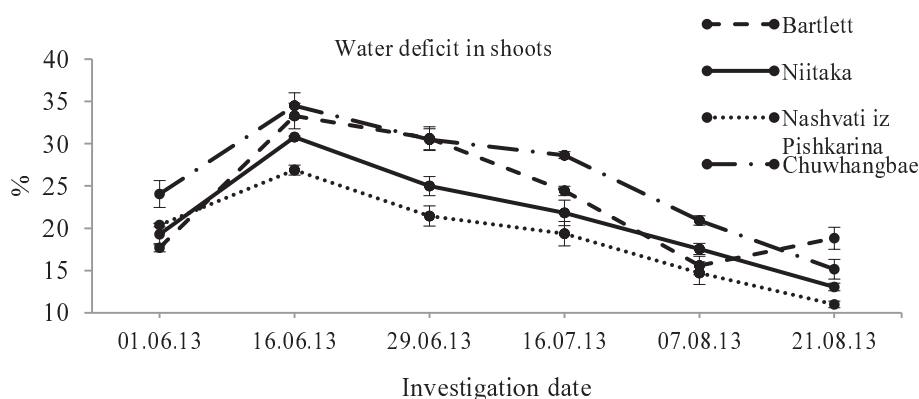


Fig. 5. Dynamic of the changing water deficit in annual shoots, 2013.

Electrolyte conductivity of leaves was distinguished with significantly differs trade in summer by assay of the water regime. Whereas, many researcher reported that electrolyte leakage measurements may be correlated with several physiological and biochemical parameters conditioning the plant responses to environmental conditions such as spectral reflectance (Garty et al. 2000; Vainola and Repo 2000), antioxidative enzyme synthesis (Liu and Huang 2000; Sreenivasulu et al. 2000), membrane acyl lipid concentrations (Lauriano et al. 2000), water use efficiency (Franca et al. 2000; Saelim and Zwiazek 2000; Bajji et al., 2001), transverse relaxation time of leaf water (Maheswary et al. 1999), stomatal resistance, osmotic potential and leaf rolling index (Premachandra et al.

1989). However, all experience was concentrated on certain time and under special treatment condition. In our case in vivo EC rates showed rising up from early June to mid-July, then when daily average temperature was significantly has increased in August and was observed sharply declining of the degree of cell membrane injury below 25% and kept point until late August (Fig. 6). Only Bartlett has relatively high level of electrolyte leakage from the cells to compare other cultivars thus provides an estimate of high tissue injury (Bandurska et al., 1997; Linden et al., 2000; Bajji et al., 2001). And in our experience was not revealed any relationship of EC between stomata parameters and with water regime of plant in summer.

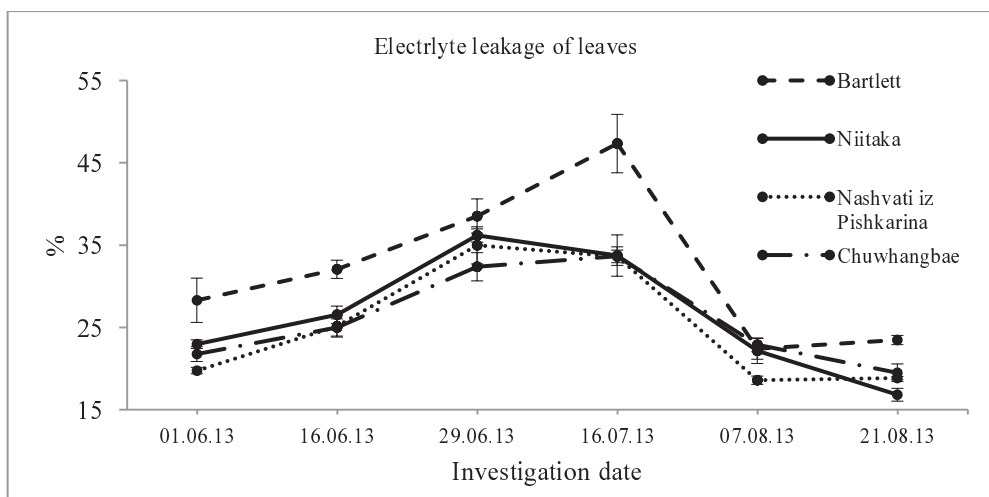


Fig. 6. Changing of the electrolyte conductivity of leaves, during the summer 2013.

Investigation of pear leaves anatomical structure showed that the cultivars Niitaka and Chuwhangbae were distinguished with high leaf thickness, upper and lower epidermis layer, length of stomata slit between guard cells (Tab. 1) and over 1.5 times bigger diameter of the main vascular bundles especially xylem (Fig. 7) however, they had lowest density of upper and lower epidermis per 100 μm on compare Bartlett and Nashvati iz Pishkarina. And also, in Niitaka and Chuwhangbae was detected relatively big leaf area with high weight per leaf and cm^2 . In com-

parison a length and density of palisade mesophyll per 100 μm all cultivars has a negligible difference except Bartlett. According to Bahanova (2003) apple cultivars with high leaf thickness, upper and lower epidermis layer and density of stomata per mm^2 contributed to increase leaf transpiration rate and low WDL, but in our case that pattern was not observed under humid Korean condition and it can be occur in the dry area.

Table 1. Analyses of the pear leaf anatomical parameters

Name	Thicknesses ^y			Length of palisade mesophyll, μm^y	Width of stomata slit between guard cells, μm^y	Density ^y			The main vascular bundles ^x	
	Leaf, μm	Upper epidermis, μm	Lower epidermis, μm			Upper epidermis per 100 μm	Lower epidermis per 100 μm	Palisade mesophyll per 100 μm	Diameter, μm	Area, μm^2
Nashvati	258.7 ±2.24b ^z	17.24 ±1.04b	8.57 ±0.32b	115.7 ±3.30b	25.32 ±0.98c	4.9 ±0.13a	6.9 ±0.36a	11.0 ±0.28ab	181.0 ±2.18c	25750 ±622.2c
Bartlett	263.0 ±3.78b	17.34 ±0.77b	9.30 ±0.31b	128.3 ±2.11a	26.41 ±1.38bc	4.7 ±0.16a	6.3 ±0.29a	11.6 ±0.24a	162.2 ±3.07d	21250 ±714.6d
Niitaka	299.3 ±3.49a	30.07 ±1.38a	20.47 ±1.15a	117.8 ±4.30b	29.30 ±1.11ab	3.8 ±0.18b	4.7 ±0.27b	10.9 ±0.19b	308.2 ±3.04a	74690 ±1466.9a
Chuwang	295.8 ±4.88a	26.55 ±1.65a	20.77 ±1.06a	111.4 ±4.06b	30.77 ±1.19a	3.7 ±0.16b	4.5 ±0.20b	10.9 ±0.26ab	296.4 ±4.30b	69120 ±1990.6b

^{yx}Data represented by Mean ± SD (n = 20 and 10) ^zMean separation within columns by LCD test, $P \leq 0.05$

Also, preliminary estimate of the leaf stomata parameters showed that depending on time of day was differed (Tab. 2). At morning time 08⁰⁰ AM in comparison 03⁰⁰ PM Niitaka and Bartlett leaves stomata area was expanded significantly from 773.0 to 835.1 and 703.5 to 724.3 μm^2 respectively, whereas in Nashvati iz Pishkarina it was reduced and in Chuwangbae was quite negligible. It might be associated with temperature and RH, xylem conductivity, needs of plant organs to uptake water, role for ABA metabolism in the regulation of stomata behavior and changes are often accompanied by closure of stomata and so on (Rodriguez and Davies, 1982; Zhang and

Davies, 1990a; Hartung and Slovik, 1991; Gollan et al., 1992; Trejo et al., 1993).

Density of stomata per mm^2 was varied in cultivars from 164.8 to 214.3 pieces but in calculation on the total leaf area Niitaka and Chuwangbae was excelled with high density, and coating stomata on total leaf surface area exceeded about 16-18%, whereas in Nashvati iz Pishkarina it was about- 11.9% respectively. And we have not found the significant relationship between water regime and the anatomical structure of the leaves in the summer period whereas there RH of air and soil condition was sufficiently moistened.

Table 2. Changes of the stomata parameters in leaf during a day

Name	Stomata parameters in leaf								
	Density of stomata ^y		Total covered area in leaves, %	Changing of stomata area depending on time ^x , μm^2		length of stomatal pore ^x , μm^2		width of stomatal pore ^x , μm^2	
	per mm^2	per leaf (thousand)		08-00 AM	03-00 PM	08-00 AM	03-00 PM	08-00 AM	03-00 PM
Niitaka	214.3 ±6.7 a ^z	14637.8	16.6	773.0 ±26.1 b	835.1 ±23.2 b	30.14 ±0.64 a	26.70 ±0.66 b	10.86 ±0.23 bc	11.42 ±0.41 b
Chuwangbae	183.4 ±4.6 b	12972.8	17.6	961.0 ±42.0 a	968.5 ±32.2 a	31.70 ± 0.79 a	28.78 ±0.72 a	12.27 ±0.33 a	11.04 ±0.28 b
Nashvati	164.8 ±3.8 c	3064.3	11.9	761.7 ±43.5 b	720.5 ±35.0 c	23.82 ±0.77 b	25.47 ±0.79 bc	9.93 ±0.28 c	9.56 ±0.29 c
Bartlett	203.7 ±5.6 a	3523.0	14.3	703.5 ±28.5 b	724.3 ±29.1 c	25.51 ±0.77 b	24.19 ±0.62 c	11.52 ±0.56 ab	14.85 ±0.51 a

^{yx}Data represented by Mean ± SD (n = 12 and = 30) ^zMean separation within columns by LCD test, $P \leq 0.05$

Total chlorophyll content in all cultivars leaves regardless of the condition the minimal values were noted in Niitaka. According to Rotondi and Predieri (2002) leaves of pear cultivars Abbé Fétel and Passe Crassane was distinguished with high chlorophyll contents and they also exhibited higher photosynthetic efficiency. Some researchers (Kushnirenko and Medvedev, 1969; Bahanova, 2003) reported that the increase of the content of chlorophyll in leaves under the shortage of water is a protective response of plants and cultivars is more drought resistance. So, in our case the maximal total chlorophyll content was revealed in Nashvati iz Pishkarina and ranged depending on period of day (Fig. 8 and 9) and it may be

has high photosynthetic rates. The degree of chlorophyll in all cultivars was high at 03⁰⁰ PM in comparison morning time and reached maximum mid-July then showed reverse rate decreasing. From seasonal investigations, there was determined negative and positive correlation between total chlorophyll, and total nitrogen content in the same cultivars and data was not steady and fluctuated regardless of time investigation (data not presented).

In contrast to our results, Park et al., (2007) in apple leaves by using Portable chlorophyll meter (SPAD—502) assayed that SPAD reading value increased from June to August but the correlation coefficients between SPAD

reading value and foliar nitrogen content tended to be gradually declined with progress of growth stage. According to Ghasemi et al., (2011) they detected positive and linear correlation between CCM-200 data, total chlorophyll, and total nitrogen content in Asian pear leaves however, that estimate was done only in June. This dis-

crepancy can be attributed to different crops, genotypes, period of experience and environments which also was determined in other crops (Blackmer and Shepers, 1995; Wu et al., 1998; Richardson et al., 2002; Rotondi and Predieri, 2002; Kowalczyk-Jusko and Kosciak, 2002).

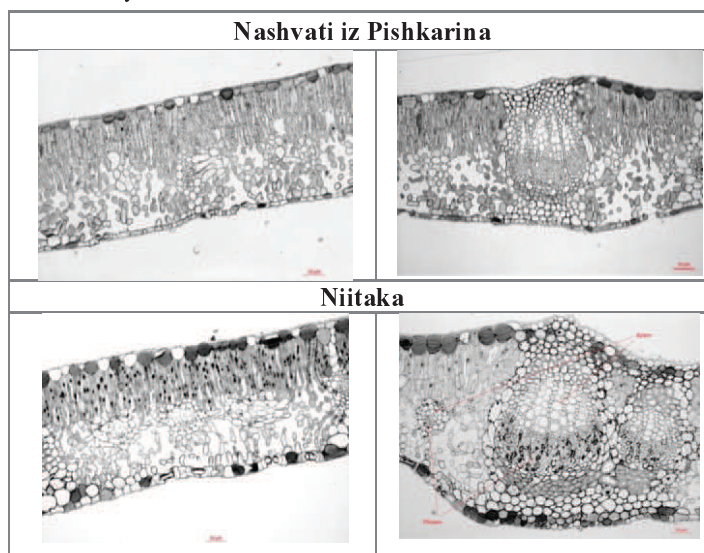


Fig. 7. Anatomical structure of the pear leaf which was originated in different condition, 2013.

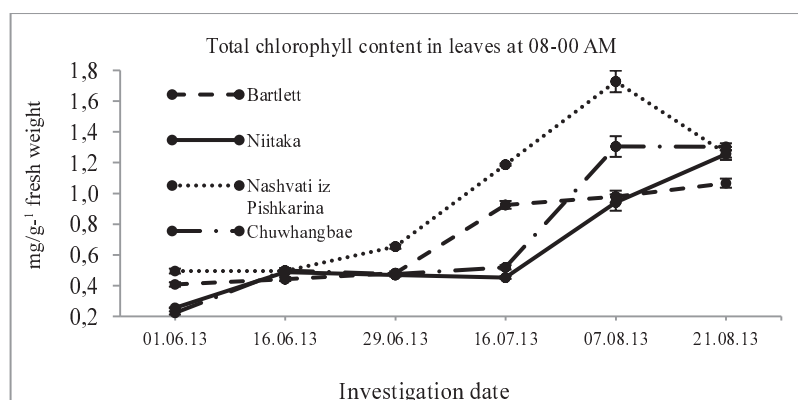


Fig. 8. Changing the total chlorophyll content in leaf at 08-00 AM during the summer 2013.

In conclusion, this experience demonstrate that the water regime, electrical conductivity, the size and density of the stomata, the total chlorophyll content of pears unstable and varies depending on the growth, age, climatic conditions. And interactions between variety and environment are very important in crop breeding in order to develop a specific variety suitable for a given region (Becker et al., 1999). Based on the presence or absence of the interaction effect, breeders may have to change the target area for cultivation or selection scheme.

In summary, the pear cultivars cannot show their real ability in water regime and physiology especially under humid condition, and to be resistant to stress factor and some patterns which are manifested in the dry season or in special controlled condition experience cannot be detected.

In order to the same cultivar can be cultivated in different habitat in the future breeders have to pay attention

to develop new cultivars on the base of the parental cultivars which were originated under external condition, and it is necessary to conduct the study in the same format under the semiarid areas where there is no practical during the summer rains and the humidity is relatively low compared to the humid and rainy condition. In this case, it can be seen another pattern the occurring of the physiological processes whereas some cultivars which were developed in semiarid area can be characterized more resistance to compare cultivars which developed in the humid area.

Acknowledgement

This work was supported by funds of Pear research station, NHRI, RDA, Republic of Korea. The author thanks Dr. Kang, Sam-Seok and technical staff for help to do this experiment.

References

1. **Agarwal PK, Agarwal P, Reddy MK, Sopory SK.** Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*. 2006; 25:1263-1274.
2. **Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM.** Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *J. Exp. Bot* 2012; 63:43-57.
3. **Bahanova BM.** Bio-ecological characteristics perspective varieties of apple in the western Transbaikalia. Synopsis of the research work. Ulan-Ude, 2003; 23.
4. **Bajji M, Kinet JM and Lutts S.** The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat *Plant Growth Regulation* 2001; 00: 1-10.
5. **Bandurska H, Stroinski A, Zielezinska M.** Effects of water deficit stress on membrane properties, lipid peroxidation and hydrogen peroxide metabolism in the leaves of barley genotypes. *Acta Soc. Bot. Pol.* 1997; 66: 177-183.
6. **Bartels D, Sunkar R.** 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Science* 21, 1-36.
7. **Becker HC, Loptein H, Robbelen G.** Breeding: An Overview. In: *Developments in plant genetics and Breeding, 4: Biology of Brassica coenospecies.* Gomez-Campo C. (ed.), 1999; 13: 413-449.
8. **Blackmer TM, and Shepers JS.** Use of a chlorophyll meter to monitor nitrogen status and schedule fertigation for corn. *J. Prod. Agr.* 1995; 8:56-60.
9. **Bohnert HJ, Ayoubi P, Borchert C, et al.** A genomic approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry.* 2001; 39, 295-311.
10. **Bray, E.A.** Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* 1997; 2: 48-54
11. **Cruz ZN, Rodriguez P, Galindo A, etc.** Leaf mechanisms for drought resistance in *Zizyphus jujuba* trees. *J. Plant Sci.* 2012 Dec;197:77-83
12. **Franca MG, Thi AT, Pimentel C, Rossiello RO, Zuily Fodil Y, Laffray D.** Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. *Environm. Exp. Bot.* 2000; 43: 227-237.
13. **Garty J, Weissman L, Tamir O, Beer S, Cohen Y, Karnieli A. et al.** Comparison of five physiological parameters to assess the vitality of the lichen *Ramalina lacera* exposed to air pollution. *Physiol. Plant.* 2000; 109: 410-418.
14. **Gegechkori B, Orlenko S, Rud M, etc.** Improvement of water supply of fruit plants. *sci. Jour. of Kuban GAU, №90(06).* 2013; 10.
15. **Ghasemi M, Kazem A, Yadollahi A. et al.** 2011. Estimate of Leaf Chlorophyll and Nitrogen Content in Asian Pear (*Pyrus serotina* Rehd.) by CCM-200 *Notulae Scientia Biologicae*; Vol. 3 Issue 1, p 91.
16. **Gollan T, Schurr U, Schulze ED.** Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Heliantus annuus*. I. The concentration of cations, anions, amino acids in, and pH of, xylem sap. *Plant Cell Environ* 1992; 15: 551-559.
17. **Gomez J, Sanchez-Martinez D, Stiefel V, Rigau J, Puigdomenech P, Page's M.** A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glyceric acid protein. *Nature.* 1988; 334, 262-264.
18. **Hartung W, Slovik S.** Physicochemical properties of plant growth regulators and plant tissues determine their distribution and redistribution: stomatal regulation by abscisic acid in leaves. *New Phytol.* 1991; 9: 361-382.
19. **Ingram J, Bartels D.** The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1996; 47:377-403.
20. **Kosma DK, Bourdenx B, Bernard A, Parsons EP, et al.** The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2009; 151: 1918-1929.
21. **Kushnirenko MD, Medvedev TN.** Effect of wilting on the pigment system and the development of water-retaining forces leaves. *Plant Physiol.* 1969 (T. 16); 3:529-534.
22. **Kowalczyk-Jusko A, Kosciak B.** Possible use of the chlorophyll meter (SPAD-502) for evaluation nitrogen nutrition of the Virginia tobacco. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities.* 2002; 5(1):05.
23. **Kushnirenko M.D.** Water metabolism and degree of drought tolerance of some fruit trees. *Plant Physiology.* 1964 (T. 2); 3:487-495. (Russian)
24. **Lata Ch, Prasad M.** Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, 2011. Page 1 of 18.
25. **Lata C, Bhutty S, Bahadur RP, Majee M, Prasad M.** 2011a. Association of a SNP in a novel DREB2-like gene SiDREB2 with stress tolerance in foxtail millet [*Setaria italica* (L.)]. *Journal of Experimental Botany.* DOI: 10.1093/jxb/err016.
26. **Lauriano J, Lidon F, Carvalho C, Campos P, and Matos M.** Drought effects on membrane lipids and photosynthetic activity in different peanut cultivars. *Photosynthetica* 2000; 38: 7-12.
27. **Linden L, Palonen P, and Linden M.** Relating Freeze-induced Electrolyte Leakage Measurements to Lethal Temperature in Red Raspberry. *J. AMER. SOC. HORT. SCI.* 2000;125(4):429-435.
28. **Liu X and Huang B.** Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. *Crop Sci.* 2000; 40: 503-510.
29. **Maheswary M, Joshi D, Saha R, Nagarajan S, Gambhir P.** Transverse relaxation time of

- leaf water protons and membrane injury in wheat (*Triticum aestivum* L.) in response to high temperature. *Ann. Bot.* 1999; 84:741-745
30. **Nakashima K, Shinwari Z, Sakuma Y, Seki M, et al.** Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Molecular Biology* 2000; 42: 657-665.
 31. **Park M, Park J and Lee I.** Seasonal Diagnosis of Nitrogen Status of 'Fuji'/M.26 Apple Leaves Using Chlorophyll Meter. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 2007; 25(1):59-62.
 32. **Petinov N.** Physiology in irrigated crops. Moscow: Kolos – 1962; 128 p.
 33. **Premachandra G, Saneoka H, Ogata S.** 1989. Nutrio-physiological evaluation of polyethylene glycol test of cell membrane stability in maize. *Crop Sci.* 29: 1287–1292.
 34. **Pružinska A, Anders I, Aubry S, Schenk N, Tapernoux-Lüthi E, et al.** In Vivo Participation of Red Chlorophyll Catabolite Reductase in Chlorophyll Breakdown and in Detoxification of Photodynamic Chlorophyll Catabolites. *Plant Cell.* 2007;19:369-387.
 35. **Rajametov Sh, Baymetov K, Ahmedov Sh.** Evaluation of drought resistance of some varieties of fruit trees. *J. Agro-ilm.* 2010; 1(13), 21-22.
 36. **Rajametov Sh.** Economical-biological features of local and introduced pear cultivars under Tashkent region and their breeding value. Thesis of research work to get PhD degree. Tashkent. 2008; 23.
 37. **Richardson AD, Duigan SP, Berlyn GP.** An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist* 153:185-194.
 38. **Rodriguez JL, Davies WJ.** 1982. The effects of temperature and ABA on stomata of *Zea mays* L. *J Exp Bot* 2002; 33: 977-987.
 39. **Rotondi A, and Predieri S.** Leaf anatomy and photosynthesis of pear trees with different growth habit. *Acta Hort. (ISHS)* 2002; 596:745-748.
 40. **Saelim S, Zwiazek J.** Preservation of thermal stability of cell membranes and gas exchange in high temperature-acclimated *Xylia xylocarpa* seedlings. *J. Plant Physiol.* 2000; 156: 380–385.
 41. **Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.** Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 1997;115:327-334.
 42. **Sreenivasulu N., Grimm B., Wobus U. and Weshke W.** Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). *Physiol. Plant.* 2000; 109: 435-442.
 43. **Trejo CL, Davies WJ.** 1991. Drought-induced closure of *Phaseolus vulgaris* L. stomata precedes leaf water deficit and any increase in xylem ABA concentration. *J Exp Bot* 42 1507-1555.
 44. **Trejo CL, Davies J, Mar L, Ruiz P.** Sensitivity of Stomata to Abscisic Acid An Effect of the Mesophyll. *J.: Plant Physiol.* 1993; 102: 497-502.
 45. **Trunov I.** Effect of finely dispersed irrigation and weather conditions on the water regime of apple leaves. Innovations and efficiency of production processes in fruit growing: in order. *Sat Materials Intern. Scientific and practical. Conf. - Krasnodar SKZNIISiV.* 2005; Vol. II: 67-70.
 46. **Ulyanovskaya E, Nenko N, Zaharova M, Karavaeva A.** 2005. Physiological and biochemical features of resistance to drought of genotypes of the apple-tree of various ploidy. <http://journal.kubansad.ru/pdf/10/02/05.pdf>
 47. **Vainola A, Repo T.** Impedance spectroscopy in frost hardiness evaluation of *Rhododendron* leaves. *Ann. Bot.* 2000; 86: 799-805.
 48. **Wu F, Wu L, Xu F.** Chlorophyll meter to predict nitrogen sidedress requirements for short-season cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Field Crops Res.* 1998;56: 309-314.
 49. **Zakharchuk N, Ryazanova L.** Methods of increasing the stability of fruit crops to the action of stress factors of southern Russia. *Sectorial economics.* 2013; (49), 1-2013.
 50. **Zayseva, I.A.** Morphophysiological adaptation of *Syringa* L in the introduction conditions in the steppe zone. *Bulletin of the Nikitsky Botanical Garden.* No. 2011; 100:32-36.
 51. **Zhang J, Davies W.** Changes in the concentration of ABA in xylem sap as a function of changing soil water status can account for changes in leaf conductance and growth. *Plant Cell Environ.* 1990a; 13:277-285.

Поступила в редакцию: 02.09.2014 г.

Karim Baymetov - Uzbek Research Institute of Plant Industry, UzSPCA, Tashkent 111202, Uzbekistan,
e-mail: baymetov40@mail.ru, Tel: +99871-260-11-69

Saman Azizizadeh¹, Mohammadyar Hosseini¹, Somayeh Aziznia²

1. Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture,
Urmia University, Urmia, Iran
samanazizizadeh2172@gmail.com

2. Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture,
Ilam University, Ilam, Iran.
hosseini1701@gmail.com

THE APPLICATION OF CLOUD POINT EXTRACTION IN FOOD INDUSTRIES

(Применение экстракции «в точке помутнения» в пищевой промышленности)

Abstract

This article is a brief introduction of theoretical results of cloud point extraction in food science. In this article, we present a collection of introductions on cloud point extraction, besides the advantages and its functionality have been studied and described the way this method demanded. This easy and simple method is affordable and has a wide range of application in determination of different samples and the ability of evaluating analyte in ng levels is possible in this method.

Keywords: extraction, surfactant, micelle, cloud point

Эта статья представляет собой краткое введение в теоретические результаты применения экстракции «в точке помутнения» в пищевой науке. В этой статье представлены базовые аспекты по экстракции «в точке помутнения», кроме преимуществ и функциональности были изучены и описаны пути этого метода. Этот легкий и простой способ является доступным и имеет широкий диапазон применения в определении различных образцов и оценки результатов анализа.

Ключевые слова: экстракция, поверхностность, мицеллы, «точка помутнения».

Introduction

Extraction of a chemical variety from natural or lab samples in order to analyze or pharmaceutical, edible or industrial goals require removing of other varieties in sample. All the treatment and process in this was called extraction where micelle systems are of the most functional methods (1). In recent decades, extraction and concentration stages in order to determine trace amount of some compounds in water solutions have been considered. Requirement of really low amount products of contaminants in water, soil and other biological samples revealed that high sensitive analyzing method and appropriate separation needs to be employed. Commonly applied methods in extraction and ion concentration in water solutions are liquid-liquid extraction (LLE) and solid phase extraction (SDP) therefore more tendency to replace solvent extraction methods in order to reduce sample manipulation, analyte loss and prevent using toxic solvents required (1).

The problem in both LLE and SPE is prolongation of extraction time and high manipulation. Other developed methods may reduce organic solvent applications and finally removed them. Solid phase micro extraction (SPME) is a method in organic compounds extraction from biological samples. SPME is base on analyte balance between polymeric stationary phases and sample matrix. In this method we need more than 1hr to extract sample (1).

In this method, surfactants used where their high capacity in dissolving different materials that permits an insoluble or negligible solubility readily dissolve in water.

A low volume of concentrated surfactant allows adjusting of analyte in 1 stage, then determining by atomic absorption, GC, and HPLC. It is a non toxic cheap method (2).

Surfactants

Surfactants are a collection of words including surface, active and agent. Surfactants are organic compounds containing hydrophobic groups in tails and hydrophilic groups in head. A surface active material has R-X structure in which hydrocarbon chain(R) with 8-18 carbon atoms and X is polar hydrophilic ion (4).

Micelle

In recent 76 years, an interesting relationship between physiochemical properties of surface active materials solution and their concentration proposed that quotes sudden changes in physiochemical properties these solution in a low range of concentration. These properties attributed to the aggregation of two character molecules and concepts such as micelle and critical concentration. Surface activating molecules in highly diluted solutions are in monomer form. However sometimes they find in dimer and trimer forms. When concentration of surfactant comes to a suitable amount, spontaneous aggregation and micelle forming occur (5). In this aggregation, hydrophobic part is in center of micelle, while polar groups interact with water surface and hydrated with lots of water molecules. Regarding chemical structures of micelles, they can be cationic, anionic, double ionic and non ionic (4).

Micelles types

Micelles categorized in two groups, common micelles and reverse micelles. In polar solvents, the hydrophobic groups in tail of surfactant molecules direct to the

center while hydrophilic groups direct to polar solvent resulting in create micelle aggregates. This status called common micelle. The process of aggregation in non polar solvent is so that end groups of surfactant molecules direct to the center and create hydrophilic core of micelles while non polar groups interact with solvent. These micelles called reverse (7). The size of micelles depends on temperature. For double characters non ionic in aqua medium, reduction of temperature led to enlarge the micelles diameter as a result of exothermic monomer into micelle structure in low temperature. Studies revealed that for Light scattering of double characters non ionic in non aqua medium, between temperature and the size of micelles is a direct relation (7).

Cloud point extraction

Surfactants used in this method of analyte extraction where they add to sample solution and do pre concentration treatment.

Cloud point extraction stages

First, surfactants add to sample, if required some salt adds as well, and then keeps in special temperature up to when the solution become turbid and give critical temperature. Solution centrifuged and extraction finished. Therefore sample gathers on the aqua phase and supernatant separated. This method is as scattering as liquid-liquid extraction (2).

Overall:

- First surfactant added to the sample.
- Adding salt to increase extraction
- Keeping in certain time up to becoming turbid of solution (cloudy point)
- Centrifuge
- Separation sample in aqua phase and collection of supernatant in order to separation

The advantages of cloudy point extraction methods

1. High concentration factor is available.
2. Surfactants are cheap and non environment contamination.
3. Surfactants use in low volumes.
4. The possibility of processing with sensitive compounds in low temperature is available.

The different types of analytes are separable with different properties.

The function of cloudy point extraction (1):

1. Separation of metal cations such as, aluminum, chrome, ...
2. Separation of polycyclic aromatic hydrocarbons.
3. Separation polychlorinated compounds.
4. Separation of biological molecules like proteins (casein, α lactalbumine).
5. Separation of pesticides
6. Separation of Lantids and metals mixture from water samples.
7. Separation of fat soluble vitamins.
8. Separation of choloro phenols, phenols, benzyl alcohol from water samples.

Examples of cloudy point extraction in food science

Application of cloudy point extraction in protein separation from cow milk and separation with mass spectrometry

Poly oxy ethylene and iso actyle phenyl ether (Triton X-114) are non ionic surfactant. In a research study parameters including the concentration of Triton X- 114, NaCl concentration, pH as effective parameters on extraction efficiency investigated, finally after using cloud point extraction method in order to separate, matrix-assisted laser desorption ionization – time off flight mass spectrophotometry (MALDI-TOF MS) used to conduct (11).

Applying of cloud point in separation of antioxidant (phenols) from olive oil wastes

In this study the application of Triton X-114 which has proved being efficient in extraction of phenolic compounds. The use of Triton X-114 as an effective surfactant in phenol compounds extraction has been researched. The affection of surfactant concentration on phenol compounds individually and total phenol compounds as well studied. In this study olive mill wastewater purchased from Argos Co, Greek. Before adding of surfactant, fat compounds extracted with hexane 20 min kept in water bath 20 min at 55-65°C and centrifuged with 3500 rpm for 5 min (12).

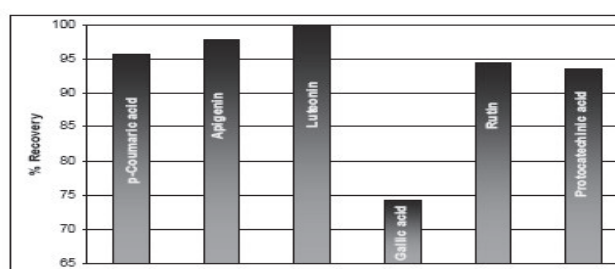


Figure 1. The investigation of surfactant affection in constant concentration of 4% on the efficiency of extraction (12)

In determination of surfactant affection in constant concentration of 4 % on extraction efficiency (figure 1), all of the surfactant had the efficacy of more than 90% except Gallic acid with 74.2%. In next stage of surfactant concentration from 2% to 4% and then 6 % (figure 2), the amount of efficiency has been increased in 3 stages extraction (12).

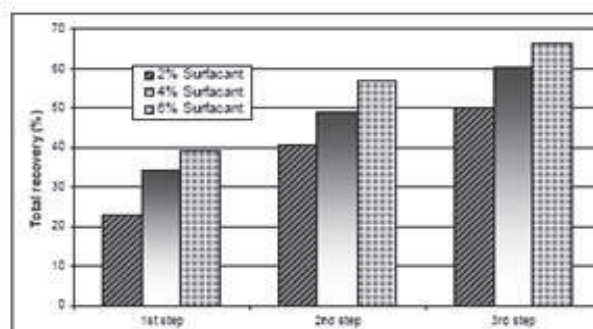


Figure 2. The investigation of surfactant concentration from 2%, 4% and 6% respectively in 3 stages of recovery

The application of Triton X-114 can successively use for phenol compounds extraction in aqua medium and even can extract Luteonin, Apigenin and p-Coumaric acid with 96% efficiency (12).

Conclusion

Cloud point extraction is a strong analyzing method in improving of determination level and detection of met-

als analyzing, contaminants, and biological molecules. Applying micell system cause concentration factor thus resulting in increasing of efficiency. This method is also affordable with wide range of demanding and the possibility of metal evaluation in ng levels like determination of ions in water.

References

1. **R. C. Mart'inez, E. R. Gonzalo, B. Cordero, J.L. Pavo'n, C. Pinto, E. Laespada**, Surfactant cloud point extraction and preconcentration of organic compounds prior to chromatography and capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 902 (2000) 251-265.
2. **H. Filik, S. Cekiç** (2011). Cloud Point Extraction of Pesticide Residues, *Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis*, Dr. Margarita Stoytcheva (Ed.), ISBN: 978-953-307-437-5.
3. **M. S. Noorashikin, S. Mohamad & M. R. B. Abas** (2013): Cloud Point Extraction (CPE) of Parabens Using Nonionic Surfactant Phase Separation, *Separation Science and Technology*, DOI:10.1080/01496395.2012.756034.
4. **Y.C. Liao, O. A. Basaran, E. I. Franses**, Micellar Dissolution and Diffusion Effects on Adsorption Dynamics of Surfactants, *AIChE Journal*, 49 (2003) 3239-3240
5. **M. Moradi, Y. Yamini**. Surfactant roles in modern sample preparation techniques: A review, *J. Sep. Sci.* 2012, 35, 2319-2340
6. T. Dwars, E. Paetzold, G. Oehme, *Reactions in Micellar Systems*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 7174-7199.
7. **P. G. Mazzola, A. M. Lopes, F. A. Hasmann, A. F. Jozala, T. Penna, P. O. Magalhaes, C. O. Yagui, A. Pessoa**, Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques, *J Chem Technol Biotechnol* 83, 2008; 143-157 (2008).
8. **M. F. Silva, E. S. Cerutti, L D. Martinez**, Coupling Cloud Point Extraction to Instrumental Detection Systems for Metal Analysis, *Microchim Acta* (2006)155, 349-364.
9. **B. Ojeda, F. S. Rojas**, Separation and preconcentration by a cloud point extraction procedure for determination of metals: an overview, *Anal Bioanal Chem* 2009; 394:759-782.
10. **T. Ingram, S. Storm, P. Glembin, S. Bendt, D. Huber, T. Mehling, I. Smirnova**, Aqueous Surfactant Two-Phase Systems for the Continuous Countercurrent Cloud Point Extraction, *Chemie Ingenieur Technik*, 84, 2012; 840-848.
11. **A. Lopes, J. Garcia, R. Catharin, L. Santos, M. Eberlin, M. Arruda**, Cloud point extraction applied to casein proteins of cow milk and their identification by mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 590 (2007); 166-172.
12. **E. Katsoyannos, A. Chatzilazarou, O. Gortzi, S. Lalas, S. Konteles, Pa Tataridis**, Application of cloud point extraction using surfactants in the isolation of physical antioxidants (phenols) from olive mill wastewater, *Fresenius Environmental Bulletin*, 15 (2006); 1122-1125.

Поступила в редакцию: 02.09.2014 г.

Saman Azizizadeh - Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran, samanazizizadeh2172@gmail.com

УДК 663.052

Alireza Keshavarzian¹, Mohammad Hojjatoleslami*¹, Hooman Moulavi¹, Saeed Sekhavatizadeh², Abbas Esmaeili¹, Mohammad Ali Shariati³

1. Department of Food Science and Technology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2. College of Applied Science and Technology, Jahade Keshavarzi University, Shiraz, Iran

3. Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

*Corresponding author e-mail: mohojjat@iaushk.ac.ir

MICROENCAPSULATION OF PROBIOTIC BACTERIA BY SODIUM ALGINATE AND INVESTIGATION IN BATTER OF PROBIOTIC WAFER

(Микроинкапсулирование пробиотических бактерий на альгинате натрия и изучение их в тесте для пробиотических вафель)

Abstract

Today, probiotic foods as processed foods include sufficiently probiotic bacteria used to promote and provoke lactose digestion, calcium absorption, vitamin synthesis and immune system of body, reducing blood cholesterol, preventing different cancers specially colon cancer. The target of this study was to investigate the encapsulation of probiotic bacteria with dominant variety called *L. Casei* and their viability in wafer cream. The culture activated at 37°C, then bacteria precipitation prepared by centrifuge, finally encapsulated by sodium alginate and sodium chloride in order to improve their resistance to acidic conditions. Encapsulated bacteria in sufficient amount added to the wafer formulation (10⁷ cell/ml). Provided cream kept 6 weeks. After finishing storing time, seeds dissolved in MRS citrate agar to separate completely then cultured in media to calculate their population. Results revealed that encapsulated bacteria showed more sustainability than free bacteria.

Key words: Wafer Cream, Probiotic Bacteria, Encapsulation, Sodium Alginate, *Lactobacillus Casei*

В настоящее время пробиотические продукты как обработанные пищевые продукты включают пробиотические бактерии, используемые в целях стимуляции переваривания лактозы, всасывания кальция, синтеза витаминов и иммунной системы организма, в результате чего снижается уровень холестерина в крови, предотвращая заболеваемость различными видами рака, в том числе рака толстой кишки. Целью данного исследования было изучение инкапсуляции пробиотических бактерий с общепринятым названием *L. Casei* и их жизнеспособности в вафельном креме. Культуры активировались при 37°C, затем осадок бактерий получали путем центрифугирования, на заключительном этапе проходила инкапсуляция бактерий альгинатом натрия и хлоридом натрия, чтобы улучшить их устойчивость к кислой среде. Инкапсулированные бактерии добавляли в вафельное тесто (10⁷ cell/ml). Полученный крем хранился 6 недель. После окончания времени хранения, полученную массу растворяли в MRS-цитрате агара и вычисляли численность популяции бактерий. Результаты показали, что инкапсулированные бактерии были более устойчивыми, чем обычные бактерии.

Ключевые слова: вафельного крема, пробиотические бактерии, инкапсуляции, альгинат натрия, *Lactobacillus Casei*.

Introduction

The positive role of bacteria in human's health introduced 1st time by a Russian scientist named Metchnikov in the beginning of the 20th century. He believed that improving of intestine micro flora is possible by prescription of desirable bacteria (Piaho et al, 2012). Regarding his theory in fermented dairy products, appropriate bacteria competes with undesirable pathogens. He also investigates the micro flora of intestine and found that aging process is due to some compounds produced by intestine bacteria. Probiotic bacteria define as live micro organism which play functional roles in human's health (Najmeh and Shiva, 2011).

The importance using of probiotic bacteria is to improve lactose digestion, promoting calcium absorption, vitamin and protein synthesis, immune system, reduction of blood cholesterol, preventing of different kind of can-

cers, decreasing allergic symptoms, adjustment of blood pressure, and treatment of cardiovascular disease and increasing of nutritional value (Piaho et al, 2012; Marhamatizadeh et al, 2010; Aghajani et al, 2011 and Capelaa et al, 2007) of probiotic bacteria occur after their placement in different parts of body and their biological activity, hence this product classifies as functional food. It is thought that the sufficient bacteria must be present in order to carry probiotic affections on the body (Milan et al, 2011)

Probiotic bacteria inhibit the growth of pathogens through organic acid production and other anti microbial compounds (Moyano et al, 2008).

Today, clinical studies have reported the probiotic affections in curing of systemic diseases. The dominant of undesirable bacteria not only result in reduction of essential compounds production but increase the production of harmful compounds therefore the consumption of 100g of

probiotic product including 10^6 - 10^8 live bacteria per gram of production can supply the considered optimized level (Taheri et al, 2010; Bengmark, 1998; Bergamini et al, 2005; Helland et al, 2004).

Mostly used probiotic products which have consumed have not exhibited side effects up to now (Khalkhali et al, 2009). Encapsulation of Probiotic cells is one of the novel methods of increasing shelf life of probiotics in order to transfer them through colon. The less amount of probiotic obtaining in difficult conditions such as bile acids has almost always have provoked scientist to find methods of improving this item.

Encapsulation may consider as one of the newest method in obtaining probiotic in conditions such as bile acids. Mostly, livability of probiotic cells in products like confectionary and their reproduction follow a gently rate due to the condition of low water activity in cereal products and confectionaries. Probiotics have injected to non dairy products such as sausages, chocolate, infant food, bread and mayonnaise (Mirzaei et al, 2013).

Encapsulation techniques are foodstuffs, enzymes, cells etc in especial capsules with the size of μm - mm . Encapsulation also uses as a method of flavor and taste covering which effects on organoleptic properties. Along with protecting affections of encapsulation, this method can consider as a promoter of flow properties and transferring of compounds. Gum, sugar protein, natural or modified poly saccharides are using in the capsule walls. Encapsulated compounds consider as inner core which can be in 3 liquid, gas and solid form, mostly liquid (Niazmand et al, 2006). From the viewpoint of microbiology, encapsulation defines as covering of a layer of hydrocolloid around microorganism cells and entrapping them to increase their shelf life. Overall the main goal of encapsulation is increasing the shelf life of probiotics along with the transforming possibility and safe releases of them in appropriate points of digesting system (Mirzaei et al, 2013). Alginates extracted from sea algae and create a hard structure in combination with calcium chloride. Calcium alginate is a non toxic compound with low cost in encapsulation and their gels are producing in presence of monovalent ions And chelating agent of calcium including phosphates, lactates and citrates results in destruction of alginate capsule (Khosravi Zanjani et al, 2013).

Alginates, non digestible compounds with no nutritional value, have a wide range of physiochemical properties. They are non toxic materials and find in soluble salt. Alginate with monovalent metal is in soluble salt form. While in the presence of double and triple valent ions like Ca^{2+} create non soluble gel.

Alginate gel is non melt able and irreversible. These gels are formed from mixing of alginate and suitable salt (often calcium) or ion exchange with basic metals such as sodium form to liquid. The reason of forming this gel is binding of hydroxyl group with bonded side carboxyl group of and some extent fill the hole between parallel chains of G block. This arrangement calls egg box model (Alborzi, 2012).

Recent advances in encapsulation can be helpful in both industrial and non industrial goals about shelf life of probiotics in product and their maintenance in digestion

systems and their affections on the body (Mirzaei et al, 2012).

Material and method

Activation and separation of probiotic bacteria

First, probiotic bacteria produced by E.S.M Co, Australia in powder form containing dominant variety named *L. Casei* carried to liquid lactose (Merck Co, Germany) in order to activating, the aforesaid materials incubated in incubator (produced by Nuve Co model, EN-055, Turkey) at 37°C for 48 hr. then to separate bacteria and reaching bacteria precipitation, tubes containing activated bacteria centrifuged with 6000rpm for 10 min, then its supernatant removed and the bacteria which is precipitated washed (Capelaa et al, 2007; Kazemi Gorgi, 2012; P'erez Guerra et al, 2007; P'erez Guerra et al, 2000). By diluted water and centrifuged again then kept at 4°C (Capelaa et al, 2007; Kazemi Gorgi, 2012; P'erez Guerra, 2007; P'erez Guerra et al, 2007).

Encapsulation using sodium alginate

All containers sterilized and autoclaved at 121°C for 15 min, then 3g of sodium alginate (Applichem, Germany) added to a beaker containing 100 ml distilled water and mixed with a magnet with 200rpm up to complete solution of sodium alginate in distilled water, then in order to uptake of sodium alginate, kept one night in refrigerator, besides 11.099g of sodium chloride dissolved in 100 ml of distilled water then 80 ml of it added to a flask 100ml and mixed with a magnet up to complete solution in distilled water Then 80 ml of it added to flask 100 ml and 10 ml of microbial suspension (containing at least 10^7 - 10^9 CFU/ml) added to it, distilled water added and the volume reached to 100 ml, mixed well for 5 min. in next stage 199 ml rapeseed oil poured in beaker 200ml, 1g of Tnue (emulsifier), then mixed with magnet for 5 min to produce a creamy color emulsion, rate adjusted at 750 rpm and 50 ml of mixture of alginate-bacteria carried to oil containing emulsifier by pipette, mixed 20 min. In next stage a solution of calcium chloride 0.1M poured in burette. Calcium chloride solution added gently to beaker containing alginate-bacteria mixture (mixture rate adjusted on 100 rpm) to create seeds, and then allow precipitating of seeds for 30 min, centrifuged with 350g for 15 min and kept at 4°C . (Capelaa et al, 2007; Alborzi, 2012; P'erez Guerra, 2007; P'erez Guerra et al, 2007).

The number of initial encapsulated bacteria

0.1 g of microcapsules weighed and poured in 10 ml sodium citrate and allowed to separate in ambient temperature, then shook the mixture and diluted to dilution of 10^{-7} , cultured in MRS agar and incubated for 48 hr. Resulted colonies counted by colony counter model Funke Gerb, Switzerland and found that 2.3×10^5 FU/ml in 0.1 g of microcapsule (AOAC, 2002).

To each treatment, 3 g of encapsulated bacteria and to control 3 g non encapsulated bacteria added. To provide

wafer cream (batter), date syrup concentrated and wafer produced as follows.

Preparation of batter

To provide batter, ingredients including oil 17%, sugar 47 %, inulin 15%, encapsulated probiotic bacteria with sodium alginate 0.5%, dry milk 1.5 %, water 17% and salt 2 % added to the mixer base on recipe. Sugar must used in powder form to mixed well and texture become soft. Mixing last to create a uniform cream finally treatment produced.

Microbial experiments

The number of probiotic bacteria

Culture media of MRS agar was experimented base on National Iran Standard N.O. 365 with 3 replications. MRS agar (Merck Co, Germany) purchased and prepared base on its instruction present on the label, 100g of prepared probiotic bacteria weighed and dissolved in 45 ml sodium citrate 2% and shook 20 min to completely separation of capsules, then required dilution provided so that 1 ml of probiotic bacteria solution added to 9 ml sterile peptone water and pour plated in 3 replications in MRS agar culture media, then cultures incubated at 37°C for 72 hr. resulted colonies counted by colony counter. The acceptable amount of probiotic in 100 g of foodstuffs is 10^6 live cells (AOAC, 2002).

Conclusion and discussion

The results of microbial experiments have shown in table 1. Results exhibit more than 300 colonies found in MRS agar cultured in dilution of 10^{-1} - 10^{-2} and more. Re-

sults also displayed that the number of colonies was less than 30 in dilution range of 10^{-6} - 10^{-7} . The number of colonies were 182.5, 79.5 and 36.5 in dilution of 10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5} respectively.

On the other hand the number of probiotic bacteria in dilution of 10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5} were 1.83×10^5 , 7.95×10^5 and 3.65×10^5 respectively, besides no bacterial growth found after 6 weeks in MRS agar culture media. Comparing the results related to both non encapsulated and encapsulated bacteria, the prolongation of later revealed which was due to

calcium alginate gel to stomach acid as protective factor. Encapsulation also causes to separate bacteria from outer surrounding medium and increasing livability of cells. These results are in agreement with Khosravi et al findings (2013). Therefore adding probiotic bacteria to batter can be performed by their encapsulation with sodium alginate. In another study the affection of simulated conditions of intestine investigated. Results revealed more obtaining of encapsulated bacteria (Milani et al, 2011). It must be noted that control cultured in MRS agar after 6 weeks, however no growth observed.

Conclusion

Results revealed that encapsulation of probiotic bacteria results in increasing of livability in comparison with non encapsulated bacteria in wafer batter. The remained number of encapsulated probiotic bacteria after 6 weeks of storage at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ was in the permitted level for human's health, i.e. 10^6 per g. this was due to resistance of calcium alginate to stomach acid. Sodium alginate is a resistant compound in presence of stomach acid.

Table 1. Results of microbial experiment in MRS agar after 6 weeks

Treatment concentration	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Control	≥ 300	≥ 300	182.5	79.5	36.5	≤ 30	Not seen
25 % date juice	≥ 300	≥ 300	130	50	≤ 30	≤ 30	Not seen
50 % date juice	≥ 300	≥ 300	165	59	39.5	≤ 30	Not seen
75 % date juice	≥ 300	≥ 300	200	32	≤ 30	≤ 30	Not seen
100 % date juice	≥ 300	≥ 300	131	76	51	≤ 30	Not seen

And act as a protective cover and protect the entrapped bacteria via separation of them from outer medium and increasing livability of bacteria.

Acknowledgement

Authors would like to thank Mrs. Farzaneh Zeinolabedini, Biology Graduated and all people who supports us in this study.

References

1. Piahoo, L. Akbarzadeh, F. Ghalibaf, M. and Homayonirad, A. Reduction of serum cholesterol level using probiotic bacteria: A new approach in prevention of cardiovascular diseases. *Arak Medical University Journal*. 2012; 15: 69. 33-42.
2. Marhamatizadeh, M. Rasekh, A. Rezazadeh, S. and Kazemi, M. Honey yogurt as Career of Bifido bacterium Bifidium. *Journal of Pathology*. 2010; 1: 2. 13-40.
3. Najmeh, A. and Shiva, M. Role of probiotics in orodental health. *Journal of Isfahan Dental School*. 2011; 2:7. 187- 199.
4. Aghajani, A. R. Pourahmad, R. and Mahdavi Adeli, H. R. The Effect of Prebiotics on Probiotic

- Yogurt Containing *Lactobacillus casei*. *Food Technology and Nutrition*. 2011; 4: 8. 73-82.
5. **Capelaa, T.K.C. Hayb, N. P. Shah.** Effect of homogenisation on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. *Food Research International*. 2007; 40: 1261-1269.
 6. **Milani, E. Baghaei, H. and Mortazavi, S.A.** Evaluation of Dates Syrup and Guar Gum Addition on Physicochemical, Viscosity & Textural Properties of Low Fat Orange Yog-Ice Cream. *Journal OF Food Science and Technology*. 2011; 7: 2. 115-120.
 7. **Moyano, S. R. Martín, A., José Benito, M., Nevado, F. P. and Córdoba, M. G.** Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science*. 2008; 80:715-721.
 8. **Taheri, P. Ehsani, M. and Khosravi Darani, K.** Effect Of probiotic bacteria *Lactobacillus Acidophilus* La5 on microbiological, organoleptic properties and texture stability of probiotic Dogh during storage. 2010; 4:3. 15-24.
 9. **Bengmark, S.** Role of Biosurfactants Fiber and Probiotic Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 1998;14:585-594.
 10. **Bergamini, C.V. Hynes, E.R. Quiberoni, A., Sua'rez, V.B., and Zalazar, C.A.** Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. *Food Research International*. 2005; 38: 597-604.
 11. **Helland, M.H. Wicklund, T. and Narvhus, J.A.** Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in maize porridge with added malted barley. *International Journal of Food Microbiology*. 2004; 91:305-313.
 12. **Khalkhali, S. Fazeli, M. Noroozi, J. and Salehi, M.** 2009. Enrichment of beverages with *Lactobacillus*. *Microbiological Journal*. 1: 1. 59-63.
 13. **Mirzaei, H. pourjafar, H. Homayouni Rad, A.** 2012. The effect of microencapsulation with Calcium Alginate and resistant starch on the *Lactobacillus Acidophilus* (La5) survival rate in simulated gastrointestinal juice conditions. *Journal of Vet. Res* .2011; 66:4. 337-342.
 14. **Niazmand, R. Arabpouriani, N. Doaci, A . Niazmand, A. and Sarabi Jamab, M.** Effect of yogurt enriched with *Bifidobacterium bifidum* or *Lactobacillus acidophilus* on fatty metabolites of serum and colonic microflora in healthy subjects. *Journal of food science and nutrition*. 2006; 8: 4. 1-10.
 15. **Khosravi Zanjani, M. Ghiasi Tarzi, B. Sharifian, A. Mohammadi, N. and Bakhoda, H.** Assess the viability of encapsulated *Bifidobacterium Bifidium* nourishing cream cake based on water. *Journal of Food Technology and Nutrition*. 2013; 1: 3. 29-38.
 16. **Alborzi, S.** Encapsulation of Folic Acid in Sodium Alginate-Pectin-Poly (Ethylene Oxide) Electrospun Fibers to Increase Its Stability. Guelph, Ontario, Canada. 2012; 12-39.
 17. **Kazemi Gorgi, M.** Effect of microencapsulation on stability of *Lactobacillus Plantarom* in ice cream. Master's thesis. Islamic Azad University. Shahrekurd branch. 2012; 1-127.
 18. **P'erez Guerra, N. Bern'ardez, P. F. M'endez, J. Cachaldora, P. and Pastrana, L. C.** Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology*. 2007; 134: 89-107.
 19. **P'erez Guerra, K. Godward, G. Reynolds , N. Arumugaswamy, R. Peiris, P. and Kailasapathy, K.** *International Journal of Food Microbiology*. 2000; 62: 47-55.
 20. **AOAC** Official Methods of Analysis, 17th ed; 2002.

Поступила в редакцию: 10.09.2014 г.

Alireza Keshavarzian - Department of Food Science and Technology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Iran, e-mail: mohojjat@iaushk.ac.ir

УДК 664.9.03

Saman Azizizadeh¹, Mohammadyar Hosseini*¹, Somayeh Aziznia², Mohammad Ali Shariati³

1. Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
samanazizizadeh2172@gmail.com

2. Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran.

3. Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

* **Corresponding author email: hosseini1701@gmail.com**

**BIODEGRADABLE PACKAGES;
GOOD REPLACER OF SYNTHESIZED PACKAGES FROM OIL COMPOUNDS**
(Биоразлагаемые пакеты – заменитель синтезированных пакетов из нефтяных соединений)

Abstract

In recent years, using of biodegradable materials instead of synthetic oil materials has been growingly increased with no non biodegradation and non recycling properties of oil compounds. These biopolymer materials produce through interactions in animals, plants and microorganism. In this study we have reviewed the advantages and disadvantages of biopolymers and their production in details.

Key words: biopolymer, packaging, biodegradability, film.

В последние годы взамен синтетическим материалам имеет тенденцию к увеличению использование биоразлагаемых материалов, не являющихся продуктами переработки соединений нефти. Эти биополимерные материалы производятся посредством использования животных, растений и микроорганизмов. В данном исследовании рассмотрены преимущества и недостатки биополимеров, а также их производство в деталях.

Ключевые слова: биополимер, упаковка, биоразлагаемость, пленка.

Introduction

Almost nearly all of the daily purchased products contain packaging and their packing is due to keeping products from possible physical damages and contamination, identification of products, information about products, optimizing of distribution costs and preparation of more convenient for consumers (1).

The main part of produced packages product are related to foodstuffs in the world. Films categorizes as one of the packaging materials. A suitable film must satisfy the requirements:

- Providing calm and controlled respiration for product.
- Providing the possibility of specific inhibition for carbon dioxide and steam.
- Creating modified atmosphere in order to adjust the respiration and improving shelf life.
- Reduction of fat migration (in confectionary products).
- Keeping the structure of foodstuffs from mechanical damages.
- Carrier of additives such as flavor, color, antioxidant, anti microbial etc.
- Preventing or reduction of microbial spoilage when storage.
- Keeping of moisture of foodstuffs and prevent from removing oxygen and aroma (2,3,4 and 5)

The disadvantages of using of synthetic plastic from oil compounds

Annually, more than 150 million ton derived synthetic plastic produced in which the most part is disposable plastics (6). Packages used in industries include two third of all packaging trashes (7).

Using of derived plastic from oil compounds like poly olefins, poly esters, poly amids etc has been growingly increased as a result of availability, low price, and low weight, appropriate functional properties (expandability, resistant to tear, inhibition properties and high heat resistance) in recent 20 years. Reversely, these compounds contain lower steam penetration rate than water and are hydrophobic therefore biodegradability is their main challenge. Food packaging must degrade with no remained waste in a reasonable certain time (5).

Most plastics derived from oil compounds are resistance to biological attacks as a result of not being present of decomposing enzyme by microorganisms, besides their hydrophobic nature prevent enzyme activities. Biodegradability starts when microorganism begins growth on polymer surface and release polymer decomposing enzymes. This reaction depends on lots of parameters including microorganism activity, surface polymer ratio, Temperature, pH, molecular weight of polymer and its crystals state (1).

Keeping and storing of plastic waste in ground require a wide range of ground, burning them also releases carbon dioxide and may not consider a good way. Hence their remained wastes result in the pollution of environ-

ment (2, 7, 8, 9, 10, and 11). Moreover using of hard polymers in short term packaging is not of being appropriate (12).

Biodegradable packaging Biodegradability

The problem of waste material has been resulted in focusing of scientists on the production of biodegradable packages, the materials degrade quickly in nature, mineralize and absorb.

Biodegradability is a natural processing where organic compounds decompose to more simple products like carbon, nitrogen and sulfur (13).

Base on ASTM 6400-9 definition, biodegradable term refers to materials which produce by bacteria, yeasts, fungi, algae in aerobic, water and carbon dioxide and methane condition. Compost-able plastics convert to water, carbon dioxide and non organic materials and don't remain toxic waste.

Biopolymers; good replacer of synthetic polymers

Since biopolymers have no problem of remained waste like plastics and classified as biodegradable may consider as good replacer of derived synthetic polymers from oil materials. They are a part of ecosystem (6, 18).

Biopolymers are polymers produced through the biochemical interaction in animals, plants and microorganism in nature. Biodegradable polymers categorized in 4 groups;

- Agro polymers (poly saccharide) derive from biomass such as starch, cellulose, protein
- Polymers such as poly hydroxyl alconate (PHA) produced from microorganism activity
- Synthetic polymers of monomers came from recycled sources such as poly lactic acid (PLA) made from lactid
- Polymers produced from monomer of fossils origins but degradable by enzymes such as poly prolacton (PCL), poly ester amide (PEA), Co polyester aromatic or aliphatic (6, 19).

Suitable bio polymers must include characteristics such as strong, appropriate flexibility, non toxic, non penetrate to oxygen, resistant to wet penetration and low cost of raw material and processing (10).

The advantages of biopolymers in comparison with synthetic polymers are biodegradability and recycling. However weak mechanical properties and inhibition to steam limit their application in industries.

Polysaccharides are appropriate inhibitors for gas, aroma and fat. They also good inhibitor of oxygen in low and medium relative humidity and exhibits good mechanical properties in this range of relative humidity. However their inhibition is weak as a result of their hydrophilic nature (4, 20).

Different groups of biopolymers such as polysaccharides and proteins (zein and gluten) and lignin are available where polysaccharides such as cellulose, starch are the most of them (12).

Properties and defects of biodegradable polymers

Mostly biodegradable polymers contain excellent properties in comparison with derived plastic from oil compounds and will be compete able with plastic goods.

Thus biodegradable polymers have a high potential in commercializing and forming to bioplastics. But some properties such as high penetrate ability of steam, crashing restrict their applications in wide range. Therefore their modification seems essential (13).

Providing film methods

Biopolymers film is a three dimensional matrix which produces by two dry and wet methods (4).

Dry method

This method is base on thermoplastic process of some biopolymers. In this method biopolymers heat up to more than glass transition temperature in low wet by extrusion or thermo compression method. This heating cause to soften polymers and let them to change their form after cooling. The drying process usually applies for pre preparation of biomaterial, thermoplastic starch and proteins. In this method other processes such as extrusion, molding. However this method needs lots of equipment, this method has some advantages in comparison with wet process including being more industrial like process, producing a matrix with high wide linkages and reduction of produced film solution (4).

Wet process

This method commonly known as solvent casting and basically refers to drying of prepared solution from polymer. This method is the most usual way of film production including stages of solving, casting and drying. First stage is the preparing film solution by dissolving of biopolymer in an appropriate solvent like water, alcohol or organic alcohol. However appropriate solvent of food-stuffs like water, ethanol or mixture of both uses in production of edible film. Nest stage is the drying of solution. In production of an integrate film, the strong interaction between biopolymers in creating of a 3 dimensional critical integrate matrix is an obligation. The type and amount of interactions differ from polymer type, film production conditions, Drying Temperature, drying rate, moisture content, solvent type, softening concentration, different pH. Casting solvent method mostly applied for providing of biopolymer films (4, 21).

Conclusion

Since biopolymers have no problem of waste remained from plastic material and consider biodegradable may be suitable replacement of oil compounds. They also won't cause of carbon dioxide accumulation after carbon cycle and are of a part of ecosystem. The advantages of biopolymers in comparison with synthetic polymers are being their biodegradability and recycling.

References

- 1) **Davis, G., Song, J. H.** Biodegradable packaging based on raw materials from crops and their impact on waste management. *Industrial Crops and Products*, 2006; 23, 147-161.
- 2) **Tharanathan, R. N.** Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, 2003; 14, 71-78.
- 3) **Tang, X.** Use of extrusion for synthesis of starch clay nanocomposites for biodegradable packaging films. Thesis for degree of philosophy doctor. 2008.
- 4) **Whan Rhim, J.** Natural biopolymer based nanocomposite films for packaging applications. *Food Science and Nutrition*, 2007; 47, 411-433.
- 5) **Kalambur, S, Rizvi, S. S. H.,** An overview of starch based plastic blends from reactive extrusion. *Journal of Plastic film and sheeting*, 2006; 22, 39-58.
- 6) **Takahashi, Y.** Cellulose nanoparticles: a route from renewable resources to biodegradable nanocomposites. Thesis for degree of philosophy doctor. 2007.
- 7) **Kumar, P.** Development of bio nanocomposite films with enhanced mechanical and barrier properties using extrusion processing. Thesis for degree of philosophy doctor. 2009.
- 8) **Ghanbarzadeh, B., Oromiehie, A. R.** Studies on glass transition temperature of mono and bilayer protein films plasticized by glycerol and olive oil. *Journal of Applied Polymer Science*, 2008; 109, 2848-2854.
- 9) **Cao, X., Chen, Y., Chang, P. R., Stumborg, M.** Huneault, M. A., Green composites reinforced with hemp nanocrystals in plasticized starch. *Journal of Applied Polymer Science*, 2008; 109, 3804-3810.
- 10) **Sudesh, K., Iwata, T.** Sustainability of biobased and biodegradable plastics (review) . *Clean Journal*, 2008; 5-6, 433-442.
- 11) **Goetz, L., Mathew, A., Oksman, K., Gatenholm, P., Ragauskas, A. J.** A novel nanocomposite film prepared from crosslinked cellulosic whiskers. *Carbohydrate Polymers*, 2009; 75, 85-89.
- 12) **Averous, L., Halley, P. J.** Biocomposites based on plasticized starch. *Biofuels Bioproducts & Biorefining*, 2009; 3, 329-343.
- 13) **Okamoto, M.** Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: A review. *Handbook of biodegradable polymeric materials and their applications*, 2005; 1, 1-45.
- 17) **Avella, M., Vlieger, J. D., Errico, M. E., Fischer, S., Vacca, P., Volpe, M. G.** Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food Chemistry*, 2005; 93, 467-474.
- 18) **Bondeson, D.,** Biopolymer-based nanocomposites: processing and properties. Thesis for degree of philosophy doctor. 2007.
- 19) **Chivrac, F., Pollet, E., Averous, L.** Progress in nano biocomposites based on polysaccharides and nanoclays. *Material Science and Engineering R*, 2009; 67, 1-17.
- 20) **Khwaldia, Kh, Arab-Tehrani, E., Desorby, S.** Biopolymer coatings on paper packaging materials. *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY*, 2010; 9, 82-91.
- 21) **Liu, D., Zhong, T., Chang, P. R., Li, K., Wu, Q.** Starch composites reinforced by bamboo cellulose crystals. *Bioresource Technology* , 2010; 101, 2529-2536.

Поступила в редакцию: 02.09.2014 г.

Saman Azizizadeh - Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran, samanazizizadeh2172@gmail.com

Требования к публикациям в журнале

В журнале публикуются материалы оригинальных завершённых научных исследований по следующим направлениям: селекция и генетика животных, селекция и генетика растений, биотехнология в животноводстве и растениеводстве, воспроизводство сельскохозяйственных животных, физиология сельскохозяйственных животных и растений, молекулярная биология, иммуногенетика, цитогенетика, популяционная генетика, биохимия, биофизика, радиобиология, иммунология, биоэтика и пр. В статьях могут рассматриваться проблемы интродукции, адаптации и акклиматизации животных, генетические основы селекции, оптимизации генетико-статистических параметров, биологические проблемы разведения животных в локальных популяциях, проблемы инбридинга и гетерозиса, изучение структуры и динамики генетической изменчивости селекционных признаков, фундаментальные и частные вопросы отбора и подбора, селекция по генам, вопросы регуляции метаболизма и продуктивности, микробиологии пищеварительного тракта, клеточной и геномной инженерии, биологические основы сохранения генофонда, гуманности биологических экспериментов и экологичности интенсивных технологий производства, а также многие другие вопросы, прямо или косвенно лежащие в сфере биологических проблем сельского хозяйства. С особой благодарностью редакция принимает на рассмотрение материалы о проблемах сохранения генофонда сельскохозяйственных животных и растений. Статьи, присылаемые в редакцию, могут быть посвящены любым отраслям продуктивного и отдельным отраслям непродуктивного животноводства (включая пчеловодство, рыбоводство, кролиководство, коневодство, нетрадиционное птицеводство и звероводство). При предоставлении в редакцию материалов статей о нетрадиционной или экзотической отрасли, связанной с сельским хозяйством, в введении следует особо подчеркнуть её значение для АПК. Редакция не принимает статьи по разведению или генетике собак, кошек, крыс, мышей, мелких или диких животных, не применяющихся в схемах гибридизации с сельскохозяйственными животными, а также о растениях, не имеющих значения для селекции или обогащения генофонда культурного растениеводства. В редакцию могут поступать статьи по биологическим проблемам селекции зернобобовых, бахчевых, плодово-ягодных и прочих культур (гороха, нута, чечевицы, смородины, малины, картофеля, томатов, капусты, моркови и т. п.), однако материалы статей должны соответствовать паспортам специальностей по биологическим наукам.

Редакционная коллегия журнала «Биология в сельском хозяйстве» просит авторов при подготовке рукописи к печати руководствоваться следующими правилами.

1. Оформление рукописи:

Статья должна быть представлена в электронном виде (на диске и по электронной почте) и, обязательно, в виде распечатанной на принтере копии на одной стороне листа бумаги формата А4. Электронная версия записывается в редакторе MS Word в форматах *.doc или *.rtf. Имя файла должно содержать фамилию первого автора и первые 2 слова названия статьи. Межстрочный интервал – одинарный. Поля – сверху, справа, слева – 2,0; снизу – 2,5 см. Страницы должны иметь сквозную нумерацию, необходимо установить автоматический перенос. **Рукописи должны быть тщательно выверены и отредактированы авторами!** При этом материал должен быть изложен ясно и последовательно, *научным стилем*. Редакция принимает материалы на русском или английском языках.

Объём рукописи (включая таблицы, список литературы, подписи к рисункам, рисунки) не должен превышать 20 стр. для обзорных статей, для информационных публикаций и рецензий – 1-3 стр. Рекомендуемый объём статей – 8-10 страниц, не менее 20 источников, ссылки на которые устанавливаются в квадратных скобках, с указанием страниц цитируемого текста. **По согласованию с редактором объём статьи может быть уменьшен.** Объём рисунков не должен превышать 1/3 объёма статьи. **Качество изображений должно соответствовать требованиям чёрно-белой печати** (чёрно-белые рисунки внедряются в документ как объекты, градация в диаграмме должна быть выражена чётко, для этого можно использовать различные виды штриховки). На усмотрение редакции рукописи присылаемых статей могут быть проверены в системе антиплагиат. Мнение авторов статей может не совпадать с мнением редакционной коллегии и главного редактора. В случае неэтичного цитирования или критики, не соответствующей требованиям профессиональной и научной этики, статья может быть отклонена редакцией.

Общий порядок расположения частей статьи:

- УДК (10 шрифт) в левом верхнем углу (следует указывать правильно и подробно, согласно направлениям исследований).
- Инициалы, фамилия автора, учёная степень, звание, должность (10 шрифт, жирный) на русском языке, ниже – на английском, с указанием номера телефона и электронного адреса каждого автора;
- Место работы (10 шрифт, жирный) на русском и английском языках;
- Страна, город на русском и английском языках;
- Название статьи (10 шрифт, жирный, прописные буквы), ниже – строчными буквами на английском языке;
- Аннотация на русском и английском языках (10 шрифт, объём не менее 10 и не более 25 строк), располагается в две колонки по 8,25 см., слева на русском, справа на английском языке). В случае подготовки

статьи иностранным автором на английском языке желательна аннотация на русском языке. При составлении ключевых слов к статье следует ориентироваться на **AGROVOC** - основной информационно-поисковый язык Международной информационной системы по сельскохозяйственной науке и технологиям **AGRIS** (<http://aims.fao.org/website/AGROVOC/sub>).

○ Ключевые слова на русском и английском языках (располагается в две колонки по 8,25 см., слева на русском, справа на английском языке).

○ Текст статьи (10 шрифт) располагается в две колонки (по 8,25 см), расстояние между колонками 0,5 см. В статьях экспериментального характера должны быть разделы:

Введение (без заголовка). В данном разделе автору необходимо подробно изложить существующие проблемы и актуальность направлений исследований, не допускается копирование больших фрагментов текста из цитируемой литературы, введение должно излагаться собственным языком с указанием библиографии, не допускается цитирование литературы, отсутствующей в библиографическом списке. Если существует необходимость дать развернутый анализ состояния направления исследований, после введения может быть дополнен раздел **Теоретический обзор направлений исследований** (2-3 стр.). В введении или теоретическом обзоре желательно сделать обобщения по вопросам, которые будут изложены в материалах и методах исследований, а также в результатах и их обсуждении.

Материалы и методы исследований. В данном разделе следует указать, где и в какое время проводились исследования, какое оборудование и приборная база применялись для проведения исследований. Необходимо пользоваться современными методами анализа и статистической обработки данных. Особое внимание следует обращать на редактирование формул и написание названия препаратов, химических соединений, учреждений, пород, линий, типов животных, бактерий, латинских названий растений и т. п. В данном разделе не должны приводиться методы, которые впоследствии не встречаются в результатах и их обсуждении. Формулы должны иметь доступный вид, с указанием всех необходимых коэффициентов и символов. Например:

$$r_{L_j} = \sqrt{REL} = \sqrt{\frac{w}{w + \lambda}} = \sqrt{\frac{w}{w + \frac{4 - h^2}{h^2}}} = \sqrt{\frac{\frac{n \cdot m}{n + m}}{\frac{n \cdot m}{n + m} + \frac{4 - h^2}{h^2}}}$$

В материалах и методах следует приводить ссылки на библиографические источники, в которых изложены современные методы исследований. Классические методы исследований (критерий Стьюдента, дисперсионный анализ, корреляционно-регрессионный анализ и пр.) подробного описания не требуют, ссылки необходимы только на редко используемые классические методы генетико-статистического и пр. анализа. При статистическом анализе полученных данных желательно использовать современные компьютерные пакеты **Statistica**.

Результаты и их обсуждение. Данный раздел требует особого внимания при анализе табличного материала. Не следует допускать несоответствия текста табличным данным или рисункам, а также материалам и методам исследований.

Заголовки разделов следует выравнивать по центру (10 шрифт, жирный, строчный). **Подзаголовки**, если таковые есть, набираются в текст (10 шрифт, жирный, курсив). Заголовки рисунков и таблиц – 10 шрифт, строчные, по центру. Текст таблицы – 9 шрифт (возможен 8 в сложных и больших таблицах). В теоретических обзорах количество ссылок может достигать до 100 и более. Если автор делает большой обзор собственных исследований, то допустимы ссылки на его ранее опубликованные работы, наиболее важные для объективного представления об излагаемом материале. Однако в тексте данного раздела не следует делать отступления от описания полученных данных к общеизвестным вопросам. Это будет считаться грубейшим нарушением, а статья потребует существенной переработки.

Таблицы с примечаниями и рисунки с подрисовочными подписями должны содержать информацию, достаточную для понимания приведенного материала без обращения к тексту статьи. В шапках таблиц желательно использование международных обозначений, в тех случаях, где это возможно, с целью более лёгкой адаптации текста для иностранных читателей (например, кровность, или % генов, по голштинской породе можно обозначить *HF*, однако в данном случае под таблицей или рисунком следует сделать ссылку). Для каждой таблицы и рисунка, там, где это необходимо, следует указывать данные, полученные в результате статистической обработки, а также достоверность различий. В сложных таблицах в случае ограниченного пространства в строке или столбце допустимо отсутствие ошибок средних значений, однако справа от среднего значения должны стоять звёздочки (символы достоверности), а параметр $\pm m$ должен в такой ситуации присутствовать в тексте при анализе табличного материала (например, $r=0,562 \pm 0,114$, $p < 0,001$, $\alpha < 1\%$). В случае фундаментальных или частных исследований генетико-статистических параметров ошибки могут быть представлены для таких известных статистических показателей, как σ , C_v и пр. Над столбцами рисунков и графиков желательно указывать ошибки средних значений признаков и достоверность различий, допустимо обозначение только достоверности различий (*, ** и ***), если ошибка параметра представлена на рисунке. При этом рисунки должны гармонично сочетать по величине и заливке все части, включая названия и штриховки, обозначения, горизонтальные и вертикальные надписи, линии трендов, эмпирические и теоретические кривые.

Число знаков после запятой должно быть одним и тем же для среднего значения и стандартной ошибки среднего значения ($M \pm m$, т. е. $r=0,562 \pm 0,114$, удой составил 5469 ± 56 кг молока, жирность молока

была на уровне $3,78 \pm 0,04\%$). В таблицах и в тексте необходимо вначале обозначить контрольную группу, а далее использовать обозначения групп римскими цифрами – I, II, III и т.д. На графиках должны быть обозначены результаты измерений, линии тренда без обозначений этих измерений могут быть использованы лишь в виде исключения. В подписях под рисунками необходимо давать расшифровку значений всех столбцов (см. рисунок 7), кривых линий и любых обозначений, требующих пояснений, включая величины экспериментальных точек или теоретических точек прогноза (необходимо указывать значения подобных точек). Если это не обозначено на графиках, в подрисуночных надписях необходимо указать, что отложено по вертикали (по оси ординат) и по горизонтали (по оси абсцисс).

Особого внимания при редактировании требуют схемы, т. к. в случае насыщенности их блоков текст может исчезать, уходя за границы. В случае работы над схемами целесообразно уменьшать поля со всех сторон, но так, чтобы текст не подступал плотно к линиям блоков.

Не следует делать заливку схемы или давать в ней текстуру, поскольку печать журнала выполняется в чёрно-белом формате. Если автор желает дать заливку схемы для наглядности на сайте журнала, то следует подготовить два варианта статьи – для чёрно-белой печати и электронного варианта.

Выводы должны строго следовать из материалов публикуемой работы, однако в больших обзорных статьях допустимы обобщения материала, дополнения к ранее сделанным выводам в предыдущих публикациях автора, на которые он ссылается в **Результатах и их обсуждении**. При этом выводы должны быть логичными, следующими из теоретических и эмпирических материалов.

- **Благодарности** (по желанию авторов статьи, 10 шрифт).

Список литературы (10 шрифт). Ссылки на литературу оформляются номером (номерами через запятую) в квадратных скобках, указываются страницы цитируемого текста. Например: [23, с. 234]. Если автор пользовался рефератом статьи или монографии и страницы указать невозможно, то допустимо: [23]. В подобном случае в списке литературы необходимо указывать, что автор знаком не со всем материалом. В качестве примера см. источник 4: (*Abstr.*).

- Поступила в редакцию (дата ставится ответственным секретарем, 10 шрифт).
- На последней странице статьи указываются Ф.И.О. всех авторов с указанием учёного звания, степени, должности, места работы с почтовым адресом и e-mail (10 шрифт). **Статья должна быть подписана всеми авторами.**

Сокращения. Разрешаются лишь общепринятые сокращения - названия мер, физических, химических и математических величин, терминов и т.п. Все сокращения должны быть расшифрованы, за исключением небольшого числа общеупотребительных сокращений. Названия учреждений при первом упоминании их в тексте даются полностью, и сразу же в скобках приводится общепринятое сокращение; при повторных упоминаниях дается сокращенное название учреждений. *Пример: Орловский государственный аграрный университет (ОрёлГАУ).*

Благодарности (не обязательная рубрика). В этой рубрике выражается признательность частным лицам, сотрудникам учреждений и фондам, оказавшим содействие в проведении исследований и подготовке статьи. Не следует выражать благодарности тем организациям и частным лицам или коллегам, которые не имеют отношения к проводимой научно-исследовательской работе.

Библиографический список следует оформлять по международным требованиям. Вначале указываются фамилии и инициалы всех авторов (жирным), затем название статьи, название журнала, год, номер и страницы цитируемой литературы. **За правильность и полноту предоставления библиографических данных ответственность несёт автор.**

2. Редакционная подготовка:

Рукопись регистрируется при получении главным редактором. К рукописи прикладывается выписка из протокола заседания кафедры или лаборатории об апробации работы и 2 рецензии (внешняя и внутренняя, с печатями организаций) специалистов, соответствующих отраслей наук, с учёной степенью доктора или кандидата наук. Возможна также всего 1 рецензия – члена редакционной коллегии. При наличии замечаний к рукописи она отсылается автору на доработку. Доработанный вариант статьи автор должен вернуть в редакцию вместе с первоначальным экземпляром не позднее чем через две недели после получения замечаний (для авторов, не являющихся сотрудниками университета, один-два месяца). В том случае, если рукопись не возвращена авторами в редакцию после указанных сроков или требуется более двух доработок, первоначальная дата её регистрации аннулируется. Датой поступления считается день получения окончательного варианта статьи. Материалы статей проходят подробную экспертизу у членов редакционной коллегии, включая аннотации на английском языке. Авторам также следует обратить внимание на то, что в случае использования автоматических переводчиков, необходимо тщательно выверять текст на английском языке и желательно пользоваться услугами профессиональных филологов, чтобы избежать курьёзных случаев перевода. Например, «при отёле» без буквы «ё», т.е. «при отеле» программа может перевести как отель; в этом случае иностранный читатель может столкнуться с полным несоответствием смысла и излагаемого материала, что, соответственно, негативно отразится на репутации автора. Редакция также убедительно просит авторов ставить точки над буквой «ё» в текстах ста-

тей, чтобы избежать неправильной интерпретации материалов иностранными учёными, пользующимися автоматическими переводчиками с русского языка.

Редакция обращает внимание на то, что работы аспирантов, не имеющие подписи научного руководителя и/или ссылки на него в конце статьи, к рассмотрению не принимаются в связи со строгим соблюдением редакционной коллегией профессиональной и научной этики. В случае грубых нарушений авторских прав, плагиата, некорректных заимствований, компиляционного библиографического списка редакция берёт на себя обязательства отказать авторам подобных рукописей в повторном рассмотрении и в дальнейших публикациях на страницах журнала **«Биология в сельском хозяйстве»**. Редакция также берёт на себя обязательства исправления ошибок и неудачных стилистических оборотов в тексте. Некоторые из этих недоработок могут быть устранены без согласования с автором. В сомнительных случаях редакционная коллегия оставляет за собой право требовать подробных разъяснений по излагаемому авторскому тексту. После исправления всех замечаний автор подписывает статью к печати.

По согласованию с редакцией, работы иностранных авторов могут иметь иную, более развёрнутую структуру и общепринятую в мировой практике последовательность изложения научных материалов.

Предпочтение отдаётся статьям по наиболее актуальным направлениям исследований, лежащим в сфере интересов мирового научного сообщества, а также авторам с высокими индексами цитирования в РИНЦ (около 100 и выше) и/или индексом Хирша 5 и выше.