

УДК 581.1; 581.134.5

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА, ОБОГАЩЕННОГО Zn-ФЕОФИТИНОМ, ИЗ ЛИСТЬЕВ ПШЕНИЦЫ *Triticum aestivum* L.

© 2024 г. М. С. Христин^а, * Т. Н. Смолова^а^аИнститут фундаментальных проблем биологии РАН ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пушкино, Россия

*e-mail: khristin_@rambler.ru

Поступила в редакцию 30.11.2023 г.

После доработки 01.02.2024 г.

Принята к публикации 05.02.2024 г.

Целью работы было получение препарата, обогащенного цинковым производным феофитина, из срезанных листьев озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. Сначала проводили феофитинизацию хлорофилла и вымывание из листьев фенольных веществ, Mg^{2+} при pH 3.5–4.0 с добавкой ЭДТА-Na, затем инкубацию с $ZnCl_2$, листья высушивали и хранили в темноте. Экстракцию цинковых производных проводили 2-кратной обработкой этанолом. Для увеличения выхода проводили повторную металлизацию. Полученный препарат соответствовал Zn-феофитину *a* и *b* по данным спектрофлуориметрии и тонкослойной хроматографии. Обсуждаются перспективы использования препарата Zn-феофитина, обладающего антиоксидантной и антивирусной активностью.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., реметаллизация, удаленные листья, флуоресценция 77К, Zn-феофитин

DOI: 10.31857/S0015330324040105, EDN: MNJGZX

ВВЕДЕНИЕ

Хлорофиллы выполняют ключевую роль в фотосинтезе — уникальном природном механизме преобразования энергии солнечного света. Благодаря фотосинтезу в земной атмосфере присутствует кислород, создалась биосфера, обеспечивающая продуктами питания животных и человека. Препараты хлорофилла и его химические производные в последние годы находят успешное применение в качестве пищевых красителей [1], лекарственных средств лечения онкологических [2], вирусных заболеваний [3, 4]. Образование новых штаммов вирусов, проблемы получения эффективных вакцин и вакцинации ставят задачу разработки альтернативных средств на базе растительных физиологически активных веществ, в том числе на основе хлорофилла [5], для лечения и профилактики вирусных заболеваний. Антивирусную активность против COVID-19 проявляют препараты Zn-хлорофилла [6] и феофорбида А [7] пока в экспериментах на клеточных культурах, зараженных вирусом.

Для исследования антивирусной активности производных хлорофилла и возможности их внедрения в практику борьбы с вирусными эпидемиями [8], актуально усовершенствование методов их синтеза непосредственно в тканях растений. Синтез Zn-хлорофилла происходит

в водных растениях [9, 10], клетках *Chlorella*, выращенных в темноте [11], и в листьях пшеницы в условиях засухи при внесении удобрений, включающих ионы Zn [12–14]. Вопрос о возможности использования таких растений для выделения Zn-хлорофилла остается открытым. С другой стороны, в этом и не было необходимости, так как для его получения достаточно заменить ионы Mg^{2+} на Zn^{2+} в препарате хлорофилла, очищенном хроматографически [15]. Разработка технологии возможна, как мы предполагаем, без получения очищенного и дорогостоящего хлорофилла. С учетом технологии “зеленого окрашивания” пищевых продуктов основанного на взаимодействии металлов с феофитином [16–18], представляется реальным синтез Zn-феофитина в срезанных листьях растений и получение препаратов, обогащенных этим биологически активным веществом.

Целью настоящей работы является синтез аналога хлорофилла — Zn-феофитина в срезанных листьях озимой пшеницы и получение препаратов на его основе. В задачи входили: отработка стадий феофитинизации хлорофиллов в листьях, вымывание из них фенольных веществ, ионов Mg^{2+} , повторная металлизация ионами Zn^{2+} , хроматографический и спектрофлуориметрический контроль полученного продукта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали $ZnCl_2$, ЭДТА-Na (“AppliChem”, Германия), этанол, метанол, ацетон (“Химмед”, Россия), деионизированную воду, жидкий азот, пластины С18 (“Watman”, США), спектрофлуориметр Hitachi-850 (“Hitachi”, Япония), микроцентрифугу Hettich Universal 32R (“Hettich”, Германия), блендер, камеру для ТСХ.

Синтез Zn-феофитина проводили в срезанных листьях озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Московская 56, взятых с поля весной на стадии трубкования. Листья промывали водой, затем инкубировали 2 сут. при перемешивании в 10 мМ ЭДТА-Na (в контрольном варианте ЭДТА-Na не добавляли), подводили рН до 3.5–4.0. Экстракт удаляли, листья отмывали водой, сменяя несколько раз до полного исчезновения окраски в отмывке, затем листья высушивали при естественных условиях. Высушенные листья измельчали, переносили в 100 мМ Na-K фосфатный буфер (рН 5.5), содержащий 50–100 мМ $ZnCl_2$ и инкубировали 2 сут. при комнатной температуре в темноте при перемешивании, отмывали от несвязавшихся ионов Zn^{2+} в том же буфере. Экстракт фильтровали через капроновое полотно и центрифугировали при 5000 g 3–5 мин, высушивали и хранили в темноте. Экстракцию Zn-феофитина проводили в этаноле.

Повторную металлизацию (реметаллизацию) проводили инкубацией этанолового экстракта с 10 мМ $ZnCl_2$ (2 сут.) при комнатной температуре, разбавляли дистиллированной водой в 10 раз и осаждали Zn-феофитин центрифугированием при 5000 g, 5 мин. Формирование Zn-феофитина контролировали спектрофлуориметрически при 77К в этаноловом экстракте.

ТСХ проводили на пластинах силикагеля (“Analtech INC”, США) С18, 10×20 см, 250 мк элюентом ацетон/метанол/хлороформ (56/30/14 об/об/об).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 показана схема синтеза Zn-феофитина в листьях пшеницы и реметаллизации в этаноловом экстракте. Из рис. 1 аП1 и бП4 видно, что интенсивность окраски (концентрация пигментов) этанолового экстракта металлизированного Zn^{2+} феофитина больше в опыте б. Центрифугирование экстрактов приводит к осаждению агрегатов и мелких фрагментов мембран тилакоидов (рис. 1 аП2 и бП5). Повторная экстракция этанолом этих осадков и осаждение агрегатов центрифугированием свидетельствует об отсутствии пигментов в осадке (рис. 1 аП3 и бП6).

Реметаллизация с Zn^{2+} этанолового экстракта в опыте с обработкой сухих листьев без (рис. 1аП3) и с добавлением ЭДТА-Na (рис. 1бП3)

демонстрирует полное превращение феофитина в Zn-феофитин (рис. 1аП2 и 1бП5). Также в этом случае повторная экстракция осадков этанолом подтверждает практически отсутствие в них Zn-феофитина (рис. 1 аП3 и бП6), что свидетельствует о полной экстракции продукта.

На рис. 2 представлены спектры низкотемпературной флуоресценции листьев пшеницы. Видно, что после высушивания и феофитинизации произошли значительные изменения в положении и интенсивности максимумов флуоресценции. В спектре 1 (рис. 2а) наблюдается интенсивная флуоресценция с максимумом 669 нм, характерная для флуоресценции феофитина *a* при 77К [19], уменьшилась интенсивность флуоресценции хлорофилла *a* при 725 нм (ФС1), т.е. не завершилась феофитинизация хлорофилла ФС1. В зеленом листе пшеницы интенсивность максимума 725 нм значительно преобладает по сравнению с максимумами флуоресценции ФС2 (685 и 695 нм) [20]. Неодинаковая доступность хлорофилл-белковых комплексов ФС1 и ФС2 при внешних изменениях рН в мембранах влияет на феофитинизацию, что подтверждается спектром 1 (рис. 2а). В спектре 2 (рис. 2а) показаны изменения флуоресценции листьев после проведения металлизации. Видно возрастание интенсивности максимума феофитина *b* (655 нм) по сравнению с его низкой интенсивностью в спектре флуоресценции листа после феофитинизации (рис. 2а1). Этот факт можно объяснить заменой ионов Mg^{2+} на ионы Zn^{2+} в хлорофилле *b*, не подвергнутом феофитинизации. Резкое понижение интенсивности флуоресценции ФС1 (рис. 1а2), вероятно, происходит при обмене ионов Mg^{2+} на ионы Zn^{2+} и превращение хлорофилла *a* в феофитин *a* (рис. 2а, максимум 669 нм, спектр 2). На рисунке 2б представлен спектр низкотемпературной флуоресценции этанолового экстракта листьев пшеницы до и после повторной металлизации. В металлизированном экстракте и его спектре флуоресценции присутствовали фракции феофитина *b* (рис. 2б, кривая 1б, максимум флуоресценции 655 нм) и феофитина *a* (рис. 2б, кривая 1а, максимум флуоресценции 669 нм), согласно [19]. Оказалось, что повторная металлизация с Zn^{2+} приводит к динамическому изменению окраски, которая сразу при добавке металла изменилась на бурую. Инкубация исследуемого экстракта с Zn^{2+} приводит к исчезновению бурой окраски и приобретению полностью синей. На рис. 2б в спектре 2 повторно металлизированного экстракта наблюдался только один максимум, длина волны которого больше, чем длина волны максимума флуоресценции феофитина *b* (рис. 2б, 1б) и меньше, чем длина волны максимума флуоресценции феофитина *a* (рис. 2б, 1а).

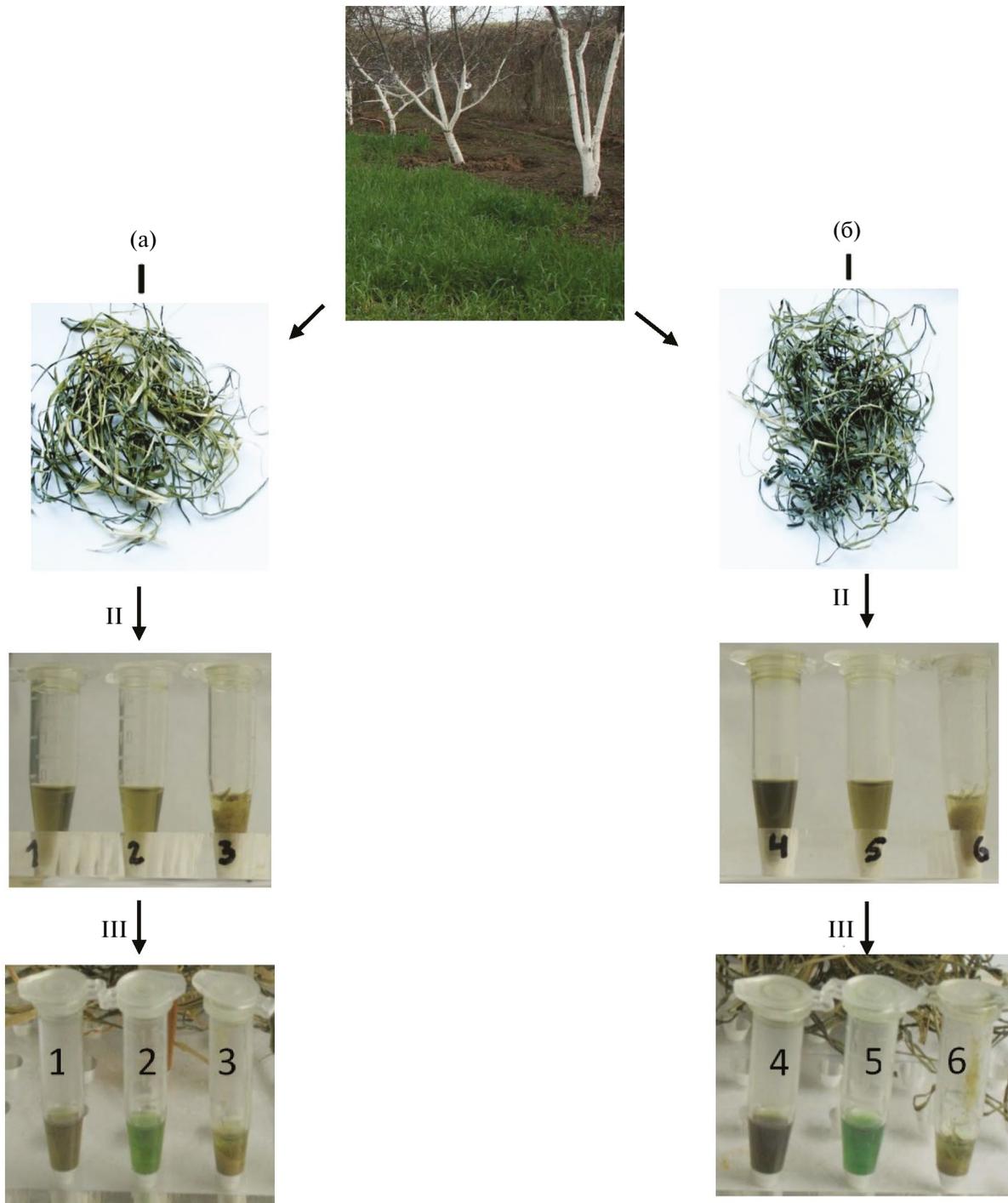


Рис. 1. Схема синтеза Zn-хлорофилла в листьях пшеницы до (I, II) и после реметаллизации с Zn^{2+} (III) без (а) и при добавлении ЭДТА–Na (б). I – Феофитинизация хлорофиллов инкубацией листьев при pH 3.5–4.0 при перемешивании до смены окраски с зеленой на бурую, отмывка дистиллированной водой до прекращения выхода окрашенных веществ и повышения pH до 5.5–6.5 в среде. II – Металлизация феофитина инкубацией листьев с 100 мМ $ZnCl_2$ при pH 5.5 до прекращения изменения окраски с буро-зеленой на сине-зеленую, отмывка дистиллированной водой, сушка, хранение в темноте, измельчение в блендере, экстракция этанолом, центрифугирование при 5000 g, 5 мин. 1, 4 – этаноловый экстракт листьев пшеницы; 2, 5 – супернатант и осадок после металлизации; 3, 6 – повторная экстракция этанолом осадка после металлизации (2, 5). III – Реметаллизация добавлением 10 мМ $ZnCl_2$ в этаноловый экстракт, инкубация 2 сут, разбавление дистиллированной водой в 10 раз и осаждение Zn-феофитина центрифугированием при 5000 g, 5 мин. 1, 4 – этаноловый экстракт после реметаллизации; 2, 5 – супернатант и осадок после реметаллизации; 3, 6 – повторная экстракция этанолом осадка после реметаллизации (2, 5).

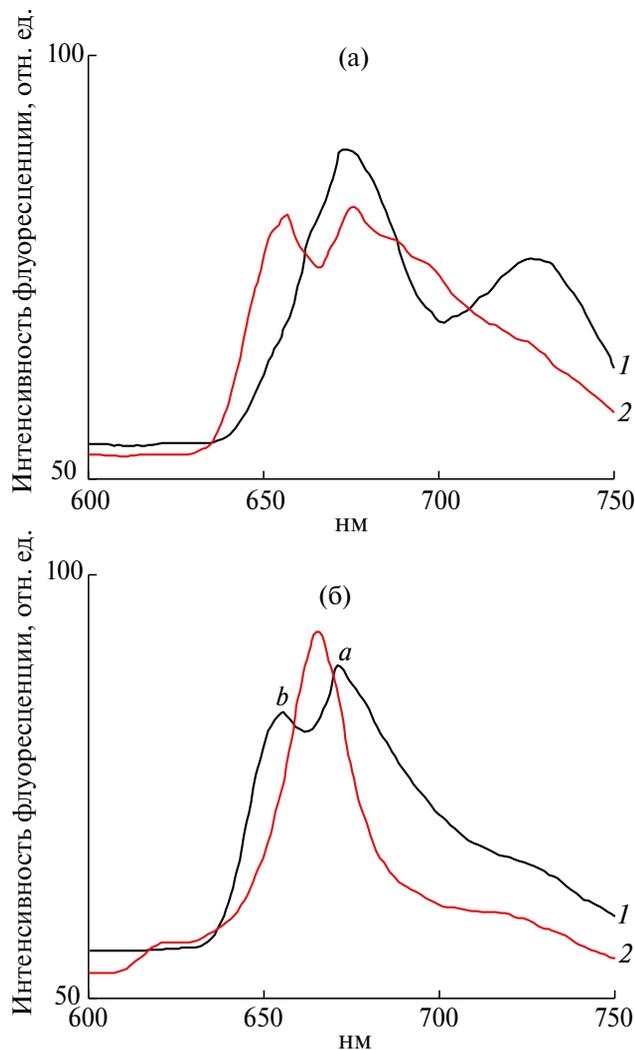


Рис. 2. Спектры флуоресценции при 77 К. (а) — листья пшеницы после феофитинизации (1) и металлизации с ионами Zn^{2+} (2); (б) — этаноловый экстракт сухих листьев пшеницы до (1) и после повторной металлизации (2). К экстракту добавляли 10 мМ $ZnCl_2$ в этаноле (1), инкубировали 2 сут. при 23°C (2); *a* — максимум флуоресценции феофитина *a*; *b* — максимум флуоресценции феофитина *b* [19].

Таким образом, в спектре флуоресценции этанолового экстракта максимум Zn-феофитина перекрывается максимумами феофитина *a* и *b*.

На рис. 3 представлены результаты ТСХ полученных препаратов. На хроматограмме 1 (экстракт сухих листьев) видно присутствие полос хлорофиллов *a* и *b*, феофитина *a*, каротина, на старте видны зоны, в которых находятся ХБК ФС1 и ФС2. Оказалось, что большая часть экстрагированного из листьев феофитина не включала ионы Zn^{2+} , вероятно, из-за неоптимальных условий металлизации, например температуры, pH, недоступности ионов Zn^{2+} (рис. 3, дорожки 2 и 3). Дополнительная металлизация экстрагированного из листьев феофитина приводила к изменению окраски первого экстракта от буро-зе-

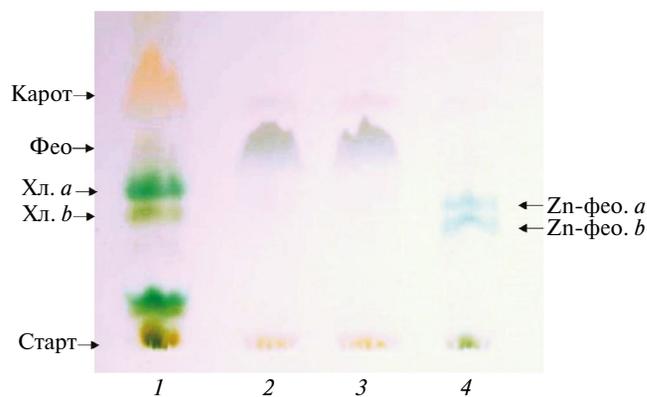


Рис. 3. ТСХ препарата Zn-феофитина (4), полученного металлизацией с $ZnCl_2$. Феофитин был получен обработкой сухих листьев пшеницы (1) при pH 3.5–4.0. 1 — экстракт сухих листьев; 2, 3 — экстракт листьев после феофитинизации; 4 — экстракт листьев после замещения Mg^{2+} на Zn^{2+} и повторной металлизации с Zn^{2+} (рис. 1, III 5).

леной к синей и образованию Zn-феофитина (рис. 3, дорожка 4), имеющего в красной области спектра флуоресценции один максимум (рис. 2б, спектр 2).

Чередование процедуры высушивания, феофитинизации, отмывания низкомолекулярных компонентов из листьев перед металлизацией способствует созданию благоприятных условий для интеграции ионов металла в молекулу феофитина. В работе [16] подчеркивается важная роль природы органического растворителя при моделировании конформации феофитина для оптимального вхождения в макроцикл хлорофилла атомов тяжелых металлов. Мы изучали влияние растворителей (вода и этанол) на металлизацию феофитина. Для этого использовали пластины для ТСХ после разделения ацетонового экстракта из листьев и длительного хранения ее в темноте. Зоны хлорофиллов *a* и *b* превращались в феофитины [17] и их возможно было металлизировать. На рис. 4, *a1* и *a2* представлены результаты синтеза Zn-феофитина на пластине для ТСХ после разделения хлорофиллов и хранения пластины длительное время. Интенсивность окрашенной зоны (рис. 4 *a1*) в результате длительного хранения снизилась на 80% (рис. 4 *a2*). На участок феофитинизированного хлорофилла наносили 10 мкл спиртового раствора 1 М $ZnCl_2$, затем подогрели в потоке горячего воздуха и через 2–3 мин наблюдали изменение серо-бурой окраски на синюю (рис. 4 *a2*). Нанесение 10 мкл 1 М водного раствора $ZnCl_2$ (рис. 4 *b2*) на поверхность зоны, содержащей феофитин не изменяло окраски, даже при длительной инкубации в течение 2 сут. Причинами отсутствия включения Zn^{2+} в зоне *b2* в водном растворе может быть неподходящая конформация феофитина.

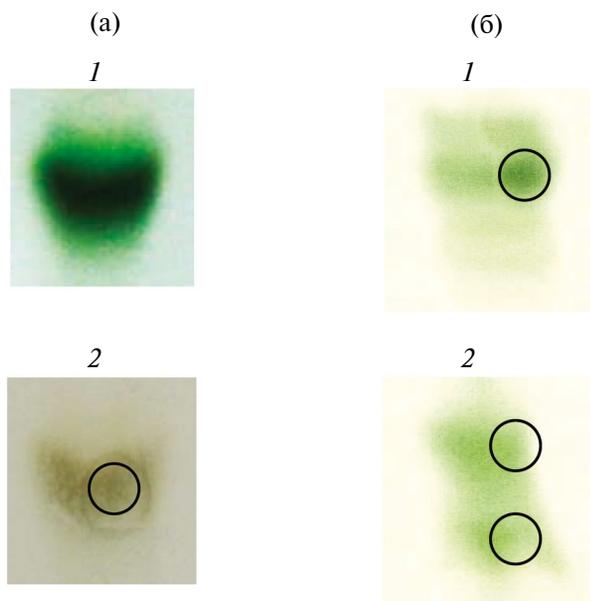


Рис. 4. Включение ионов Zn^{2+} в феофитин на пластине силикагеля для ТСХ. (а) 1 – зона Хл $a + b$, сразу после ТСХ, 2 – та же зона Хл $a + b$ после длительного хранения аэробно при комнатной температуре в темноте. На поверхность зоны (обозначена кружком) нанесено 10 мкл 1 М $ZnCl_2$ [17] в спирте. Видно изменение окраски, свидетельствующее о включении Zn^{2+} в феофитин. (б) – зона феофитина на пластине ТСХ после хроматографии этанолового экстракта листьев пшеницы, инкубированных при pH 4.0 и отмытых с помощью ЭДТА-Na от ионов Mg^{2+} , фенольных веществ. 1 – на участке зоны (обозначена кружком) нанесено 10 мкл 1 М $ZnCl_2$ в спирте, 2 – на участке зоны (обозначена кружком) нанесено 10 мкл 1 М $ZnCl_2$ в воде.

ОБСУЖДЕНИЕ

Получение Zn-феофитинов a и b предусматривает использование препаратов хлорофиллов a и b , феофитинизацию, и замену ионов Mg^{2+} на ионы Zn^{2+} в тетрапиррольном макроцикле [15]. Процедуры такой замены достаточно просты и воспроизводимы [16, 18, 21, 22]. Однако масштабированное производство хроматографически очищенного Zn-феофитина требует затрат на получение высокоочищенных препаратов хлорофилла, использование хроматографического оборудования, токсичных и огнеопасных растворителей. В нашей статье описана методика получения препарата, обогащенного Zn-феофитином без использования хроматографически очищенного хлорофилла, проведением его синтеза в срезанных листьях пшеницы. Такой синтез ранее проводился в срезанных листьях пандана (*Pandanus amaryllifolius*) [23], чая мате (*Ilex paraguariensis*) [24], а также с использованием экстракта шпината [25].

Мы проводили феофитинизацию хлорофиллов в срезанных листьях пшеницы при до-

статочно низким pH, в присутствии ЭДТА-Na, затем отмывали фенольные вещества, ионы Mg^{2+} и металлизировали феофитин цинком. Добавление ЭДТА-Na в среду способствует более эффективной металлизации (рис. 1б). Положительный эффект ЭДТА-Na можно объяснить образованием хелатов Zn-ЭДТА, которые, вероятно, облегчают проникновение ионов Zn^{2+} через эпидермис, устьица в клетки и тилакоиды хлоропластов. Известно [26], что при корневой подкормке пшеницы ионами Zn^{2+} в форме Zn-ЭДТА хелата наблюдалось повышенное накопление этого иона в листьях и зерне, что очень важно для решения проблемы дефицита Zn^{2+} в хлебе из пшениц, произрастающих на почвах, обедненных по цинку. Однако остается открытым вопрос о возможности синтеза Zn-феофитина при такой подкормке. Проведенный нами синтез Zn-феофитина сначала в целых, затем в измельченных листьях показывает возможность такого синтеза не только в срезанных, но и, вероятно, в вегетирующих листьях пшеницы.

Использование в практике растениеводства концентраций ионов Zn^{2+} на один – два порядка меньше по сравнению с использованной нами, вероятно, можно объяснить различными механизмами взаимодействия ионов цинка с вегетирующими и срезанными листьями. По нашим наблюдениям эффективность используемой концентрации Zn^{2+} зависит от некоторых факторов. Один из них – предварительное удаление из листьев фенольных веществ, т.к. они могут экстрагироваться вместе с Zn-феофитином и окисляясь, снижать качество препарата. Чрезмерно высокие концентрации Zn^{2+} (более 100 мМ), использованные для металлизации феофитинов в листьях пшеницы, негативно влияли на экстракцию Zn-феофитина: листья имели вид усохших, даже при замачивании в воде, при этом уменьшался выход Zn-феофитина. Такой эффект можно объяснить дублением белков листа при высокой концентрации цинка [27].

Результаты нашей работы позволяют предположить два механизма связывания ионов цинка с хлорофиллом и феофитином в срезанных листьях пшеницы. По одному из них в центре макроцикла хлорофилла идет обмен ионов Mg^{2+} на ионы Zn^{2+} , а по-другому, Zn^{2+} хелатируется кетоэфирными группами по периферии макроцикла [28].

Феофитинизация хлорофилла в срезанных неизмельченных листьях (рис. 1 а1, б1) не была оптимизирована так, чтобы все участки каждого отдельного листа превращались из зеленых в бурые, т.е. процент феофитинизованных достигал 100%. В литературе предлагаются способы металлизации феофитина ионами Zn^{2+}

с прогреванием слабо зеленых груш при 94°C, 20 мин [29], листьев *Pandanus* при температуре 110°C, затем инкубацией с ионами Zn^{2+} и экстракцией Zn-хлорофилла этанолом [23], обработкой гомогената шпината пульсирующими электрическими полями высокой напряженности (20–100 кВ/см) на протяжении нескольких наносекунд в присутствии ионов цинка [30]. В цитированных работах отсутствуют данные о 100% превращения Mg-хлорофилла в Zn-хлорофилл. Однако феофитинизацией при бланшировании, т.е. кратковременной обработкой листьев паром, кипятком, можно достичь 100% удаления ионов Mg^{2+} из хлорофилла, но на следующем этапе металлизации с помощью ионов Zn^{2+} достичь высокой эффективности практически невозможно. Кроме того, нагревание хлорофилла и его производных приводит к деградации. Показано, что длительное нагревание листьев модифицирует хлорофилл в результате декарбоксиметаллирования и образования пироефеофитинов [30–32]. Поэтому мы не использовали прогревание в нашей работе. Нельзя полностью исключить обратное встраивание в феофитин освободившихся ионов Mg^{2+} . Эта возможность пока недостаточно изучена. Мы ее учитывали, что подтверждается более интенсивной синей окраской листьев, из которых ионы Mg^{2+} были удалены отмывкой с ЭДТА-Na (рис. 16).

В известной нам литературе, патентах отсутствуют доказательства синтеза Zn-феофитина в пшенице при внекорневой подкормке ионами Zn^{2+} . Более того, результаты, полученные при использовании других растений, свидетельствуют в пользу выбранного нами пути синтеза с использованием срезанных листьев. Так, синтез Zn-хлорофилла происходит в клетках *Chlorella* только при гетеротрофном росте, в темноте, после накопления феофитина, Zn-хлорофилл синтезируется прямым включением ионов цинка в молекулу феофитина [11].

Перспектива возможного применения препарата Zn-хлорофилла для профилактики и лечения вирусных заболеваний, прежде всего COVID-19, в литературе активно обсуждается [5–8]. Предлагаемый нами способ получения Zn-феофитина в срезанных листьях пшеницы перспективен, так как, во-первых, позволяет исследовать фундаментальные особенности взаимодействия тяжелых металлов с хлорофиллом, во-вторых, возможно применение препаратов Zn-феофитина в профилактике и лечении вирусных болезней наряду с методом вакцинации. Известные цинксодержащие и хлорофиллсодержащие препараты, необходимые для стимуляции иммунитета являются искусственными и имеют ряд противопоказаний. Возможная замена на Zn-феофитин является более экологичной, т.к. содержит природное соединение.

Авторы благодарят за обсуждение результатов работы сотрудников ИФПБ РАН в.н.с. к.б.н. Шкуропатова А.Я., с.н.с. к.х.н. Ковалева В.Б., сотрудников лаборатории фотосинтетического окисления воды ИФПБ РАН, а также рецензентов за ценные замечания и предложения.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ПНЦБИ РАН (122041100274-6).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ebrahimi P., Shokramraji Z., Tavakkoli S., Mihaylova D., Lante A.* Chlorophylls as natural bioactive compounds existing in food by-products: a critical review // *Plants*. 2023. V. 12. P. 1533. <https://doi.org/10.3390/plants12071533>
2. *Гельфонд М.Л.* Фотодинамическая терапия в онкологии // *Практическая онкология*. 2007. Т. 8. № 4. С. 204.
3. *Mishra V.K., Bacheti R.K., Husen A.* Medicinal uses of chlorophyll: A critical overview. In book: *Chlorophyll: structure, function and medicinal uses* publisher: nova science publishers, Inc., Hauppauge, NY 11788. Ed.: Hua Le and Elisa Salcedo, 2011. P. 1.
4. *Solymsi K., Mysliwa-Kurczel B.* Chlorophylls and their derivatives used in food industry and medicine // *Mini Rev. Med. Chem.* 2017. V. 17. P. 1194. <https://doi.org/10.2174/1389557516666161004161411>
5. *Caño-Delgado A.I., Ponz F., Avesani L.* Plant science's contribution to fighting viral pandemics: COVID-19 as a case study // *Front. Plant Sci.* 2022. P. 173. <https://doi.org/10.3389/978-2-88974-157-1>
6. *Clark N.F., Taylor-Robinson A.W.* COVID-19 therapy: could a chlorophyll derivative promote cellular accumulation of Zn^{2+} ions to inhibit SARs-CoV-2 RNA synthesis? // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 1270. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01270>
7. *Jimenez-Aleman H.G., Castro V., Longdaitshbehere A., Gutierrez-Rodríguez M., Garaigorta U., Solano R., Gastaminza P.* SARS-CoV-2 fears green: the chlorophyll catabolite pheophorbide a is a potent antiviral // *Pharmaceutical*. 2021. V. 14. P. 1048. <https://doi.org/10.3390/ph14101048>
8. *Lebedeva N.Sh., Gubarev Y.A., Koifman M.O., Koifman O.I.* The application of porphyrins and their analogues for inactivation of viruses. // *Molecules*. 2020. V. 25. P. 4368. <https://doi.org/10.3390/molecules25194368>
9. *Kupper H., Kupper F., Spiller M.* Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants // *J. Exp. Bot.* 1996. V. 47. P. 259.
10. *Kupper H., Dedic R., Svoboda A., Hala J., Krones P.M.H.* Kinetics and efficiency of excitation

- energy transfer from chlorophylls, their heavy metal-substituted derivatives, and pheophytins to singlet oxygen // *BBA*. 2002. V. 1572. P. 107.
11. *Ikegami I., Nemoto A., Sakashita K.* The formation of Zn-Chl a in *Chlorella* heterotrophically grown in the dark with an excessive amount of Zn²⁺ // *Plant Cell Physiol*. 2005. V. 46. P. 729.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pci079>
 12. *Hassan M.U., Aamer M., Chattha M.U., Haiying T., Shahzad B., Barbanti L., Nawaz M., Rasheed A., Afzal A., Liu Y., Guoqin H.* The critical role of zinc in plants facing the drought stress // *Agriculture*. 2020. V. 10. P. 396.
<https://doi.org/10.3390/agriculture10090396>
 13. *Ma D., Sun D., Wang C., Ding H., Qin H., Hou J., Huang X., Xie Y., Guo T.* Physiological responses and yield of wheat plants in zinc-mediated alleviation of drought stress // *Front. Plant Sci*. 2017. V. 8. P. 860.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00860>
 14. *Chatti D., Kumar A.* Effect of zinc nutrition in mitigating late sowing induced heat stress in wheat crop // *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 2020. V. 9. P. 2415.
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.901.275>
 15. *Евстигнеев В.Б., Оловянишникова Г.Д.* Фотохимические свойства аналогов хлорофилла Zn-феофитинов // *Молекулярная биология*. 1973. Т. 7. С. 195.
 16. *Orzeł Ł., Wasr J., Kania A., Susz A., Rutkowska-Zbik D., Staronr J., Witko M., Stochel G., Fiedor L.* Factors controlling the reactivity of divalent metal ions towards pheophytin a // *J. Biol. Inorg. Chem*. 2017. V. 22. P. 941.
<https://doi.org/10.1007/s00775-017-1472-1>
 17. *Sjursnes B.J., Kvittingen L., Schmid R.* Thin-layer chromatography of green leaves extracts: Zinc migrates into pheophytin on TLC silica plates with fluorescence indicator (F254) // *JPC – J. Planar Chromatogr. – Modern TLC*. 2016. V. 29. P. 480.
<https://doi.org/10.1556/1006.2016.29.6.13>
 18. *Scheer H., Hartwich G.* Bacterial reaction centers with modified tetrapyrrole chromophores. // In: *Anoxygenic photosynthetic bacteria*, Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. 1995. P. 649.
https://doi.org/10.1007/0-306-47954-0_29
 19. *Thorne S.W., Newcomb E.H., Osmond C.B.* Identification of chlorophyll b in extracts of prokaryotic algae by fluorescence spectroscopy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977. V. 74. P. 575.
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.575>
 20. *Христин М.С., Смолова Т.Н., Креславский В.Д.* Тепловой стресс, агрегация хлорофилл-белковых комплексов и светозависимое восстановление активности ФС II проростков пшеницы // *Физиология растений*. 2021. Т. 68. С. 509.
<https://doi.org/10.31857/S0015330321050079>
 21. *Kang Y.-R., Park J., Jung S. K., Chang Y. H.* Synthesis, characterization, and functional properties of chlorophylls, pheophytins, and Zn-pheophytins. // *Food Chemistry*. 2018. V. 245. P. 943.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.079>
 22. *Zvezdanovic J., Markovic D.* Copper, iron, and zinc interactions with chlorophyll in extracts of photosynthetic pigments studied by VIS Spectroscopy // *Russ. J. Physic. Chem. A*. 2009. V. 83. P. 1542.
 23. *Senklang P., Anprung P.* Optimizing enzymatic extraction of Zn–chlorophyll derivatives from pandan leaf using response surface methodology // *J. Food Proces. Preservat*. 2010. V. 34. P. 759.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2009.00393.x>
 24. *Scipioni G.P., Argüello B.V., Schmalko M.E.* The effect of Mg²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ pre-treatment on the color of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves // *Braz. Arch. Biol. Technol*. 2010. V. 53. P. 1497.
 25. *Nelson R.E., Ferruzzi M.G.* Synthesis and bioaccessibility of Fe-pheophytin derivatives from crude spinach extract // *J. Food Sci*. 2008. V. 73. P. H86.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00783>
 26. *Zhao A., Yang S., Wang B., Tian X.* Effects of ZnSO₄ and Zn-EDTA applied by broadcasting or by banding on soil Zn fractions and Zn uptake by wheat (*Triticum aestivum* L.) under greenhouse conditions // *J. Plant Nutrit. Soil Sci*. 2019. V. 182. P. 307.
<https://doi.org/10.1002/jpln.201800341>
 27. *Чурсин В., Магомедова П.* Исследование взаимодействий в системе белок – соли цинка – органический дубитель // *Российский химический журнал*. 2020. Т. 64. С. 37.
<https://doi.org/10.6060/rcj.2020642.6>
 28. *Bechaieb R., Fredj A.B., Akachab A.B., Gérard H.* Interactions of copper (ii) and zinc(ii) with chlorophyll: insights from density functional theory studies // *New J. Chem*. 2016. V. 40. P. 4543.
<https://doi.org/10.1039/C5NJ03244J>
 29. *Ngo T., Zhao Y.* Formation of zinc-chlorophyll-derivative complexes in thermally processed green pears (*Pyrus communis* L.) // *J. Food Sci*. 2007. V. 72. P. 397.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00465.x>
 30. *Yongguang Y., Yong H., Jingbo L.* A novel protecting method for visual green color in spinach puree treated by high intensity pulsed electric fields // *J. Food Engineer*. 2007. V. 79. P. 1256.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.04.031>
 31. *Schwartz S.J., Von Elbe J.H.* Kinetics of chlorophyll degradation to pyropheophytin in vegetables // *J. Food Sci*. 1983. V. 48. P. 1303
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb09216.x>
 32. *La Borde L.F., Elbe J.H.* Chlorophyll degradation and zinc complex formation with chlorophyll derivatives in heated green vegetables // *J. Agric. Food Chem*. 1994. V. 42. P. 1100.
<https://doi.org/10.1021/jf00041a010>