



# СОВРЕМЕННЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ХИТИНА И ХИТОЗАНА

Шестнадцатая Всероссийская конференция  
с международным участием

2–6 октября 2023 г.  
г. Владивосток

Материалы конференции



**РОСХИТ**  
2023

Институт химии ДВО РАН (ИХ ДВО РАН)  
ФИЦ Биотехнологии РАН  
Российское хитиновое общество (РХО)

# **СОВРЕМЕННЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ХИТИНА И ХИТОЗАНА**

**Шестнадцатая Всероссийская конференция  
с международным участием**

*2–6 октября 2023 г.  
г. Владивосток*

Материалы конференции

Владивосток



2023

© Институт химии ДВО РАН,  
ФИЦ Биотехнологии РАН, 2023  
© Оформление. ФГАОУ ВО ДВФУ, 2023  
ISBN 978-5-7444-5553-8

УДК 66:577.114(082)

ББК 24.713.314я43

**Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана (Росхит-23) :** Шестнадцатая Всероссийская конференция с международным участием, 2–6 октября 2023 г., г. Владивосток : материалы конференции. – Владивосток : Издательство Дальневосточного федерального университета, 2023. – [204 с.]. – ISBN 978-5-7444-5553-8. – DOI <https://doi.org/10.24866/7444-5553-8>. – URL: <https://roschit23.ru/>. – Дата публикации: 28.09.2023. – Текст. Изображение : электронные.

Юбилейная конференция «Росхит-23» продолжает серию конференций по хитину и хитозану в России, начавшуюся в сентябре 1983 г. во Владивостоке с Первой Всесоюзной научно-технической конференции по производству и использованию хитина и хитозана из панциря криля и других ракообразных. Тематика конференции включает наиболее актуальные направления современной хитинологии: источники хитина, получение, анализ и свойства хитозана и его производных; хитинолитические ферменты; получение, анализ, биологическая активность олигохитозанов; применение хитина, хитозана и их производных.

*Ответственность за содержание материалов, точность цитирования  
и сведений об авторах несут авторы публикаций.*

---

*Текстовое электронное издание*

Минимальные системные требования:

Веб-браузер Internet Explorer версии 6.0 или выше,  
Opera версии 7.0 или выше, Google Chrome версии 3.0 или выше.

Компьютер с доступом к сети Интернет.

Минимальные требования к конфигурации и операционной системе компьютера определяются требованиями перечисленных выше программных продуктов.

Размещено на сайте 29.09.2023 г.

Объем 21,20 Мб

Дальневосточный федеральный университет  
690922, Приморский край, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10.

E-mail: [prudkoglyad.sa@dvfu.ru](mailto:prudkoglyad.sa@dvfu.ru)

Тел.: +7 (423) 226-54-43

© Институт химии ДВО РАН, ФИЦ Биотехнологии РАН, 2023

© Оформление. ФГАОУ ВО ДВФУ, 2023

## **Председатели конференции**

Братская С.Ю. – чл.-кор. РАН, вице-президент Европейского хитинового общества, Институт химии ДВО РАН, г. Владивосток

Варламов В.П. – д-р хим. наук, профессор, президент Российского хитинового общества, ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва

## **Программный комитет**

### *Председатели*

Федоров А.Н. – д-р биол. наук, директор ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва

Гнеденков С.В. – чл.-кор. РАН, директор ИХ ДВО РАН, г. Владивосток

### *Члены комитета*

Дебабов В.Г. – академик РАН, ГосНИИгенетика - НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва

Кирпичников М.П. – академик РАН, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва

Мирошников А.И. – академик РАН, Институт биоорганической химии РАН им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова, г. Москва

Попов В.О. – академик РАН, ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва

Рашидова С.Ш. – академик УзАН, Институт химии и физики полимеров АН РУ, г. Ташкент, Узбекистан

Римарева Л.В. – академик РАН, ФИЦ питания и биотехнологии, г. Москва

Тихонович И.А. – академик РАН, СПбГУ, г. Санкт-Петербург

Нифантьев Н.Э. – чл.-кор. РАН, Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, г. Москва

Албулов А. И. – д-р биол. наук, профессор, ВНИИТИ биологической промышленности, г. Щелково

Кильдеева Н. Р. – д-р хим. наук, профессор, Российский государственный университет им. А. Н. Косыгина, вице-президент РХО, г. Москва

Мелентьев А.И. – д-р биол. наук, профессор, Институт биологии УНЦ РАН, г. Уфа

Мысякина И.С. – д-р биол. наук, ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва

Синицын А.П. – д-р хим. наук, профессор, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва

Загустина Н.А. – канд. биол. наук, ответственный секретарь журнала «Прикладная биохимия и микробиология», г. Москва

Курченко В.П. – канд. хим. наук, Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

Скорик Ю.А. – канд. хим. наук, Институт высокомолекулярных соединений РАН, г. Санкт-Петербург

## **Организационный комитет**

### *Ответственный секретарь*

Яковлева И.В. – ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, г. Москва

### *Члены комитета*

Маринин Д.В. – канд. хим. наук, ИХ ДВО РАН, г. Владивосток

Бутенко Т.Ю. – канд. хим. наук, ИХ ДВО РАН, г. Владивосток

Скатова А.В. – канд. хим. наук, ИХ ДВО РАН, г. Владивосток

Привар Ю.О. – ИХ ДВО РАН, г. Владивосток

Мироненко А.Ю. – канд. хим. наук, ИХ ДВО РАН, г. Владивосток

Теркулов Д.Р. – ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва

Евдокишин В.М. – ИХ ДВО РАН, г. Владивосток

## Содержание

<b>СЕКЦИЯ 1. ИСТОЧНИКИ ХИТИНА, ПОЛУЧЕНИЕ, АНАЛИЗ И СВОЙСТВА ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ</b> .....	9
Новиков В.Ю. <b>ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА ХИТИНА И ХИТОЗАНА</b> .....	9
Миргородов А.А. <b>СЛОЖНОСТИ И ВЫЗОВЫ НА ПУТИ КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ОТХОДОВ КРАБА</b> .....	15
Шумская Н.В., Новиков В.Ю., Долгопятова Н.В., Коновалова Н.В. <b>РЕГУЛИРОВАНИЕ СВОЙСТВ ХИТОЗАНА</b> .....	16
Красочко П.А., Албулов А.И., Красочко И.А., Жахангиров С.С., Фролова М.А., Еремец В.И., Федоринова К.М., Антонова З.А. <b>ПОДГОТОВКА ПЧЕЛИНОГО ПОДМОРА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ХИТИН-МЕЛАНИНОВОГО КОМПЛЕКСА</b> .....	21
Кусков Т.Е., Подгорбунских Е.М., Бухтояров В.А., Бычков А.Л. <b>ПОЛУЧЕНИЕ ХИТОЗАНА ИЗ ПОДМОРА ПЧЕЛ И ХРЕБТОВ КАЛЬМАРА. ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЯ</b> .....	25
Варламов В.П., Кильдеева Н.Р., Лопатин С.А., Хайрова А.Ш., Сажнев Н.А. <b>ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАСТВОРОВ ХИТОЗАН-МЕЛАНИНОВОГО КОМПЛЕКСА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОВОЛОКНИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ</b> .....	29
Ахымбетова Г.Д., Милушева Р.Ю., Рашидова С.Ш. <b>ИССЛЕДОВАНИЕ ХИТОЗАНА ИЗ ЦИСТ <i>ARTEMIA PARTHENOTEMIA</i> АРАЛЬСКОГО МОРЯ</b> .....	34
Пирниязов К.К., Рашидова С.Ш. <b>ЗАВИСИМОСТЬ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НАНОАСКОРБАТ ХИТОЗАНА <i>BOMBUX MORI</i> ОТ УСЛОВИЙ СИНТЕЗА</b> .....	38
Рахманова В.Н., Рашидова С.Ш. <b>ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ РЕАКЦИИ СУЛЬФАТИРОВАНИЯ ХИТОЗАНА <i>BOMBUX MORI</i></b> .....	42
Менглиев А.С., Ихтиярова Г.А. <b>ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ХИТОЗАНА, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ <i>APIS MELLIFERA</i></b> .....	45
Захаревич А.А., Малахов С.Н., Чвалун С.Н., Григорьев Т.Е. <b>О-АЦИЛИРОВАНИЕ N-ФТАЛОИЛХИТОЗАНА С ПРИМЕНЕНИЕМ МАЛОТО КСИЧНЫХ РЕАГЕНТОВ И РАСТВОРИТЕЛЕЙ</b> .....	47
Критченков А.С., Киричук А.А. <b>НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ ХИТОЗАНА</b> .....	49
Nurgaliev I.N., Burkhanova N.J., Rashidova S.Sh. <b>DFT INVESTIGATION ON THE INTERACTION OF CHITOSAN WITH COLLAGEN</b> .....	50
<b>СЕКЦИЯ 2. ХИТИНОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ</b> .....	55
Рысакова К. С., Новиков В. Ю., Шумская Н. В., Мухортова А. М. <b>ВЫДЕЛЕНИЕ ХИТИНАЗ ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА И КРАБА-СТРИГУНА ОПИЛИО</b> .....	55
<b>СЕКЦИЯ 3. ОЛИГОХИТОЗАНЫ: ПОЛУЧЕНИЕ, АНАЛИЗ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ</b> .....	60
Курченко В.П., Головач Т.Н., Шрамко М.И., Лодыгин А.Д., Тихонов В.Е. <b>ВЛИЯНИЕ ОЛИГОХИТОЗАНА 45,3 кДа НА СИНТЕЗ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ РЯДА ВИДОВ <i>LACTOBACILLUS</i></b> .....	60

<b>СЕКЦИЯ 4. ХИТОЗАНСОДЕРЖАЩИЕ ПРЕПАРАТЫ И МАТЕРИАЛЫ (ВСЕ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ, КРОМЕ БИМЕДИЦИНСКИХ) .....</b>	<b>65</b>
Алехова Т.А., Александрова А.В., Загустина Н.А., Александрова В.А., Башаров А.А. <b>ПЛЕНКИ НА ОСНОВЕ СУКЦИНАТА ХИТОЗАНА ДЛЯ ЗАЩИТЫ ПОВЕРХНОСТЕЙ КОНСТРУКЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ ОТ ВОЗДЕЙСТВИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ .....</b>	<b>65</b>
Рашидова Д.К., Амантурдиев Ш.Б., Рашидова С.Ш. <b>ВЛИЯНИЕ НАНОПРЕПАРАТОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ПРИ РОСТЕ И РАЗВИТИЯ ХЛОПЧАТНИКА ...</b>	<b>69</b>
Жгун А.А., Авданина Д.А., Ермолюк А.А., Шумихин К.В., Нураева Г.К., Жуйкова Ю.В., Троян Е.В., Степанов М.Г., Шагдарова Б.Ц., Ильина А.В., Хайрова А.Ш., Лопатин С.А., Шитов М.В., Варламов В.П. <b>НОВЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОБЪЕКТОВ КУЛЬТУРНОГО НАСЛЕДИЯ В ГОСУДАРСТВЕННОЙ ТРЕТЬЯКОВСКОЙ ГАЛЕРЕЕ.....</b>	<b>73</b>
Милушева Р.Ю., Рашидова С.Ш. <b>ПОЛИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ХИТОЗАНА И БЕЛКА <i>BOMBUX MORI</i> .....</b>	<b>78</b>
Холова А.Р., Вождаева М.Ю., Мельницкий И.А., Серебряков П.В., Киекбаев Р.И., Кантор Е.А., Ялалетдинова А.В., Малкова М.А. <b>ОЦЕНКА ФЛОКУЛЯЦИОННЫХ СВОЙСТВ ХИТОЗАНА ПРИ ОЧИСТКЕ ВОДЫ НА ПРЕДПРИЯТИИ ВОДОПОДГОТОВКИ .....</b>	<b>82</b>
Попова Э.В., Домнина Н.С., Новикова И.И., Коваленко Н.М., Краснобаева И.Л., Зорин И.М. <b>БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДИСПЕРСИЙ НАНОЧАСТИЦ ХИТОЗАНА, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ ДРОБНОГО ОСАЖДЕНИЯ .....</b>	<b>86</b>
Новикова И.И., Попова Э.В., Коваленко Н.М., Краснобаева И.Л. <b>ВЛИЯНИЕ ШТАММОВ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> В СОЧЕТАНИИ С САЛИЦИЛАТОМ ХИТОЗАНА НА АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ И КАТАЛАЗЫ В ЛИСТЬЯХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕМ ТЕМНО-БУРОЙ ПЯТНИСТОСТИ <i>B. SOROKINIANA</i> .....</b>	<b>90</b>
Новикова И.И., Колесников Л.Е., Попова Э.В., Хассан Башар Абд Хассан, Прияткин Н.С., Радишевский Д.Ю., Краснобаева И.Л., Хигерович Л.А., Колесникова Ю.Р. <b>ПОВЫШЕНИЕ ПРОДУКТИВНОСТИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ И ОПТИМИЗАЦИЯ ФИТОСАНИТАРНОГО СОСТОЯНИЯ ЕЕ ПОСЕВОВ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> И САЛИЦИЛАТА ХИТОЗАНА.....</b>	<b>95</b>
Федина В.В., Алферов С.В. <b>ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАТРИЦ ГИДРОГЕЛЯ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА ДЛЯ АНОДНОГО И КАТОДНОГО ПРОСТРАНСТВ В БИОТОПЛИВНОМ ЭЛЕМЕНТЕ.....</b>	<b>99</b>
Мезенова О.Я., Агафонова С.В., Романенко Н.Ю., Калинина Н.Ю., Волков В.В. <b>ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИДРОЛИЗАТОВ ВТОРИЧНОГО ХИТИНСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ В АКВАКУЛЬТУРЕ.....</b>	<b>102</b>
Землякова Е.О., Пестов А.В. <b>ВЛИЯНИЕ N-(2-СУЛЬФОЭТИЛ)- И N-(2- КАРБОКСИЭТИЛ)ХИТОЗАНА НА ПРОРАСТАНИЕ И ПЕРВОНАЧАЛЬНЫЙ РОСТ РАСТЕНИЙ.....</b>	<b>105</b>
Земскова Л.А., Токарь Э.А., Мацкевич А.И., Приймак И.Д., Егорин А.М. <b>ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА – СОРБЕНТЫ ДЛЯ ОЧИСТКИ ЖИДКИХ РАДИОАКТИВНЫХ ОТХОДОВ .....</b>	<b>108</b>

Vokhidova N.R., Panova I.G., Yaroslavov A.A., Rashidova S.Sh. <b>FUNDAMENTAL BASES FOR OBTAINING AN EFFECTIVE SOIL STRUCTURE-FORMER BASED ON BOMBYX MORI CHITOSAN</b> .....	112
Саломатина Е.В., Шелудько П.Н., Смирнова О.Н., Смирнова Л.А. <b>КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА, МОДИФИЦИРОВАННОГО НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫМ ДИОКСИДОМ ТИТАНА</b> .....	113
Максимова С.Н., Сафронова Т.М., Полещук Д.В. <b>ОПЫТ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ УЧЕНЫМИ ФГБОУ ВО «ДАЛЬРЫБВТУЗ» ХИТОЗАНА В ТЕХНОЛОГИИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ ВОДНЫХ БИОРЕСУРСОВ</b> .....	115
Акопова Т.А. <b>МЕХАНИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ ХИТИНА И ХИТОЗАНА И ЕЁ ПРИМЕНЕНИЕ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ МАТЕРИАЛОВ</b> .....	121
Тобышева П.Д., Хамидуллина Л.А., Бурьгин Г.Л., Пузырев И.С., Пестов А.В. <b>ПОИСК ОПТИМАЛЬНЫХ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ N-(2-КАРБОКСИЭТИЛ)ХИТОЗАНА ДЛЯ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ РОСТОРЕГУЛЯТОРА РАСТЕНИЙ</b> .....	125
Годзишевская А.А., Лопашина Е.П., Снегирёва А.А., Курасова М.Н. <b>ПОВЕДЕНИЕ МЕТАЛЛОСОДЕРЖАЩИХ ПЛЁНОК НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ</b> .....	126
Шарикова Н.А., Вдовиченко А.Ю., Шариков Р.В., Григорьев Т.Е. <b>ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА</b> .....	126
Яруллина Л.Г., Черепанова Е.А., Бурханова Г.Ф., Сорокань А.В., Заикина Е.А., Цветков В.О., Марданшин И.С., Фаткуллин И.Я., Максимов И.В., Калацкая Ж.Н., Н.А. Еловская, Николайчук В.В. <b>ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> И КОМПОЗИТАМИ ХИТОЗАНА С ОКСИКОРИЧНЫМИ КИСЛОТАМИ НА АКТИВНОСТЬ PR-ГЕНОВ И УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ К ФИТОФТОРОЗУ</b> .....	128
<b>СЕКЦИЯ 5. БИМЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ХИТИНА, ХИТОЗАНА И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ</b> .....	131
Луныков А.П., Дрозд Н.Н., Ильина А.В., Варламов В.П. <b>СИНТЕЗ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЭФФЕКТИВНЫХ ГЕМОСТАТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ</b> .....	131
Кильдеева Н.Р., Захарова В.А., Баранов О.В. <b>ИННОВАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ СШИТЫХ И ТЕРМООБРАТИМЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ ДЛЯ НОВЫХ МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ</b> .....	134
Привар Ю.О., Скатова А.В., Борода А.В., Братская С.Ю. <b>ОСОБЕННОСТИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КОВАЛЕНТНО СШИТЫХ СУПЕРМАКРОПОРИСТЫХ КРИОГЕЛЕЙ ХИТОЗАНА И КАРБОКСИМЕТИЛХИТОЗАНА</b> .....	137
Скатова А.В., Пестов А.В., Привар Ю.О., Борода А.В., Братская С.Ю. <b>СТИМУЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ ИМИНОВ ХИТОЗАНА И ЕГО КАРБОКСИАЛКИЛИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ</b> .....	138
Широкова Л.Н., Александрова В.А. <b>ПЕРЕВОД НАНОЧАСТИЦ ЖЕЛЕЗА ИЗ МИЦЕЛЛЯРНОГО РАСТВОРА В ВОДНЫЙ РАСТВОР ПОЛИМЕРА КАРБОКСИМЕТИЛХИТИНА</b> .....	139

Малинкина О.Н., Приданкина Д.В., Астанкова А.С., Ушакова О.С., Шиповская А.Б. <b>ФОРМИРОВАНИЕ И СВОЙСТВА Si-ГЛЮКОМАННАН-ХИТОЗАНСОДЕРЖАЩИХ ГЛИЦЕРОГИДРОГЕЛЕЙ</b> .....	144
Большаков И.Н., Левенец А.А. <b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ КОСТНОГО ДЕФЕКТА КРИТИЧЕСКИХ РАЗМЕРОВ В ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДИФИЦИРОВАННОГО ХИТОЗАНА У ЖИВОТНЫХ С СУБКОМПЕНСИРОВАННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ I ТИПА</b> .....	146
Красочко П.А., Албулов А.И., Фролова М.А., Красочко И.А., Еремец В.И., Зелинская Э.И., Варламов В.П. <b>ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ХИТОЗАНА ДЛЯ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ</b> .....	151
Албулов А.И., Фролова М.А., Красочко П.А., Красочко П.П., Гринь А.В., Елисеев А.К. <b>ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИТОЗАНА В КАЧЕСТВЕ АДЪЮВАНТА ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ</b> .....	155
Шуршина А.С., Афанасьева М.А., Самородов А.В., Кулиш Е.И. <b>ОПТИМИЗАЦИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ПОЛИМЕРА ПРИ СОЗДАНИИ ЖИДКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ</b> .....	159
Дубашинская Н.В., Бокатый А.Н., Скорик Ю.А. <b>СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ КОЛИСТИНА С МОДИФИЦИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ</b> .....	162
Зайцев С.Д., Леднев И.Р., Апрятина К.В., Саломатина Е.В., Смирнова Л.А. <b>ТЕРМОПЛАСТИЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И ПОЛИЛАКТИДА</b> .....	163
Горшкова Н.А., Бровко О.С., Паламарчук И.А., Богданович Н.И., Ивахнов А.Д., Боголицын К.Г. <b>СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕКСТУРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК КОМПОЗИЦИОННЫХ АЛЬГИНАТ-ХИТОЗАНОВЫХ АЭРОГЕЛЕЙ</b> .....	167
Апрятина К.В., Бобрынина Е.А., Моница А.П., Черкасова Е.И., Смирнова Л.А. <b>БИОСОВМЕСТИМЫЕ ПЛЕНКИ НА ОСНОВЕ БЛОК-СОПОЛИМЕРА ХИТОЗАНА И КОЛЛАГЕНА</b> .....	170
Демина Т.С., Глотова Е.В., Попырина Т.Н., Аكوпова Т.А. <b>ПОКРЫТИЯ ИЗ ХИТОЗАНА НА МИКРОЧАСТИЦАХ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ</b> .....	174
Иванов П.Л. <b>ПЕРСПЕКТИВЫ КОММЕРЦИАЛИЗАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ В МЕДИЦИНСКОЙ ОТРАСЛИ</b> .....	176
Давыдова В.Н., Володько А.В., Горбач В.И., Чусовитина С.В., Соловьева Т.Ф., Ермак И.М. <b>ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ХИТОЗАНА НА СПОСОБНОСТЬ ЛПС ВЗАИМОДЕЙСТВОВАТЬ С КЛЕТКАМИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ</b> .....	177
Шагдарова Б.Ц., Коновалова М.В., Свирщевская Е.В. <b>ВЛИЯНИЕ ХИТОЗАНА И ГЕКСАНОИЛ ХИТОЗАНА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ЛИНИЙ КЛЕТОК ЗТЗ И ЗТЗ-L1</b> .....	178
Соловьева А.Б., Каплин В.С., Аксенова Н.А., Копылов А.С., Шершнева И.В., Тимашев С.Ф. <b>МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ, ФОРМИРУЕМЫЕ ПРИ МОДИФИКАЦИИ СИНТЕТИЧЕСКИХ И БИОПОЛИМЕРОВ В СВЕРХКРИТИЧЕСКОМ ДИОКСИДЕ УГЛЕРОДА</b> .....	182
Корель А.В., Самохин А.Г., Землякова Е.О., Пестов А.В., Блинова Е.А., Зеликман М.В., Ткаченко В.О., Беца В.Д., Кретьен С.О., Аржанова Е.Л., Литвинова Е.А.	



<b>КАРБОКСИЭТИЛХИТОЗАН СШИТЫЙ ГЛУТАРАЛЬДЕГИДОМ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ГЕЛЕВЫЙ НОСИТЕЛЬ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ .....</b>	<b>184</b>
Горшкова М.Ю., Григорян Э.С., Волкова И.Ф. <b>ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ХИТОЗАНА, РАСТВОРИМЫЕ В НЕЙТРАЛЬНЫХ СРЕДАХ – СРЕДСТВО ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ И ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА: ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА .....</b>	<b>189</b>
Бровко О.С., Паламарчук И.А, Горшкова Н.А., Богданович Н.И, Ивахнов А.Д., Боголицын К.Г. <b>ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ КОМПОЗИЦИОННЫХ АЭРОГЕЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА АЛЬГИНАТ- ХИТОЗАН В БИМЕДИЦИНЕ .....</b>	<b>191</b>
Аксенова Н.А., Копылов А.С., Шершнева И.В., Тимофеева В.А., Савко М.А., Зархина Т.С., Соловьева А.Б. <b>ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ХИТОЗАН–АЛЬГИНАТ КАК НОСИТЕЛЬ ДЛЯ ТЕТРАФЕНИЛПОРФИРИНОВ В СИСТЕМАХ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ РАН .....</b>	<b>193</b>
Казанцев Д.А., Хапко С.Л., Нестеров Д.В., Пестов А.В. <b>ФОРМИРОВАНИЕ ГИДРОГЕЛЕЙ ХИТОЗАНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АЦЕТАЛЕЙ ГЛИЦИДОЛА КАК СШИВАЮЩИХ РЕАГЕНТОВ .....</b>	<b>195</b>
Веретенникова Е.А., Пестов А.В., Землякова Е.О., Друкаренко Н.А., Каманцев И.С., Кузнецов А.В., Жиликов А.В., Чернядьев С.А. <b>ГИДРОГЕЛЕВЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ КАРБОКСИАЛКИЛХИТОЗАНОВ В ЛЕЧЕНИИ ОСТЕОАРТРИТА .</b>	<b>198</b>
Базылева К.Ю., Шарикова Н.А., Волков Д.А., Малахов С.Н., Григорьев Т.Е. <b>ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ЗАМОРОЗКИ ПОЛИМЕРНЫХ РАСТВОРОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОПОРИСТЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ .....</b>	<b>200</b>
Трухин Ф.О., Шатилов Р.А., Патлай А.А., Белоусов А.С., Шмелёв М.Е., Кумейко В.В., Силантьев В.Е. <b>ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ НАНОРАЗМЕРНЫЕ ЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ПЕКТИНА И ХИТОЗАНА ДЛЯ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА .....</b>	<b>202</b>

# Секция 1. ИСТОЧНИКИ ХИТИНА, ПОЛУЧЕНИЕ, АНАЛИЗ И СВОЙСТВА ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

## ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА ХИТИНА И ХИТОЗАНА

**В.Ю. Новиков**

*Полярный филиал ФГБНУ «ВНИРО» («ПИНРО им. Н. М. Книповича»),  
ул. Академика Книповича, дом 6, Мурманск, 183038, Россия  
E-mail: nowitaly@yandex.ru*

### **1. Основные источники промышленного производства хитина и хитозана**

Хитин широко распространен в природе. Запасы этого природного полисахарида оцениваются примерно в  $10^{12}$ – $10^{14}$  тонн [1]. В отличие от своего аналога целлюлозы, хитин присутствует в природе в дисперсной форме и входит в состав экзоскелетов ракообразных и насекомых, клеточных стенок грибов и диатомовых водорослей. Поэтому основным фактором для промышленного использования хитина является доступность сырья. В настоящее время почти весь хитин извлекается из панцирьсодержащих отходов (ПСО) переработки ракообразных. Хитозаны встречаются в биосфере реже и связаны с клеточными стенками некоторых грибов и водорослей.

В настоящее время пригодными для промышленного освоения источниками хитина являются также не утилизируемые отходы от производства шелка, подмор пчел, грибы, микроорганизмы.

1) Первое место занимают ПСО от промысла и промышленной переработки крабов, лангустов, креветок. Обычно производство хитозана привязано к сырьевому источнику и развивается в странах, занимающихся ловом и переработкой ракообразных. Наибольшая доля ПСО при производстве хитозана приходится на панцирь креветок. Хитозан из креветок доминирует на рынке с рыночной стоимостью около 36 млрд. долл. США в 2023 году, что составляет 54,9 % от остального рынка хитозана.

Преимущества ПСО ракообразных:

- ПСО являются практически даровым сырьем – отходами пищевой продукции;
- технология переработки крабов позволяет легко собирать и отделять ПСО;
- производство хитина и хитозана хорошо отработано и легко контролируется.

Недостатки:

- привязка к районам переработки ракообразных;
- возможное ограничение объемов в соответствии с квотами на вылов;
- нестабильные показатели сырья, зависящие от сезона вылова, технологии переработки ракообразных, условий хранения ПСО и др.;
- использование химических реагентов, вызывающих загрязнение окружающей среды;
- возможная аллергия на продукты из ракообразных.

2) Практически неограниченный и быстро возобновляемый альтернативный источник хитина – насекомые, содержание хитина в которых составляет до 40 % их экзоскелета [2-4]. Существуют разработки по получению хитозана из личинок мух Чёрная львинка (лат. *Hermetia illucens*) [5, 6], подмора пчел [7, 8], куколок тутового шелкопряда [9, 10].

Производство хитозана из личинок Чёрной львинки (лат. *Hermetia illucens*) организовано, например, французской фирмой SFly (<http://sflyproteins.com/>).

Основное преимущество состоит в том, что это – легко возобновляемый ресурс.

Недостатки:

- нет промышленного сбора и переработки насекомых;
- наличие окрашенных пигментов, меланина.

3) В качестве потенциального источника хитина и хитозана рассматривают биосинтез хитина микроорганизмами, например грибами [11, 12].

Преимущества:

- наличие существующих микробиологических производств, мощности которых могут использоваться для культивирования грибов и получения мицелия, содержащего хитин;
- из-за низкого содержания золы не требуется этап деминерализации;
- отсутствие пигментов также исключает процесс обесцвечивания хитина;
- качество хитина и хитозана мало подвержено влиянию сезонности, продукты характеризуются стабильностью и однородностью свойств;
- технологический процесс легко контролировать;
- отсутствие аллергенных белков.

Недостатки:

- меньшие объемы биомассы по сравнению с ракообразными;
- потенциальные риски распространения патогенных грибков;
- более низкая ММ грибковых хитозанов.

## **2. Рынок хитина и хитозана**

Рынок хитина, хитозана и их производных в настоящее время в мире очень быстро развивается, включая хитин, хитозан, порошкообразный хитозан, олигомеры хитина и хитозана, глюкозамин и производные хитина и хитозана.

К сожалению, трудно точно оценить рынок хитозана в тоннах в год. Ориентировочные данные можно извлечь из обзора [13]. Мировой рынок хитина и производных хитозана оценивался в 106,9 тыс. т в 2020 году и по прогнозам достигнет 281,7 тыс. т. к 2027 году. Средний прирост выпуска составит 14,8 % в год. Производство хитозана будет расти на 16,9 % в год и достигнет объема 173,9 тыс. т к концу 2027 года. Рынок США составил 31 тыс. т в 2020 году. Китай достигнет объема рынка в 48,5 тыс. т.к. 2027 году с темпами роста в 14,1 % в год.

В публикуемых отчетах по анализу рынка хитина, хитозана и их производных все прогнозы даются в млн долл. США. Например, Future Market Insights, Inc. (<https://www.futuremarketinsights.com/>) выпустила несколько аналитических отчетов по перспективам рынка хитина, хитозана и их производных до 2033 года. Ожидается, что в 2023 году мировой рынок хитозана достигнет 1343,2 млн долларов США, а в период с 2023 по 2033 год его темпы роста составят 14,3 %. Спрос на хитозан к 2033 году, вероятно, превысит 5112,14 млн долл. США.

Основные области применения хитина и производных хитозана включают водоподготовку, косметику и туалетные принадлежности, продукты питания и напитки, здравоохранение/медицину и агрохимию.

Ключевые области применения хитозана включают здравоохранение для лечения туберкулеза, рака и диабета, нутрицевтики и сельское хозяйство для производства биопестицидов, покрытия листьев для обработки семян и др. В пищевой промышленности и производстве напитков, хитозан используется в качестве натурального консерванта вместо

синтетических ингредиентов и упаковочного материала, а также качестве антимикробного агента и антиоксидантной добавки в продуктах питания и напитках. В винодельческой промышленности хитозан давно применяется для осветления вина. В фармацевтической промышленности хитин и хитозан используются для изготовления таблеток с пролонгированным высвобождением лекарственных средств, систем имплантатов с устойчивым высвобождением для длительной доставки гормонов. Мембраны на основе хитозана предложены для искусственных почек благодаря их высокой прочности на разрыв. Широкой областью применения хитозана является косметика.

Олигосахариды хитозана находят применение в производстве продуктов питания, напитков, косметики, очистка сточных вод, в качестве экологически чистого материала в производстве органических удобрений и фунгицидов, средств для обработки семян и активаторов растений.

Оценки рынка различных форм хитина и хитозана приведены в таблице 1.

*Таблица 1*

**Оценка рынка хитина, хитозана и их производных на десятилетие 2023–2033 гг.**

	CAGR (Совокупный среднегодовой темп роста), %	Рыночная стоимость 2033, млрд долл. США
Хитин	12.1	5.03
Хитозан	14.3	5.11
Порошкообразный хитозан	6.4	6.34
Олигосахариды хитозана	14.0	9.80
Олигосахариды хитозана и глюкозамин	9.3	5.78
Производные хитина и хитозана	15.4	38.27

По оценкам разных аналитических компаний, рост производства хитозана к 2033 году будет сохраняться в среднем по 14–20 % в год. Среди стран-производителей хитозана лидируют Германия, Япония, США, Китай и Индия.

Herpe Medical Chitosan GmbH разработала ряд продуктов из хитозана для использования в медицинских целях, включая перевязочные материалы и системы доставки лекарств. Корпорация G.T.C. Bio разработала продукт из хитозана, который может использоваться в качестве противомикробного агента в пищевой промышленности. Компания Axio Biosolutions в 2019 году представила MaxioCel, раневую повязку нового поколения на основе хитозана. Компания Panvo Organics в 2021 году запустила новую линию веганских глюкозаминовых продуктов под названием Vegamine. В том же году компания Yantai Shuangta Food Co., Ltd. выпустила порошок олигосахаридов хитозана для функциональных пищевых продуктов. Хитозановые продукты, такие как ChitoClear, MicroChitosan NutriCology и Chitoseen-F, предлагаются на рынке в качестве жиропонижающих, антиоксидантных и холестеринаснижающих средств.

**3. История создания технологии хитина и хитозана на Северо-Западе России**

В нашей стране с начала исследований хитина основное внимание уделялось панцирю ракообразных. Это было связано с переработкой ракообразных и образованием больших объемов панцирь содержащих отходов, утилизация которых была весьма проблематичной. Поэтому перед рыбной промышленностью встал вопрос переработки панцирей с получением продуктов, которые могут найти применение в народном хозяйстве.

Крупномасштабные исследования по созданию промышленного производства хитозана в Советском Союзе начались в семидесятые годы 20-го столетия сначала на Дальнем Востоке, где была в то время огромная сырьевая база краба, затем в Мурманске [14].

С 1979 г. по заданию ВРПО «Севрыба» в ПТО «Севтехрыбпром» при сотрудничестве с ИВС АН СССР и ВНПО Бумпром (г. Ленинград) были начаты НИР и технологические работы по разработке технологии хитина и хитозана из ПСО антарктического криля и северной креветки для целлюлозно-бумажной промышленности. Харьковским институтом «Гипрохимреактив» был выполнен проект завода с производительностью 80 т хитозана в год.

Во второй половине 1980-х годов начались НИР по разработке технологии получения D(+)-глюкозамина гидрохлорида. В 1995 г. Фармакологический государственный комитет МЗ РФ рекомендовали субстанцию глюкозамина гидрохлорида к медицинскому применению. Промышленное производство субстанции глюкозамина гидрохлорида было размещено на производственной базе ООО «Экобиотек-Мурманск» на территории ОАО «Протеин».

В связи с перестройкой и развалом экономики страны производство хитозана в Мурманске так и не было организовано, а выпуск D(+)-глюкозамина гидрохлорида продолжался небольшими партиями до окончания срока лицензии (2005 года). После 2005 года никаких реальных шагов по возрождению производства хитозана или глюкозамина не предпринималось. Несмотря на начавшийся в 2000-х годах лов камчатского краба в Баренцевом море, в Мурманске производство хитина и хитозана не развивалось. Причина состояла в общем спаде производства и отсутствии ПСО крабов, так как переработка уловов шла в море, и все отходы, включая карапаксы крабов, сбрасывались за борт. Лов креветки также не предусматривал организованный сбор ПСО, так как ранее существовавшая производственная линия по шелушению креветки была ликвидирована. «Хитозановый бум» 70-80-х годов прошлого века в Мурманске сошел на нет.

#### **4. Современное состояние в области промышленного производства хитозана в Мурманске**

Исследования в области получения и исследования свойств хитина и хитозана в Мурманске проводятся до настоящего времени в основном с чисто научной точки зрения в ПИНРО и МГТУ. Эти исследования направлены на поиск новых морских источников хитина, изучение факторов, позволяющих регулировать в широких диапазонах степень деацетилирования (СД) и молекулярную массу (ММ) хитина и хитозана. Исследования в области механизма реакции деацетилирования хитина мы суммировали в обзорной статье [15].

Новый интерес к хитозану возник в связи с созданием в Мурманске ООО «Антей-Север», которое организовало переработку живых крабов (камчатского и краба-стригуна опилио) на береговом предприятии. В 2022 году вылов крабов компанией «Антей» в России составил около 18400 т, в том числе в Северном промысловом бассейне – 39,3 % (около 7231 т). В 2021 году ООО «Антей Север» обратилось в ПИНРО с предложением разработать технологии переработки отходов крабов с получением хитозана, ферментных препаратов и жира.

Наши исследования позволили предложить комплексную схему утилизации отходов промпереработки камчатского краба и краба-стригуна. В случае с камчатским крабом рассматриваются только карапаксы, так как конечности в панцире являются конечным продуктом и отправляются на рынок. Выход хитозана из карапаксов составляет 0,18 % от массы целого краба. Новым сырьем для получения хитина и хитозана стали жабра камчатского краба [16]. Выход хитина из них составляет почти 50 % от выхода хитина из карапаксов краба

или 0,09 % от целого краба. Хитин из жабр аналогичен хитину панциря краба, но имеет свои преимущества (тонкая пленка, отсутствие пигментов, меньше минеральных веществ).

Организация производства неразрывно связана с рынком сбыта. В нашей стране практически все производители используют хитиновые препараты, закупаемые в других странах, в первую очередь в Китае, Индии и Германии. В настоящее время мы получили предложение на 2 т хитозана в год для медицинского применения от ООО «Эверс». Главная причина – нестабильность показателей хитозана, закупаемого в Китае. Нам удалось изготовить опытные партии, удовлетворяющие требованиям заказчика: СД не менее 90 %, ММ не менее 100 кДа. Для получения стабильных показателей качества, чистоты препарата и возможности регулирования свойств получаемого хитозана необходима установка специального оборудования.

### **5. Особенности технологии получения и регулирования свойств хитина и хитозана**

Технология получения хитозана включает стадии депротеинизации, деминерализации, деацетилирования.

Основные претензии к организации производства хитозана выдвигаются экологами, которые считают такое производство чрезвычайно грязным, способным негативно повлиять на окружающую среду. Но «протестанты» совершенно не учитывают возможности оборотного использования растворов реактивов. Во-первых, 50 %-ный раствор щелочи используется многократно для деацетилирования. Во-вторых, разбавленные растворы после промывки хитозана направляются на предыдущие стадии депротеинизации панциря, а также могут использоваться для обязательной мойки технологического оборудования и в других процессах.

Предлагаемая нами технология получения хитина и хитозана – традиционная.

1) Депротеинизация панциря или жабр проводится с помощью раствора щелочи (4 % NaOH при 25–95°C) или ферментного препарата (0.3–0.6 % ФП при 50 °C). При щелочной депротеинизации с целью более полной утилизации белковых веществ желательно снижать температуру до 30–40°C. В результате основная часть растворенных белков (до 80 %) может быть осаждена в изоэлектрической точке (pH 5.5) [17]. В последнее время отдается предпочтение ферментативной депротеинизации с получением ферментативного белкового гидролизата. При переработке жабр целесообразность ферментативной депротеинизации возрастает, так как массовая доля белков в жабрах в 3 раза выше, чем в панцире краба [16].

2) Деминерализация предназначена для удаления минеральных солей кальция и магния. Для увеличения выхода осажденных солей из кислотных фильтратов мы предложили применять для нейтрализации раствор карбоната натрия. В это случае происходит осаждение до 85 % всех минеральных веществ, что значительно очищает сточные воды от солей [17].

На стадии деминерализации существует возможность регулирования ММ хитина и хитозана, варьируя концентрацию HCl, температуру и продолжительность процесса [18].

3) Повторная депротеинизация щелочью (1–4 % NaOH) при температуре 85–95°C позволяет удалить остатки белков, в том числе из пор хитина, образовавшихся после деминерализации, и окрашенных соединений вместе и липидами. При обработке ПСО креветки и криля после второй депротеинизации получается практически белый хитин. В случае ПСО камчатского краба или краба-стригуна опилю желаемый эффект может быть получен при повторении деминерализации и депротеинизации или при последующем многократном деацетилировании.

4) Получение хитозана осуществляется деацетилированием хитина в 50 % NaOH при повышенной температуре. Использование кратной обработки позволяет изготавливать

хитозан с СД от 60 до 100 %. Обычно, ММ получаемого хитозана составляет 250–270 кДа. На стадии деацетилирования ММ можно регулировать окислительной деполимеризацией, например, при действии перекиси водорода или с помощью молекулярного кислорода. В настоящее время нами начаты исследования по деполимеризации хитина и хитозана промышленными комплексными гликозидазами.

Таким образом, в настоящее время сложились все условия для организации промышленного производства хитозана из ПСО крабов в Мурманске.

### Список литературы

1. Bastiaens L., Soetemans L., D'Hondt E., Elst K. Sources of chitin and chitosan and their isolation // In: Chitin and Chitosan: Properties and Applications / L. A. M. Van Den Broek, C. G. Boeriu (Eds.). Hoboken, Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2020, P. 1–34.
2. Khayrova A., Lopatin S., Varlamov V. Obtaining chitin, chitosan and their melanin complexes from insects // Int. J. Biol. Macromol. 2021. Vol. 167. P. 1319–1328.
3. Mohan K., Ganesan A. R., Muralisankar T. et al. Recent insights into the extraction, characterization, and bioactivities of chitin and chitosan from insects // Trends Food Sci. Technol. 2020. Vol. 105. P. 17–42.
4. Ma J., Faqir Y., Tan C., Khaliq G. Terrestrial insects as a promising source of chitosan and recent developments in its application for various industries // Food Chem. 2022. Vol. 373. 131407.
5. Khayrova A., Lopatin S., Varlamov V. Black soldier fly *Hermetia illucens* as a novel source of chitin and chitosan // Int. J. Sci. 2019. Vol. 8, N 4. P. 81–86.
6. Lee Y. H., Kim S. C., Nam K. D. et al. Chitosan isolated from black soldier flies *Hermetia illucens*: Structure and enzymatic hydrolysis // Process Biochem. 2022. Vol. 118. P. 171–181.
7. Ихтиярова Г. А., Маматова Ш. Б., Курбанова Ф. Н. Получение хитина и хитозана из медоносного местного пчелиного подмора *Apis Mellifera* // Universum: Технические науки. 2018. № 5(50).
8. Kaya M., Mujtaba M., Bulut E. et al. Fluctuation in physicochemical properties of chitins extracted from different body parts of honeybee // Carbohydr. Polym. 2015. Vol. 132. P. 9-16.
9. Бекчанов И. К., Рашидова С. Ш. Технологическая линия получения природных полисахаридов – хитина и хитозана *Bombyx mori* // Universum: Технические науки. 2019. № 12(69).
10. Battampara P., Sathish T. N., Reddy R. et al. Properties of chitin and chitosan extracted from silkworm pupae and egg shells // Int. J. Biol. Macromol. 2020. Vol. 161. P. 1296–1304.
11. Abo Elsoud M. M. Fungal chitin and chitosan // In Encyclopedia of Mycology / Eds. O. Zaragoza & A. Casadevall. Oxford: Elsevier, 2021. P. 205–217.
12. Crognale S., Russo C., Petruccioli M., D'Annibale A. Chitosan production by fungi: Current state of knowledge, future opportunities and constraints // Fermentation. 2022. Vol. 8. # 76.
13. Perez S.; Wertz J.-L. Chitin and Chitosans in the Bioeconomy. Boca Raton, London: Taylor & Francis Group, LLC, 2022. 173 p.
14. Новиков В. Ю., Коновалова И. Н., Долгопятова Н. В. Химические основы технологии получения хитина и его производных из панциря ракообразных. СПб : ГИОРД, 2012. 208 с.
15. Novikov V. Yu., Derkach S. R., Konovalova I. N. et al. Mechanism of heterogeneous alkaline deacetylation of chitin: A review // Polymers. 2023. Vol. 15, N 7. # 1729.
16. Novikov V. Yu., Rysakova K. S., Shumskaya N. V. et al. A. King crab gills as a new source of chitin/chitosan and protein hydrolysates // Int. J. Biol. Macromol. 2023. Vol. 232. # 123346.

17. Новиков В. Ю., Мухин В. А., Харзова Л. П. Комплексная переработка панциря ракообразных // ЖПХ. 2000. Т. 73, № 9. С. 1533–1537.
18. Долгопятова Н. В., Новиков В. Ю., Коновалова И. Н. Влияние степени деацетилирования на скорость кислотной деструкции хитина и хитозана и выход D(+)-глюкозамина гидрохлорида // ЖПХ. 2011. Т. 84. № 10. С. 1734–1738.

## **СЛОЖНОСТИ И ВЫЗОВЫ НА ПУТИ КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ОТХОДОВ КРАБА**

**А.А. Миргородов**

*ГК «Русский краб», ул. Западная, дом 7, Владивосток, 690090, Россия*

*E-mail: a.mirgorodov@mail.ru*

Известно множество статей и научных публикаций, обосновывающих важность и значимость комплексной переработки отходов краба, остающихся при выпуске «стандартной» пищевой продукции у изготовителей.

Тем не менее до сих пор в России и мире лишь единичные предприятия занимаются переработкой отходов от краба с выпуском дополнительного ассортимента продукции в виде: хитозана, БАДов и других продуктов.

Целью данного доклада является желание показать заинтересованным лицам со стороны производителя крабовой продукции те препятствия, с которыми он сталкивается на пути переработки отходов краба, а также условия, при которых изготовителям крабовой продукции станет рентабельно заниматься выпуском дополнительного ассортимента из отходов крабовой продукции.

В докладе мы коснёмся: обзора ключевых игроков на рынке добычи краба в РФ; способов и условий добычи и переработки краба, которые они используют; путей движения возникающих отходов от переработки краба и тех причин, по которым изготовители крабовой продукции к ним прибегают.

В конце доклада каждый сам сможет себе ответить на вопрос, настолько ли большой объём доступных отходов крабовой продукции на рынке сегодня, и что надо сделать, чтобы разговоры о выпуске значимого дополнительного ассортимента крабовой продукции в РФ сегодня действительно стали явью.



## РЕГУЛИРОВАНИЕ СВОЙСТВ ХИТОЗАНА

**Н.В. Шумская<sup>1</sup>, В.Ю. Новиков<sup>1</sup>, Н.В. Долгопятова<sup>2</sup>, Н.В. Коновалова<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Полярный филиал ФГБНУ «ВНИРО» («ПИНРО им. Н. М. Книповича»),  
ул. Академика Книповича, дом 6, Мурманск, 183038, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «МГТУ», ул. Спортивная, дом 13, Мурманск, 183010, Россия  
E-mail: nowitaly@yandex.ru

Применение хитозана охватывает различные области, начиная с очистки сточных вод и заканчивая медициной и биотехнологией [1]. Поэтому при реализации производства хитозана необходимо предусматривать возможности тонкой регулировки основных показателей препарата – степени деацетилирования (СД) и молекулярной массы (ММ). Эти показатели могут изменяться на всем протяжении технологического процесса, включая даже заготовку панцирьсодержащих отходов (ПСО) ракообразных.

В настоящем сообщении мы представили изучение регулирования свойств хитозана на стадиях деминерализации панциря и деацетилирования хитина.

Деминерализация в кислой среде вызывает расщепление как гликозидных, так и ацетамидных связей в молекуле хитина. Это влияние можно усилить или ослабить изменением концентрации кислоты, температуры и длительности обработки панциря. Ранее нами была изучена кислотная деструкция чистого хитина [2–4], которая показала зависимости изменение ММ и СД от условий кислотной обработки. Интерес представило использование этого эффекта при деминерализации ПСО, которое можно использовать непосредственно при получении хитина, без добавления отдельной технологической операции.

Вторая стадия технологии, дающий возможность регулирования свойств хитозана – деацетилирование, при котором в первую очередь сильно изменяется СД, но возможно и уменьшение ММ. В настоящее время зависимость СД от условий щелочной обработки хитина изучена подробно [5]. При щелочном деацетилировании хитина в снижении ММ хитозана (аналогично целлюлозе) участвуют два процесса – щелочная и окислительная деструкция гликозидных связей [6]. Щелочная деструкция гликозидных связей зависит от концентрации щелочи, температуры, продолжительности гидролиза [7]. Скорость щелочной деструкции хитина/хитозана незначительная [8], так как гликозидные связи устойчивы к гидролизу в щелочной и нейтральной средах [9], поэтому в щелочной среде можно получать хитозан с высокой СД и ММ. Одним из способов уменьшения ММ хитина/хитозана без изменения СД является окислительная деструкция, при которой расщепляются гликозидные связи и не затрагиваются ацетамидные. В присутствии различных окислителей ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{NaClO}$ ) скорость деструкции хитина/хитозана в растворе щелочи резко увеличивается [9–11]. Известно, что окислительная деструкция хитозана может быть вызвана также молекулярным кислородом воздуха [12], но детального изучения этого явления до недавнего времени не проводилось. В работе [13] показано, что при деацетилировании в инертной атмосфере получается хитозан с большей характеристической вязкостью по сравнению с образцами, деацетилированными в атмосфере воздуха. Деструкцию полимерной цепи подавляет добавление антиоксидантов и акцепторов радикалов, таких как тиофенол [14]. О целенаправленном использовании кислорода воздуха для окислительной деструкции хитозана впервые сообщалось в 2009 г. в работе [15].

В настоящей работе были изучены способы регулирования ММ и СД при деминерализации панциря крабов и деацетилировании хитина.

### Объекты исследования и методики эксперимента

В качестве объекта исследования использовали карапаксы камчатского краба *Paralithodes camtschaticus*, краба-стригуна опилио (*Chionoecetes opilio*), северной креветки (*Pandalus borealis*) и хитин, полученный из них по традиционной технологии. Хитин получали последовательной депротеинизацией, деминерализацией и повторной депротеинизацией ПСО [16]. Деминерализацию ПСО крабов проводили в 2 моль/дм<sup>3</sup> HCl в течение 1 ч при температурах 25, 50, 75 и 100°C. Деацетилирование хитина проводили в 50 %-ном растворе NaOH при температуре 100,0±0,5 °C и постоянном перемешивании. Было изучено деацетилирование с использованием раствора, первоначально находящегося в равновесии с воздухом, при постоянном насыщении раствора газообразным азотом (0 % O<sub>2</sub>), воздухом (около 20 % O<sub>2</sub>) и кислородной смесью (95 % O<sub>2</sub>). Многократное деацетилирование проводили после промывки и сушки хитозана на предыдущей стадии.

СД определяли методом ИК-спектроскопии по методике, описанной в работе Y. Shigemasa и др. [17]. ИК-спектры снимали на Фурье ИК-спектрофотометре IRTracer 100 («Shimadzu Corp.», Япония) в диапазоне 700–2000 см<sup>-1</sup>. СД (%) рассчитывали по формуле:

$$\text{СД} = (0,7568 - A_{1560}/A_{1079})/0,069,$$

где  $A_{1560}$  и  $A_{1079}$  – оптическая плотность при 1560 и 1070 см<sup>-1</sup>; 0,7568 и 0,069 – эмпирические коэффициенты [17].

ММ определяли вискозиметрическим методом [18] в растворителе 0,334 моль/дм<sup>3</sup> CH<sub>3</sub>COOH и 0,3 моль/дм<sup>3</sup> NaCl при температуре 21,0±0,2°C. ММ рассчитывали по формуле Марка-Куна-Хаувинка:

$$[\eta] = K \cdot \text{ММ}^\alpha,$$

где  $[\eta]$  – характеристическая вязкость хитозана в системе, дл/г;  $K = 3,41 \times 10^{-3}$  и  $\alpha = 1,02$  – эмпирические константы.

### Экспериментальные результаты и их обсуждение

#### 1. Влияние условий деминерализации ПСО на СД и ММ хитозана

При деминерализации ПСО концентрация кислоты выбирается в соответствии с массовой долей минеральных веществ, которые должны быть удалены. Деминерализация депротеинизированного панциря полностью соответствует стехиометрии реакции CaCO<sub>3</sub> с HCl. Полное растворение минеральных солей заканчивается в течение первых 5–10 мин. В реальном производственном процессе, учитывая гетерогенный характер реакции, плотную структуру частиц ПСО краба и наличие белков, количество кислоты и длительность реакции приходится увеличивать [19]. Минимальная концентрация HCl и продолжительность деминерализации определяются массовой долей золы в ПСО. Поэтому в качестве регулирующего фактора можно выбрать один – температуру деминерализации.

Кислота вызывает гидролиз и гликозидной, и ацетамидной связей в молекуле хитина, приводя к снижению ММ и росту СД [4]. В условиях деминерализации ПСО концентрация кислоты резко снижается в первые минуты реакции. Результаты изменения СД хитина при деминерализации при разных температурах и СД и ММ хитозана, полученного из каждого образца хитина приведены в Таблице 1 (на примере ПСО краба-стригуна опилио).

СД хитина и хитозана практически не изменилась при увеличении температуры деминерализации. Гликозидная связь оказалась менее устойчивой и легко гидролизовалась при повышении температуры деминерализации. Таким образом, изменяя температуру деминерализации можно изменять ММ в широком диапазоне значений.

Таблица 1

**Зависимость показателей хитина и хитозана, полученных из панциря краба-стригуна опило от температуры деминерализации**

Температура, °С	СД хитина, %	СД хитозана, %	ММ хитозана, кДа
25	9,49±2,5	66,75±3,5	236,7±12,0
50	9,46±3,0	67,85±4,0	79,1±9,0
75	9,09±3,5	62,46±4,5	45,6±6,0
100	9,54±3,5	68,16±4,0	44,4±3,0

2. Влияние O<sub>2</sub> на СД и ММ хитозана при деацетилировании хитина

Наличие растворенного O<sub>2</sub> в реакционной смеси оказывает различное влияние на изменение СД и ММ хитозана при деацетилировании.

Кинетика деацетилирования хитина не зависит от состояния газообразной атмосферы, находящейся в контакте с реакционным раствором (рис. 1, А). Этот факт объясняется тем, что реакция деацетилирования (расщепления ацетамидной связи) является реакцией нуклеофильного замещения второго порядка S<sub>N</sub>2 [16] и не зависит от присутствия окислительных радикалов [20].

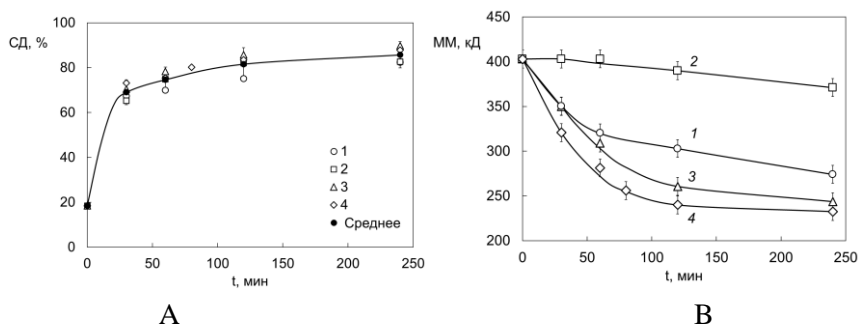


Рис. 1. Кинетические кривые деацетилирования (А) и деструкции (В) хитина: без принудительного барботирования газов

(1), при постоянном насыщении раствора азотом (2), воздухом (3) и кислородом (4)

Кинетические кривые деструкции хитозана в присутствии различных концентраций молекулярного кислорода приведены на рис 1, В. В деаэрированной среде при барботировании реакционной смеси N<sub>2</sub> (кривая 2) скорость деструкции хитозана самая низкая и определяется, вероятно, механизмом щелочной деструкции гликозидных связей [21], а именно реакцией по механизму нуклеофильного замещения S<sub>N</sub>1. Гликозидная связь в полисахаридах, аналогично простой эфирной связи, в отсутствие окислителей демонстрирует высокую устойчивость в щелочной среде [8].

В присутствии O<sub>2</sub> наблюдается резкое снижение ММ (кривые 1, 3, 4). Предполагается, что в этих условиях расщепление гликозидных связей в щелочной среде происходит по свободнорадикальному механизму [21]. В процессе реакции концентрация O<sub>2</sub> снижается и

скорость деструкции уменьшается после 50 мин от начала реакции без барботирования кислородсодержащей газовой смеси (кривая 1).

При барботировании смесью, содержащей кислород, скорость деструкции гликозидных связей увеличивается с повышением концентрации кислорода (кривые 3 и 4). Через 2 ч после начала реакции скорость деструкции замедляется. По-видимому, гликозидные связи между деацелированными звеньями полисахарида являются более устойчивыми к окислительной деструкции, чем гликозидные связи между ацелированными звеньями.

### 3. Влияние многократной обработки хитина в концентрированной NaOH.

Кинетика гетерогенного деацелирования не позволяет получить при однократной обработке хитина концентрированным раствором NaOH СД более 80 %. В настоящее время наиболее простым способом является многократное деацелирование [22]. При использовании хитина из разных источников и с разными исходными свойствами хитина СД около 90 % и выше можно получить при трехкратной обработке (Таблица 2).

Таблица 2

#### Молекулярная масса и степень деацелирования хитозана, полученного дискретным многократным деацелированием креветочного и крабового хитина в равновесии с воздухом

Условия	ПСО креветки		ПСО камчатского краба		ПСО краба-стригуна	
	СД, %	ММ, кДа	СД, %	ММ, кДа	СД, %	ММ, кДа
Хитин	18,9±3,0	-	13,0±3,0	-	21,2±3,0	-
ДА-1	68,0±4,0	230,0±12,0	61,6±3,5	584,0±20,0	66,8±3,5	270,7±12,0
ДА-2	80,0±3,5	196,0±12,0	70,6±2,7	527,0±18,0	74,6±3,5	261,0±12,0
ДА-3	86,0±2,7	160,0±12,0	87,2±3,0	340,0±15,0	94,5±3,0	220,0±10,0
ДА-4	90,0±3,0	130,0±10,0	89,5±3,0	316,0±15,0	99,0±3,0	210,0±10,0

### Заключение

Установлено, что кислотная деструкция хитина при деминерализации и окислительная деструкция хитозана под действием молекулярного кислорода при деацелировании приводят к уменьшению ММ хитозана, но не оказывают заметного влияния на СД. СД сильно изменяется при высокой концентрации щелочи и может быть увеличена практически до 100 % при многократном деацелировании. Полученные результаты могут быть использованы для регулирования ММ хитозана независимо от его СД, либо СД при небольшом уменьшении ММ непосредственно в технологических процессах получения хитина и хитозана.

### Список литературы

1. Hasan S., Boddu V.M., Viswanath D.S., Ghosh T.K. Chitin and Chitosan. Science and Engineering. Cham: Springer Nature Switzerland AG, 2022. 429 p.
2. Новиков В.Ю. Кислотный гидролиз хитина и хитозана // ЖПХ. 2004. Т. 77, № 3. С. 490–493.
3. Долгопятова Н.В., Новиков В.Ю., Коновалова И.Н., Кучина Ю.А., Слюдова А.Е. Гетерогенный кислотный гидролиз хитина и хитозана из морских ракообразных // Известия Уфимского научного центра РАН. 2016. № 3(1). С. 30–32.
4. Долгопятова Н.В., Новиков В.Ю., Коновалова И.Н. Влияние степени деацелирования на скорость кислотной деструкции хитина и хитозана и выход D(+)-глюкозамина гидрохлорида // ЖПХ. 2011. Т. 84, № 10. С. 1734–1738.

5. Novikov V.Yu.; Derkach S.R.; Konovalova I.N., Dolgopyatova N.V., Kuchina Yu.A. Mechanism of heterogeneous alkaline deacetylation of chitin: A review // *Polymers*. 2023. Vol. 15, N 7. 1729.
6. Роговин З. А. Химия целлюлозы. – М.: Химия, 1972. 520 с.
7. Chang K.L.B., Lee G., J., Fu W.R. Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution // *Carbohydr. Res.* 1997. Vol. 303, N 3. P. 327–332.
8. Чеботок Е.Н., Новиков В.Ю., Коновалова И.Н. Демполимеризация хитина и хитозана при щелочном деацетилировании // *ЖПХ*. 2006. Т. 79, № 7. С. 1172–1176.
8. Петров А.А. Органическая химия: учеб. для вузов. – СПб.: Иван Федоров, 2002. 624 с.
9. Allan G.G., Peyron M. Molecular weight manipulation of chitosan I: Kinetics of depolymerization by nitrous acid // *Carbohydr. Res.* 1995. Vol. 277, N 2. P. 257–272.
10. Tian F., Liu Y., Hu K., Zhao B. Study of the depolymerization behavior of chitosan by hydrogen peroxide // *Carbohydr. Polym.* 2004. Vol. 57, N 1. P. 31–37.
11. Farias de B.S., Grundmann D.D.R., Rizzi F.Z. et al. Production of low molecular weight chitosan by acid and oxidative pathways: Effect on physicochemical properties // *Food Res. Int.* 2019. Vol. 123. P. 88–94.
12. Bough W.A., Salter W.L., Wu A. C.M., Perkins B.E. Influence of manufacturing variables on the effectiveness of chitosan products. I. Chemical composition, viscosity, and molecular-weight distribution of chitosan products // *Biotechnol. Bioeng.* 1978. Vol. 20, N 12. P. 1931–1943.
13. Lusena C.V., Rose R.C. Preparation and viscosity of chitosan // *J. Fish. Res. Board Canada*, 1953. Vol. 10, N 8. P. 521–522.
14. Domard A., Rinaudo M. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan // *Int. J. Biol. Macromol.* 1983. Vol. 5, N 1. P. 49–52.
15. Zhao X., Kong A., Hou Y. et al. An innovative method for oxidative degradation of chitosan with molecular oxygen catalyzed by metal phthalocyanine in neutral ionic liquid // *Carbohydr. Res.* 2009. Vol. 344, N 15. P. 2010–2013.
16. Новиков В.Ю., Коновалова И.Н., Долгопятова Н.В. Химические основы технологии получения хитина и его производных из панциря ракообразных. – СПб.: ГИОРД, 2012. 208 с.
17. Shigemasa Y., Matsuura H., Sashiwa H., Saimoto H. Evaluation of different absorbency ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin // *Int. J. Biol. Macromol.* 1996. Vol. 18, N 3. P. 237–242.
18. Павлов Г.М., Селюнин С.Г. Скоростная седиментация, молекулярная масса и конформационные параметры некоторых растворимых производных хитина // *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*. 1986. Т. 28, № 8. С. 1727–1731.
19. Орлова Т.А., Новиков В.Ю. 5. Деминерализация панциря криля и креветки при получении хитина и хитозана // *Рыбное хоз-во. Сер. Обработка рыбы и морепродуктов. Отечеств. производств. опыт: Экспресс-информация*. – М.: ЦНИИТЭИРХ, 1987. Вып. 1 ДСП. С. 31–37.
20. Долгопятова Н.В., Новиков В.Ю., Кучина Ю.А., Коновалова И.Н. Влияние условий деацетилирования на физико-химические свойства хитозана из панциря ракообразных // *Изв. вузов. Химия и химическая технология*. 2022. Т. 65, Вып. 5. С. 77–86.
21. Tsaih M.L., Chen R.H. The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan // *J. Appl. Polym. Sci.* 2003. Vol. 88, N 13. P. 2917–2923.
22. Novikov V.Yu., Derkach S.R., Konovalova I.N., Dolgopyatova N.V., Kuchina Yu.A. Mechanism of heterogeneous alkaline deacetylation of chitin: A review // *Polymers*. 2023. Vol. 15, N 7. # 1729.

## ПОДГОТОВКА ПЧЕЛИНОГО ПОДМОРА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ХИТИН-МЕЛАНИНОВОГО КОМПЛЕКСА

П.А. Красочко<sup>1</sup>, А.И. Албулов<sup>2</sup>, И.А.Красочко<sup>1</sup>, С.С. Жахангиров<sup>1</sup>, М.А. Фролова,  
В.И. Еремец<sup>2</sup>, К.М. Федоринова<sup>2</sup>, З.А. Антонова<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Учреждение образования «Витебская государственная академия ветеринарной  
медицины», Витебск, Республика Беларусь

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической  
промышленности, Щелково, Московской области, Российская Федерация

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт физико-химических проблем БГУ,  
Минск, Республика Беларусь

E-mail: info@bioprogress.ru

**Аннотация.** Цель исследования – изучение химического состава пчелиного подмора и его подготовка для получения хитин-меланинового комплекса. Установлено, что подмор состоит из: жиров – 19 %, минеральных веществ – 28 %, белков и аминокислот – 30 %, хитин-меланинового комплекса – 23%. Получение хитин-меланинового комплекса включает стадии обезжиривания, депротеинизации, деминерализации и высушивания на каждом этапе.

**Ключевые слова:** подмор, депротеинизация, деминерализация, обезжиривание, хитин-меланиновый комплекс.

### Введение

Пчелиный подмор – это тела пчел и трутней, которые закончили свою жизнь естественным образом. Подмор – это тельца погибших пчел – летом 26–35 дней, зимой – до 180 дней. Тельце пчелы насыщено практически всеми продуктами пчеловодства: минералы, ферменты, аминокислоты, гормоносодержащие вещества, а также антиоксиданты, гепатопротекторы, природные антибиотики (входящие в состав пчелиного яда). В его составе в формах, легко усваиваемых организмом человек и животных содержится около 27 микроэлементов: от фосфора и калия до железа, магния и цинка.

Одним из самых главных компонентов в составе подмора является хитин. Он оказывает на кишечник очищающее действие, нормализует его микрофлору, не дает образовываться язвам, способствует выводу токсинов и регулирует кислотность в желудке. Благодаря хитину ускоряется синтез витаминов, относящихся к группе В.

В хитиновой оболочке пчел присутствует пигмент меланин, ковалентно связанный с белком и хитином, и, благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам, обеспечивает защиту пчел от действия УФ, ионизирующей радиации, токсического действия тяжелых металлов, эндогенных и чужеродных химических веществ.

Меланин, входящий в состав хитин-меланинового комплекса, обладает иммуномодулирующим, антиоксидантным, антирадиальным и адаптогенным действием, поэтому может служить в качестве основы меланосодержащих биологически активных добавок широкого спектра действия. Черный пигмент может быть отнесен к химически разнородной группе гетероциклических полимерных веществ нерегулярного строения, химическая структура которых до конца не выяснена. По химическому строению, свойствам и видовой принадлежности меланин классифицируется на алло-, фео- и эумеланины.

Меланины из подмора пчел, вероятно, относятся к эумеланинам – черным азотсодержащим пигментам животного происхождения. По структуре они представляют собой полимеры индолил-5,6-хинона с включением его восстановленных форм.

Защитная барьерная функция меланинов диктуется особенностями физико-химических свойств этих веществ и представляется наиболее простым, надежным и универсальным средством изоляции чувствительных клеточных структур от повреждающего действия того или иного фактора.

Возможно, барьерный меланиногенный механизм возник очень давно, когда первичным организмам приходилось в первую очередь защищаться от жесткого ультрафиолета.

В этой связи возрастает интерес к пчелиному подмору, который может быть использован в виде исходного сырья для получения хитин-меланинового комплекса.

Учитывая тот факт, что химический состав продуктов пчеловодства, в том числе и подмора, имеет высокую вариабельность из-за мест обитания пчел, химического состава почвы, ботанического состава растений, а состав подмора будет иметь свой состав для различных регионов обитания пчел.

Цель исследования – изучение химического состава пчелиного подмора и его подготовка для получения хитин-меланинового комплекса.

### **Материалы и методы исследований**

Исследования проводились на кафедре эпизоотологии и инфекционных болезней УО «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины», ООО «Биопрогресс», лаборатории топлив, масел и кормов НИИ физико-химических проблем БГУ, пчелопасеках Витебской и Могилёвской областей.

Обезжиривание пчелиного подмора, его депротеинизация и деминерализация проводилась по методу, описанному А.Ш. Хайровой с соавт [5] в нашей модификации.

Минеральные вещества водного экстракта пчелиного подмора, полученного путем деминерализации с использованием 2% соляной кислоты, определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой на приборе ICP-OES ACTIVA M (Horiba Jobin Yvon, Франция). В качестве стандартного образца для определения концентрации 23 элементов (Ag, Al, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl, Zn) использовали мультиэлементный стандарт IV (фирмы Merck). Согласно качественному анализу элементы Bi, Cd, Co, Cr, Ga, In, Li, Ni, Pb и Tl не были обнаружены, поэтому их количественное определение не проводилось.

Калибровочные растворы, с концентрациями 0; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 мг/кг элементов в качестве фона содержали 5 %  $\text{HNO}_3$ . Пробоподготовка заключалась в переводе всех компонентов пробы в раствор: раствор А – для определения содержания Al, B, Ba, Cr, Cu, Fe, Mn, Sr, Zn (калибровочный диапазон 0-5 мг/кг); раствор Б – для определения содержания Ca, K, Mg, Na (калибровочный диапазон 0-10 мг/кг). Приготовление раствора А: к 10 см<sup>3</sup> водного экстракта приливали 2,5 см<sup>3</sup> концентрированной азотной кислоты и нагревали до полного растворения пробы. Полученный концентрат переносили в мерную колбу на 25 см<sup>3</sup>, доводили его объем дистиллированной водой до метки и перемешивали. Приготовление раствора Б: к 1 см<sup>3</sup> раствора А переносили в мерную колбу на 50 см<sup>3</sup>, доводили его объем дистиллированной водой до метки и перемешивали. Определяли количественное содержание элементов в растворах А и Б, и пересчитывали на водный экстракт пчелиного подмора с учётом разбавления (умножая на 2,5 и 125 соответственно).

Наличие липидов, минералов и протеина определяли по разнице веса обработанного подмора жирорастворителем, щелочью и кислотой. Липиды идентифицировали при помощи цветной реакции с сульфофосфованилиновым реактивом, при которой идет взаимодействие продуктов распада липидов с реактивом, состоящим из ванилина, фосфорной и серной кислот. В ходе реакции развивается розово-красное окрашивание, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации липидов. Белки после гидролиза щелочью превращаются в аминокислоты, промежуточные продукты гидролиза - пептиды и полипептиды. Их наличие определяли методом формольного титрования, суть которого заключается в том, что аминогруппы аминокислот, пептидов и полипептидов вступают в реакцию с формальдегидом с образованием метиленовых производных (метиленаминокислот), которые обладают более сильными кислотными свойствами, чем аминокислоты, и легко оттитровываются щелочью.

### Результаты исследований

Выделение липидов из пчелиных тел подмора проводили путем 3-кратного обезжиривания подмора с помощью растворителя 646 производства «Белнефтехим» (ГОСТ 18188-72). Для этого высушенный при температуре +45°C в течение 24 часов пчелиный подмор (100 г) заливали растворителем 646 из расчета 1:10, перемешивали 1 раз в час и настаивали в течение 1 суток при температуре +20–22°C. После чего отделяли жидкую фракцию на стеклянном фильтре. Процедуру повторяли 3 раза. После последней экстракции тельца пчел высушили и взвешивали.

В результате взвешивания установлено, что липидов в подморе было 19 %. При идентификации экстрагированных липидов при помощи цветной реакции с сульфофосфованилиновым реактивом подтверждено их наличие.

Отделение протеинов из тел пчел проводили путем депротеинизации 5 % раствором гидроокиси натрия в течение 4 часов при температуре +37–40°C. После чего отделяли жидкую фракцию на стеклянном фильтре и промывали дистиллированной водой, высушивали и взвешивали.

В результате взвешивания установлено, что белка в телах пчел было липидов в подморе было 30 %. Их идентификацию проводили методом формольного титрования, что было подтверждено наличие в щелочном гидролизате аминокислот, пептидов и полипептидов.

Наличие минеральных веществ проводили путем деминерализации с использованием 2 % соляной кислоты в течение 24 часов при температуре +20–22°C. После чего отделяли жидкую фракцию на стеклянном фильтре и промывали дистиллированной водой, высушивали и взвешивали.

В результате взвешивания установлено, что минеральных веществ в телах пчел было липидов в подморе было 28 %.

При проведении изучения минерального состава экстрагированных кислотой минеральных веществ из подмора методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой на приборе ICP-OES ACTIVA M (Horiba Jobin Yvon, Франция) получены следующие результаты (таблица 1):

Приведенные в таблице 1 данные свидетельствуют, что подмор состоит в основном из Ca (221.88 мг/кг), K (1078.13 мг/кг), Mg (100.00 мг/кг), Na (78.13 мг/кг). Значительно меньше в подморе было Al, B, Ba, Cu, Fe, Mn, Zn – от 0,4 до 9,38 мг/кг, не обнаружено Bi, Cd, Co, Cr, Ga, In, Li, Ni, Pb, Sr, Tl.



**Сравнение содержания элементов (в мг/кг) в экспериментальной пробе  
с литературными данными**

Элемент	Содержание элементов		
	экспериментальные данные, мг/кг	литературные данные, мг/кг	
	в водном экстракте пчелиного подмора (Беларусь)	[6] в пчелином подморе	[7] в золе от пчелиного подмора
Ag	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено
Al	2.50	не обнаружено	не обнаружено
B	2.98	не обнаружено	не обнаружено
Ba	0.57	20	не обнаружено
Bi	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено
Cd	не обнаружено	0,1	0.09
Co	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено
Cr	не обнаружено	не обнаружено	3.11
Cu	0.40	1.8	15,24
Fe	8.68	7600	30
Ga	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено
In	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено
Li	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено
Mn	5.79	не обнаружено	2,94
Ni	не обнаружено	не обнаружено	0.55
Pb	не обнаружено	0.02	0.49
Sr	0.72	10	0.41
Tl	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено
Zn	9.38	150	68,70
Ca	221.88	2750	495
K	1078.13	23500	5670
Mg	100.00	не обнаружено	не обнаружено
Na	78.13	не обнаружено	не обнаружено

При анализе собственных исследований с литературными можно сделать вывод, что имеется существенная разница в химическом составе подмора, полученном в Республике Беларусь, Украине и Красноярском крае. Это может зависеть от состава химического почв, растений, воды.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что подмор состоит из: жиров – 19 %, минеральных веществ – 28 %, белков и аминокислот – 30 %, хитин-меланинового комплекса – 23 %.

#### Список литературы

1. Биополимеры, иммуномодуляторы и пробиотики в бройлерном птицеводстве / А.П. Дуктов [и др.]. Горки : БГСХА, 2016. 289 с.
2. Берикашвили З. Н. Напиток лечебно-профилактического действия на основе пчелиного подмора/ З.Н. Берикашвили // Пиво и напитки, 2007. Вып. 5. С. 32–33.

3. Ермакова Н. Ю. Технология получения экстракта из пчелиного подмора / Н.Ю. Ермакова и др. // Биотехнология, 2010. Т. 3, № 2. С. 89–95.
4. Использование иммуномодуляторов в бройлерном птицеводстве / А.П. Дуктов [и др.]. Тюмень: ГАУ Северного Зауралья, 2021. 352 с.
5. Красочко П.А. Продукты пчеловодства: свойства, получение, применение / П. А. Красочко, Н. Г. Еремия. 2-е изд., перераб. и доп. Кишинэу; Витебск : Б. и., 2022 (Print-Caro). 723 p.
6. Красочко П.А. Технология продуктов пчеловодства и их применение / П.А. Красочко, Н.Г. Еремия //Учебник для вузов / Санкт-Петербург, Лань, 2022. 660 с.
7. Курдеко А.П. Биологически активные добавки из продуктов пчеловодства в птицеводстве / А.П. Курдеко, М.А. Гласкович, П.А. Красочко // Горки: Белорусская государственная сельскохозяйственная академия, 2011. 304 с.
8. Прикладные аспекты иммуномодуляции ... с использованием средств природного происхождения / П. А. Красочко [и др.]. – Краснодар: КубГАУ, 2021. 398 с.
9. Хайрова А.Ш. Исследование черной львинки как потенциального источника хитозана / А.Ш. Хайрова, С.А. Лопатина, В.П. Варламов // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК. Под редакцией академика РАН А.Я. Самуйленко. М., 2019. С. 251–255.

## **ПОЛУЧЕНИЕ ХИТОЗАНА ИЗ ПОДМОРА ПЧЕЛ И ХРЕБТОВ КАЛЬМАРА. ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЯ**

**Т.Е. Кусков<sup>1,2</sup>, Е.М. Подгорбунских<sup>2</sup>, В.А. Бухтояров<sup>2</sup>, А.Л. Бычков<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup> Новосибирский государственный университет, ул. Пирогова, дом 2,  
Новосибирск, 630090, Россия,  
E-mail: t.kuskov@g.nsu.ru*

*<sup>2</sup> Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН, улица Кутателадзе, 18,  
Новосибирск 630090, Россия  
E-mail: podgorbunskikh@solid.nsc.ru*

Хитин является распространенным природным биополимером, состоящим из звеньев N-ацетилглюкозамина, соединенных с помощью  $\beta$ -1,4-гликозидной связи. В природе хитин существует в виде трех полиморфных модификаций:  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -хитина.  $\alpha$ -Хитин состоит из полимерных цепей, расположенных антипараллельно. В структуре  $\beta$ -хитина цепи полимера расположены параллельно друг к другу. В  $\gamma$ -хитине есть участки как с параллельным, так и с антипараллельным расположением полимерных цепей. Существует предположение, что  $\gamma$ -хитин является смесью  $\alpha$ - и  $\beta$ -хитина, а не отдельной полиморфной модификацией [1].

Хитозан представляет собой деацетилированную производную хитина, получаемую в ходе реакции деацетилирования. Глубина протекания процесса характеризуется степенью деацетилирования (процентное содержание освободившихся аминогрупп). Данный параметр характеризует чистоту продукта реакции. Хитозаном считается продукт реакции, имеющий степень деацетилирования более 50 % [2].

В последние годы наблюдается повышенный интерес к изучению хитозана благодаря его свойствам, таким как биоразлагаемость, нетоксичность и низкая аллергенность, которые

обеспечивают хитозану широкое практическое применение во многих отраслях промышленности: пищевой, бумажной, медицинской, косметической и т.д. [3].

Целью данной работы является получение хитозана из животного сырья на примере подмора пчел и хребтов кальмара, а также оценка степени деацетилирования полученного хитозана различными методами.

В качестве источников  $\alpha$ - и  $\beta$ -хитина были использованы пчелиный подмор (*Apis Mellifera*) и хребты кальмаров (*Loligo vulgarus*) соответственно. Для исходного животного сырья был определен химический состав, который представлен в таблице 1. Содержание белков в подморе пчел и хребтах кальмара определялось с помощью элементного анализа на CHNS-анализаторе EA-3000 (HEKAtech GmbH, Германия). Определение содержания липидов в исходном сырье проводилось с помощью исчерпывающей экстракции гексаном на аппарате Сокслета. Влажность образцов определялась на анализаторе влажности WPS 50 SX (RADWAG, Польша). Зольность образцов определялась согласно ГОСТ Р 56881–2016. Рентгенофазовый анализ (РФА) хитина и продуктов реакции деацетилирования проводился на дифрактометре D8 ADVANCE (Bruker, Германия). Потенциометрическое титрование проводилось на комплекте для автоматического титрования Титрион-1 (ЭЛЕКТРОНПРИБОР, Россия). ИК-спектры образцов хитина и хитозана записывались на ИК-спектрометре Bruker Vertex 70v (Bruker, Германия).

Таблица 1

Химический состав исходного сырья

Образец	Влажность, %	Зольность, %	Липиды, %	Белки, %	Углеводы, %
Подмор пчел	4,4 ± 0,4	13,8 ± 3,1	10,0 ± 0,2	26,3 ± 1,0	45,5 ± 0,7
Хребты кальмара	8,4 ± 0,7	2,4 ± 0,5	-	36,3 ± 1,4	52,9 ± 0,6

Из подмора пчел и хребтов кальмара были получены  $\alpha$ - и  $\beta$ -хитины с выходами 5,9 % и 32,7 % соответственно. Полученные образцы были охарактеризованы методами РФА и СЭМ. Индекс кристалличности (CrI) хитина определяли по методу Focher [4]. К дифрактограммам хитинов были отнесены индексы Миллера согласно литературным данным [1].

В процессе реакции деацетилирования 50 % NaOH в течение 5, 15, 30, 120, 240 и 720 минут согласно схеме, представленной на рисунке 1, из  $\alpha$ - и  $\beta$ -хитина были получены образцы хитозана с различной степенью деацетилирования.

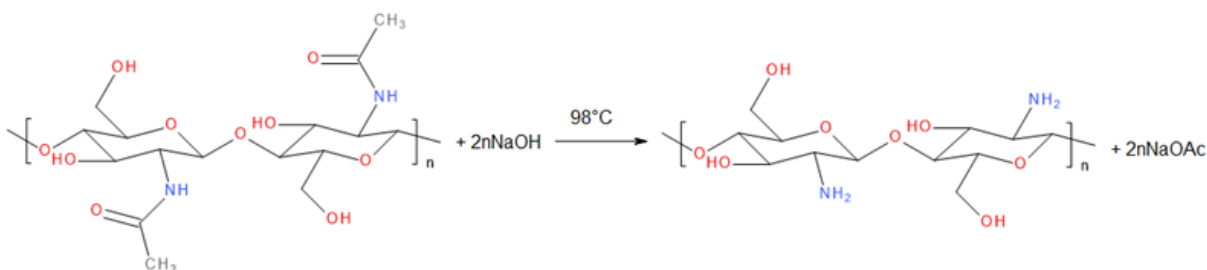


Рис. 1. Схема реакции деацетилирования хитина

Степень деацетилирования, рассчитанная исходя из данных РФА, определялась по значению индекса кристалличности, определенного по рефлексу (020) для  $\alpha$ -хитина и по рефлексу (010) для  $\beta$ -хитина по формуле (1):

$$DDA [\%] = (103,97 - CrI_{(020)/(010)})/0,7529, \quad (1)$$

где  $DDA$  – степень деацетилирования (%),  $CrI$  – индекс кристалличности, измеренный по рефлексу (020) для  $\alpha$ -хитина и по рефлексу (010) для  $\beta$ -хитина (%), 0,7529 – эмпирический коэффициент для пересчета  $CrI$  в  $DDA$ .

Было показано, что в ходе реакции деацетилирования малоугловой пик быстро исчезает, поэтому данный способ подходит для определения степени деацетилирования хитина при малых степенях превращения. Значения степени деацетилирования представлены в таблице 2.

Степень деацетилирования методом потенциометрического титрования определялась по результатам титрования хитозана, растворенного в 0,01 М растворе HCl, 0,1 М раствором NaOH. По объему израсходованного гидроксида натрия в двух точках эквивалентности определялись значения степени деацетилирования, представленные в таблице 2, для каждого образца хитозана по формуле (2):

$$DDA [\%] = \frac{16 \times C_{NaOH} \times (V_2 - V_1)}{m_{aliqu} \times 0,0994} \times 100\%, \quad (2)$$

где  $C_{NaOH}$  – концентрация раствора гидроксида натрия (моль/л),  $V_1$  и  $V_2$  – объем израсходованного гидроксида натрия в первой и второй точках эквивалентности соответственно (л),  $m_{aliqu}$  – масса хитозана в аликвоте (г).

Для каждого из образцов хитина и полученного хитозана были записаны ИК-спектры в диапазоне 400–4000  $\text{см}^{-1}$ . Было проведено соотнесение полос согласно литературным данным [1]. Для определения степени деацетилирования были представлены три формулы, связывающие интенсивность полос с уменьшающейся интенсивностью в ходе реакции и интенсивность полос с неизменной интенсивностью:

$$DDA [\%] = 100 - \left( \frac{A_{1320}}{A_{1420}} - 0,3822 \right) / 0,03133, \quad (3)$$

$$DDA [\%] = 100 \times \left( 1 - \frac{A_{1655}}{1,33 \times A_{3450}} \right), \quad (4)$$

$$DDA [\%] = 100 \times \left( 1 - \frac{A_{1560}}{1,33 \times A_{2875}} \right). \quad (5)$$

Значения степени деацетилирования представлены в таблице 2.

Таблица 2

### Значения степени деацетилирования

	Образец	DDA по РФА (1)	DDA по титрованию (2)	DDA по ИК (3)	DDA по ИК (4)	DDA по ИК (5)
$\alpha$ -	Хитин	25,5 ± 1,3	-	24,5 ± 0,7	-	-
	5 минут	60,5 ± 3,0	-	-	-	-
	15 минут	62,1 ± 3,1	22,5 ± 4,8	58,4 ± 1,7	20,6 ± 0,6	53,3 ± 1,6
	30 минут	32,5 ± 1,6	60,6 ± 7,8	-	-	-
	120 минут	-	64,7 ± 0,4	63,7 ± 1,9	38,5 ± 1,2	48,0 ± 1,4
	240 минут	-	69,1 ± 3,8	-	-	-
	720 минут	-	77,4 ± 4,7	77,5 ± 2,3	49,1 ± 1,5	59,8 ± 1,8
$\beta$ -	Хитин	29,8 ± 1,5	-	25,4 ± 0,8	-	-
	5 минут	55,7 ± 2,8	-	-	-	-
	15 минут	-	77,4 ± 2,9	76,2 ± 2,3	47,9 ± 1,4	55,1 ± 1,7
	30 минут	-	82,5 ± 3,9	-	-	-
	120 минут	-	91,2 ± 3,7	79,4 ± 2,4	64,2 ± 1,9	84,9 ± 2,5
	240 минут	-	90,9 ± 3,4	-	-	-
	720 минут	-	94,1 ± 5,2	83,3 ± 2,5	70,7 ± 2,1	60,4 ± 1,8

Исходя из полученных значений степени деацетилирования, были определены области применимости различных методов определения: РФА применим для определения степени деацетилирования в диапазоне значений до 60 %, потенциометрическое титрование применимо в диапазоне значений от 60 % до 100 %, а ИК-спектроскопия применима в диапазоне значений от 20 % до 80 %.

Для наглядного представления процесса деацетилирования  $\alpha$ - и  $\beta$ -хитина значения степени деацетилирования были конвертированы в степень превращения хитина по формуле (6) и построены в зависимости от времени протекания реакции (Рисунок 2).

$$CD = \frac{DDA - DDA_0}{100 - DDA_0} \times 100\%, \quad (6)$$

где  $DDA_0$  – степень деацетилирования исходного хитина [%].

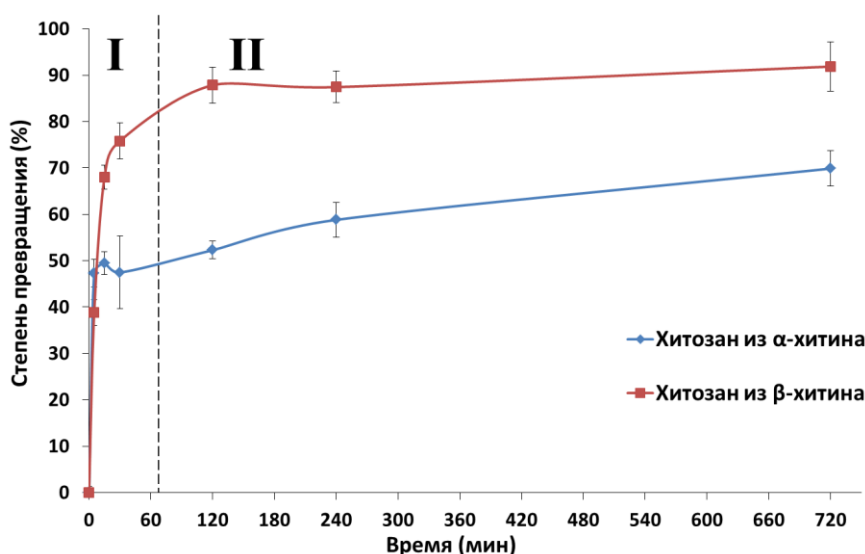


Рис. 2. Зависимость степени превращения хитина от времени протекания реакции

На рисунке 2 видно, что процесс деацетилирования хитина представляет собой два участка: быстрое деацетилирование в начале процесса и последующее замедление реакции после первого часа процесса, что согласуется с наблюдениями, описанными в литературе [5]. Для описания кинетики реакции деацетилирования также были рассмотрены основные модели протекания гетерогенных реакций в системе твердое-жидкое (модели Казеева-Ерофеева-Колмогорова, Яндера и Гистлинга-Броунштейна). По результатам рассмотрения было выяснено, что процесс деацетилирования хитина лимитируется диффузией.

Таким образом, из животного сырья были получены образцы хитозана с различной степенью деацетилирования. На основании полученных значений  $DDA$  обозначены области применимости различных методов определения степени деацетилирования. Показано, что кинетика реакции деацетилирования хитина представляет собой два участка: на первом участке происходит стремительное увеличение степени деацетилирования, а на втором происходит замедление реакции и степень деацетилирования изменяется незначительно. Исходя из значений степени деацетилирования и кинетики процесса, выдвинуто предположение о диффузионном механизме реакции деацетилирования хитина.

*Работа была поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук (проект № МД-2330.2022.1.3).*

### Список литературы

1. M.V. Tsurkan et al. Progress in chitin analytics // Carbohydrate polymers. 2021. Vol. 252. # 117204.
2. R. Czechowska-Biskup et al. Determination of degree of deacetylation of chitosan – Comparison of methods // Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives. 2012. Vol. 17. P. 5–20.
3. R.C.F. Cheung et al. Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications // Marine drugs. 2015. Vol. 13. Iss. 8. P. 5156–5186.
4. B. Focher et al. Alkaline N-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. Reaction kinetics and structure modifications // Carbohydrate polymers. 1990. Vol. 12. P. 405–418.
5. V.Yu. Novikov et al. Mechanism of heterogeneous alkaline deacetylation of chitin: A Review // Polymers. 2023. Vol. 15. Iss. 7. # 1729.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАСТВОРОВ ХИТОЗАН-МЕЛАНИНОВОГО КОМПЛЕКСА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОВОЛОКНИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ

**В.П. Варламов<sup>1</sup>, Н.Р. Кильдеева<sup>2</sup>, С.А. Лопатин<sup>1</sup>, А.Ш. Хайрова<sup>1</sup>, Н.А. Сажнев<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *ФИЦ Биотехнологии РАН, Ленинский проспект, дом 33, стр. 2,  
Москва, 119071, Россия*

<sup>2</sup> *РГУ им. А.Н. Косыгина, ул. Малая Калужская, дом 1, Москва, 119071, Россия  
E-mail: nsazhnev@mail.ru*

**Аннотация.** В статье приводятся результаты изучения гелеобразования в растворах хитозан-меланинового комплекса, молекулярной массы и физико-химических свойств хитозан-меланинового комплекса, выделенного из подмора *Hermetia illucens*. Были получены нано- и микроволокна разного состава и степени сшивки из растворов хитозан-меланинового комплекса в уксусной и трифторуксусной кислотах.

**Ключевые слова:** хитозан, хитозан-меланиновый комплекс, электроформование, нановолокнистый матрикс.

### Введение

Разработка новых биоматериалов является приоритетным направлением одновременно для многих отраслей науки, что связано с широкими возможностями применения таких материалов – в качестве раневых покрытий, биоразлагаемых упаковочных материалов, систем доставки лекарственных средств, биополимерных матриц для выращивания живых тканей и органов.

В последнее время популярность набирают материалы, изготовленные из комплексов хитозана с другими биополимерами: белками (фибрион, коллаген), пигментами (меланин) и т.д. Такие комплексы могут обладать новыми полезными свойствами [1].

Например, меланин может придавать пленкам из хитозана следующие свойства: защита от ультрафиолетовых лучей, антиоксидантные свойства, защита от вредных воздействий окружающей среды и радиации, материалы на основе меланина способны регулировать температуру тела [2].

Сегодня широкое развитие получила технология по переработке органических отходов с помощью личинок насекомого *Hermetia illucens*. Важным преимуществом этого вида является его доступность в качестве источника биополимеров на всех стадиях онтогенеза: хитина на более ранних стадиях (личинки), хитин-меланиновых комплексов на более поздних стадиях (куколки, имаго) [3]. Важно отметить, что в конце жизненного цикла остается подмор *H. illucens*, отход при воспроизводстве личинок из маточного поголовья, который является уникальным источником для получения ковалентно связанного хитозан-меланинового комплекса с содержанием меланина около 14 %.

Разработка новых электроформованных изделий из хитозана [4, 5] и комплекса хитозана с меланином позволит расширить масштабы использования этого биоразлагаемого полимера и повысит эффективность технологии по переработке отходов с помощью *H. illucens*.

### Материалы и методы

Сшивающий реагент дженипин (Gr), Китай; сшивающий реагент глутаровый альдегид (Ga), Sigma Aldrich, Германия; уксусная кислота (хч, ледяная) ГОСТ 61-75; трифторуксусная кислота (хч, ледяная); поливиниловый спирт, ММ 50 кДа, Китай;

Хитозан-меланиновый комплекс (ХТЗ-М) получали из подмора *H. illucens* (ООО «Энтопротэк», Россия) по методике, описанной в работе [6], но с некоторыми модификациями. Сначала проводили депротенирование 15 % раствором NaOH на водяной бане в течение 2 ч при 100°C. Деминерализацию осуществляли с использованием 1 % HCl в течение 2 ч при комнатной температуре. Деацетилирование проводили с использованием 50 % NaOH в течение 2 ч при 100°C. Промывали водой до нейтрального значения pH и полученную материю растворяли в 0,5 % CH<sub>3</sub>COOH, фильтровали от нерастворимой части, осаждали комплекс добавлением 5 % NaOH, суспензию диализовали против воды и лиофильно высушивали. Полученный комплекс имел молекулярную массу 566 кДа и содержал 14 % меланина, которые определяли методом высокоэффективной гель-проникающей хроматографии (ВЭГПХ) и электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), соответственно.

Определение молекулярно-массовых характеристик проводили с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа S 2100 («Sykam», Германия) в комплекте с дегазатором K-5004 («Кнауер», Германия), колоночным термостатом Jet Stream+ («Кнауер», Германия) и рефлектометрическим детектором RI Detector K-2301 («Кнауер», Германия). Молекулярную массу определяли при температуре 30 °C с использованием колонки PSS NOVEMA Max analytical 1000 A («PSS», Германия), в системе 0,1 М NH<sub>4</sub> ацетатный буфер + 0,2 М NaCl, при значении pH 4,5 и скорости элюции 1,0 мл/мин. Контроль и анализ хроматограмм осуществляли с помощью программы «Мультихром» версия 1.6 (ЗАО «Амперсенд», Москва). В качестве калибровочных стандартов использовали пуллуланы (M<sub>w</sub>=342, 1260, 6600, 9900, 23000, 48800, 113000, 200000, 348000 и 805000 Да) («PSS», Германия).

Исследование электронного парамагнитного резонанса проводили на ЭПР спектрометре EMX («Bruker», Германия). Спектры регистрировали для сухих образцов массой 50 мг, которые помещали в цилиндрическую кварцевую кювету. ЭПР спектры регистрировали при следующих условиях: амплитуда модуляции 1,25–3,0 Гс; диапазон развертки 50 Г; микроволновая частота 9,8 ГГц; мощность сверхвысокой частоты 0,2 мВт; постоянная времени 100 мс. Контрольный образец ультрадисперсионного алмаза № 5 (сертификат о калибровке № 905/910-2012) был использован для расчета g-факторов и определения концентрации спинов. Количество меланина, содержащегося в этих образцах, определяли

путем сравнения с количеством чистого диоксифенилаланин (ДОФА)-меланина, не содержащего примесей белка. Концентрация парамагнитных центров ДОФА-меланина была определена в тех же условиях и составила  $1,94 \times 10^{18}$  спин/г сухого веса.

Предметом исследования является оценка возможности получения нано- и микроволокон из растворов хитозан-меланинового комплекса, устойчивых к воздействию воды и кислот.

2 % и 70 % растворы ХТЗ-М в уксусной/трифторуксусной кислоте готовили гравиметрическим методом. В колбу вносили рассчитанную навеску порошка ХТЗ-М и расчетное количество уксусной/трифторуксусной кислоты. После этого раствор тщательно перемешивали и оставляли на 24 ч при комнатной температуре, в течение этого времени происходило полное растворение хитозана и обезвоздушивание раствора.

Динамическую вязкость измеряли на вибрационном вискозиметре SV-10 (Япония). Для получения гидрогелей использовались 2 %-ные растворы ХТЗ-М в 2 %-ной уксусной кислоте (рН 4,3 и 5,51). К растворам прибавляли расчетное количество сшивающего реагента и измеряли кинетику сшивки и время гелеобразования.

Время гелеобразования определяли путем визуального наблюдения. К 3 граммам растворов ХТЗ-М в бюксе добавляли 0,2 мл раствора глутарового альдегида или 0,62 мл раствора дженипина разной концентрации, определяемой необходимым соотношением сшивающий реагент/ $\text{NH}_2$ , закрывали бюкс крышкой и отмечали время начала эксперимента. За время гелеобразования принимали момент, когда раствор переставал течь при переворачивании бюкса и представлял собой единую вязко-упругую систему.

Нановолокнистый материал получали методом электроформования на Nanospider NS-Lab (Чехия).

### Результаты исследований

Для изучения физико-химических свойств комплекс хитозана и меланина растворяли в 2,5%-ой уксусной кислоте. На рисунке 1 представлены результаты измерения динамической вязкости растворов с различной концентрацией биополимера. Концентрация резкого роста вязкости, соответствующая области перекрывания макромолекулярных клубков составляет 1,5 %. Выше этой концентрации возможно волокнообразование.

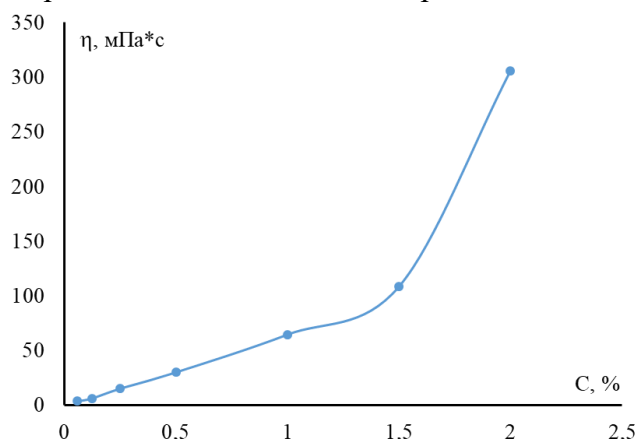


Рис. 1. Зависимость динамической вязкости от концентрации раствора хитозан-меланинового комплекса

С целью получения водонерастворимых материалов был исследован процесс химической сшивки хитозан-меланинового комплекса глутаровым альдегидом и дженипином.



Зависимость времени гелеобразования в 2 % растворе комплекса от содержания сшивающего реагента представлена на рис. 2.

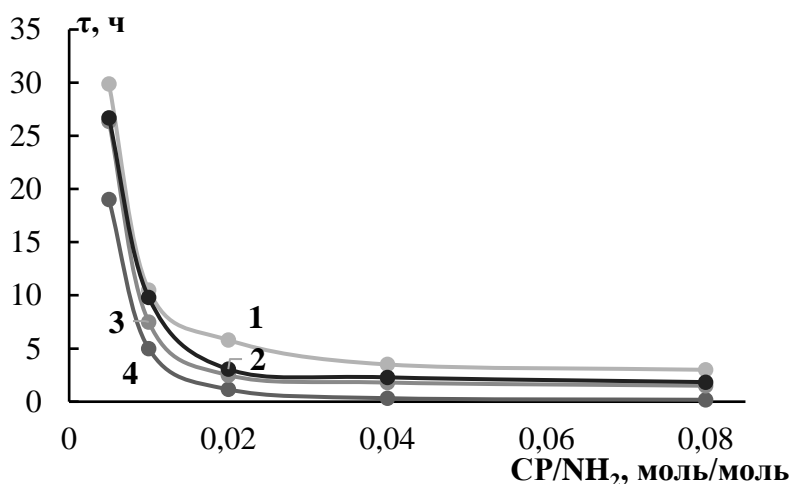


Рис. 2. Зависимость времени гелеобразования в 2 %-ном растворе хитозан-меланинового комплекса рН 4,3 и 5,51 от содержания сшивающего реагента (СР) в процессе сшивки дженипином или глутаровым альдегидом: 1 – СР дженипин, рН 4,3; 2 – СР глутаровый альдегид, рН 4,3; 3 – СР дженипин, рН 5,51; 4 – СР глутаровый альдегид, рН 5,51.

Электроформование растворов полимеров может происходить при постоянных значениях вязкости и электропроводности. Для предотвращения неконтролируемого роста вязкости формовочного раствора в результате химической сшивки необходимо, чтобы процесс сшивания биополимеров завершался уже после осаждения волокна на приемном электроде. На основании литературных данных [5, 6] и предварительного изучения технологических характеристик формовочных растворов были выбраны составы формовочных композиций и определена возможность электроформования волокон на основе хитозан-меланинового комплекса.

Состав формовочных растворов и параметры формования приведены в таблице 1.

Таблица 1

### Формовочные композиции из хитозан-меланинового комплекса

№ п/п	Состав смеси	Сшивающий реагент/ степень сшивки, моль/моль	U наноспайдера, кВ	Характеристика	D волокон, нм
1	Хитозан-меланин, 4 мас.%, уксусная кислота 70%	Дженипин, 0,08	>50	-	-
2	Хитозан-меланин:ПВС, 1:3, раствор уксусной кислоты 2%		46,7-51,2	Стабильное	250±50
6	Хитозан-меланин, 4 мас.%, раствор уксусной кислоты 70%	Глутаровый альдегид, 0,08	>50	-	-
7	Хитозан-меланин:ПВС, 1:3, раствор уксусной кислоты 2%		47,8-53,4	Стабильное	250±50
8	Хитозан-меланин, 2 мас.%, раствор уксусной кислоты 2%	-	35,5-55,0	-	-
9	Хитозан-меланин, 2 мас.%, раствор уксусной кислоты а 70%	-	45,0-55,0	-	-

Как видно из таблицы, осуществить электроформование из чистых растворов хитозан-меланинового комплекса не удалось. Стабильное формование происходило из растворов, содержащих поливиниловый спирт в качестве волокнообразующей добавки. АСМ-изображения электроформованных волокон из хитозан-меланинового комплекса приведены на рис. 3.

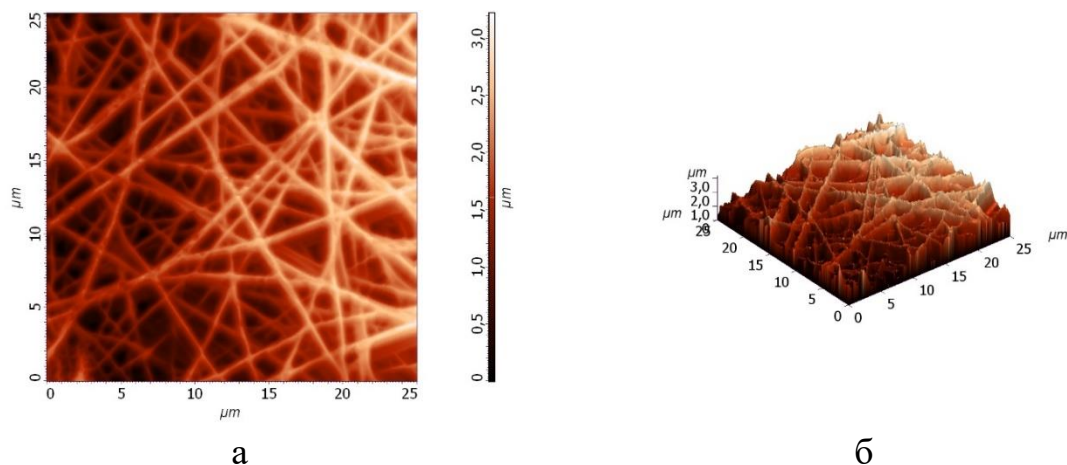


Рис. 3. АСМ-изображения электроформованных волокон из хитозан-меланинового комплекса, сшитого глутаровым альдегидом (степень сшивки 0,08 моль/моль, рН 5,51): а – 2D-изображение; б – 3D-изображение

### Выводы

- Определены молекулярно-массовые характеристики и физико-химические свойства полученного хитозан-меланинового комплекса.
- Показана возможность электроформования нановолокон из растворов комплекса в смеси с поливиниловым спиртом;
- Были получены образцы нановолокон из хитозан-меланинового комплекса со средним диаметром 250 нм, устойчивые к воде. Такие волокна можно использовать в качестве раневых покрытий и в тканевой инженерии для роста и пролиферации живых клеток.

### Список литературы

1. Ghattavi S. et al. Fabrication of antifouling coating based on chitosan-melanin hybrid nanoparticles as sustainable and antimicrobial surface // *Progress in Organic Coatings*. 2023. Vol. 174. # 107327
2. Бастраков А.И., Донцов А.Е., Ушакова Н.А. Муха черная львинка *Hermetia illucens* в условиях искусственного разведения-возобновляемый источник меланин-хитозанового комплекса // *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2016. №. 4. С. 77–79.
3. Khayrova A., Lopatin S., Varlamov V. Obtaining chitin, chitosan and their melanin complexes from insects // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021. Vol. 167. P. 1319–1328.
4. Cui C. et al. Electrospun chitosan nanofibers for wound healing application // *Engineered Regeneration*. 2021. Vol. 2. P. 82–90.
5. Kalantari K. et al. Biomedical applications of chitosan electrospun nanofibers as a green polymer – Review // *Carbohydrate polymers*. 2019. Vol. 207. P. 588–600.
6. Khayrova A., Lopatin S., Varlamov V. Obtaining and study of physicochemical properties of chitin/chitosan-melanin complexes from *Hermetia illucens* // *Journal of Physics: Conference Series*. 2021. Vol. 1942. # 012003.

# ИССЛЕДОВАНИЕ ХИТОЗАНА ИЗ ЦИСТ *ARTEMIA PARTHENOTEMIA* АРАЛЬСКОГО МОРЯ

Г.Д. Ахымбетова, Р.Ю. Милушева, С.Ш. Рашидова

*Институт химии и физики полимеров Академии наук Узбекистана,  
Ташкент, 100128, Узбекистан  
E-mail: rumilusheva@gmail.com*

Основное производство хитозана сосредоточено в странах, имеющих доступ к дешевому сырью на основе панцирей крабов. Однако, ввиду квот на вылов, экологических проблем загрязнения морей и океанов, сырьевая база для получения хитозана является ограниченной.

В Узбекистане основным потенциальным источником ракообразных является Аральское море, где они были представлены 58 видами из 195 свободноживущих беспозвоночных. Ранее был получен хитозан из креветок *Palaemon elegans* и крабов *Phitrophanapeus harrissi*, которые добывались на мысе Ак Тумсык Аральского моря [1, 2]. Однако, Аральское море, как среда обитания гидробионтов значительно изменилось по сравнению с периодом его квазистационарного режима: изменился ионный состав воды, резко повысилась соленость воды, уменьшилось поступление биогенных элементов.

Начиная с 2000-х годов на Арале проводятся широкомасштабные акклиматизационные работы по направленному формированию фауны беспозвоночных, которые увенчались успехом. Акклиматизанты заняли ведущие места в зоопланктоне (*Artemia parthenogenetica*, *Calanipeda aquaedulcis*) и зообентосе (*Nereis diversicolor* и *Syndosmya segmentum*), причем, по мере осолонения моря, их доля в общей биомассе зоопланктона и зообентоса постоянно увеличивается [3, 4]. Вид беспозвоночных, представленных в соленых водоемах Приаралья - *Artemia parthenogenetica* становится доминантом зоопланктона.

Актуальность исследований по синтезу и модификации новых природных полимеров хитозана, заключается в изыскании новых сырьевых источников, в частности цист *Artemia parthenogenetica* Аральского моря. При этом основные ориентиры направлены на приоритет Республики Узбекистан в использования местного сырья и импортозамещение.

## Экспериментальная часть

Хитинсодержащее сырье обрабатывалось по стандартной методике [5, 6]. Молекулярная масса рассчитывалась по формуле Марка-Куна-Хаувинка  $M \eta = ([\eta]/K)^{1/\alpha}$ , где  $K = 1,4 \times 10^{-4}$  и  $\alpha = 0,83$  – из литературы [7, 8]. Степень дезацетилирования образцов определялась кондуктометрическим титрованием на приборе «Mettler-Toledo AG» («Analytical CH-8603 Schwerzenbach», Швейцария). ИК-спектроскопические исследования проводили на приборе ИК-Фурье Inventio-S (Bruker, Германия) в диапазоне от 500 до 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Рентгенографические исследования проведены на приборе Miniflex 600 (Rigaku, Япония) с монохроматизированным  $\text{CuK}_\alpha$ -излучением.

Содержание общего азота в хитине и хитозане определяли методом Дюма [9] путем сжигания навески в кварцевой трубке в атмосфере двуокиси углерода.

В качестве сырья использовались цисты рачка *Artemia parthenogenetica* Аральского моря, измельченные до размера частиц 40 мкм, при влажности 8–10 %. Депротенизация сырья осуществлялась путем обработки их 3–4 % раствором гидроокиси натрия при температуре 90–100°C при постоянном перемешивании в течение 3 часов. Деминерализацию осуществляли

путем обработки 1 М раствором соляной кислоты при постоянном перемешивании в течение 2–4 часов при комнатной температуре. Из полученного хитина путем дальнейшего деацетилирования 40–50 % раствором NaOH получен хитозан. Хитозан просушивался при 30–40°C до постоянного веса. Выявлено, что для получения однородного по свойствам хитина и хитозана требуются индивидуальные режимы обработки. Характеристики полученных образцов хитина и хитозана представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Качественные характеристики хитина и хитозана из цист *Artemia parthenogenetia***

Образцы хитина из различного сырья	Содержание влаги, %	Содержание золы, %	Содержание азота, %	Выход хитина, %
Хитин Ts 25261286-09:2019		2,0	5-7	
Хитин из цист <i>Artemia parth.</i>	8-10	1,10	6,30-6,83	3-10,5
Цвет	Порошок темно-зеленого цвета			
Хитозан Ts 25261286-01:2019	< 12	< 2	>8,0	
Хитозан из цист <i>Artemia parth.</i>	6,0±0,8	1,83±0,4	8,28	3,0±0,8
Цвет	Порошок желтого цвета			

Элементный анализ образцов выделенных хитинов выявил, что содержание азота во всех образцах колеблется от 6,30 % до 6,83 %, что близко к теоретическим значениям и свидетельствует о высокой степени чистоты выделенных образцов, содержание золы, соответствует требованиям, указанным в стандарте предприятия Ts 25261286-09:2019 и подтверждает факт получения хитина.

Как видно из таблицы 1, по результатам элементного анализа полученные образцы хитозана соответствуют нормативным показателям на хитозан Ts 25261286-01:2019. Так, зольность в хитозане из цист *Artemia parthenogenetia* Аральского моря – 1,83 %, а содержание азота – 8,28%. Данные показатели свидетельствуют о достаточной чистоте полученных образцов и зависят от условий его синтеза.

Определены физико-химические свойства исследуемых образцов хитозана, которые представлены в таблице 2.

Таблица 2

**Физико-химические свойства хитозана из цист *Artemia parthenogenetia***

Исходное сырье	Характеристическая вязкость [η], дл/г	Молекулярная масса, кДа	Степень деацетилирования (кондуктометрическое титрование)	Растворимость, %
Цисты <i>Artemia parth.</i>	2,23	89	72±5,6	81,62

Таким образом, получен хитозан из цист *Artemia parthenogenetia* со СДА=72 %, молекулярной массой 89 кДа и хорошей растворимостью – 81,62 %.

Рентгеноструктурный анализ образцов показал, что на дифрактограммах хитина из цист *Artemia parthenogenetia* Аральского моря наблюдаются кристаллические рефлексы с максимумами при  $2\theta=9.5^\circ$ ,  $19.5^\circ$  в рассмотренном интервале углов рассеяния. Наиболее интенсивный максимум, наблюдаемый при значении угла  $2\theta=19.5^\circ$ , относится к кристаллографическому рефлексу (110). Рентгенофазовый анализ показал, что образец хитина, выделенный из цист *Artemia parthenogenetia* (рис. 1) Аральского моря, существует в двух полиморфных модификациях, которые имеют различные кристаллические сингонии. Первая фаза –  $\alpha$ -хитин с орторомбической сингонией имеет параметры решетки:  $a=4.85 \text{ \AA}$ ,  $b=19.05 \text{ \AA}$ ,  $c=9.31 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=\beta=\gamma=90.00^\circ$ . Вторая фаза –  $\beta$ -хитин с параметрами решетки:  $a=9.55 \text{ \AA}$ ,  $b=2.98 \text{ \AA}$ ,  $c=10.41 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=\gamma=90.00^\circ$ ,  $\beta=97.43^\circ$  обладает моноклинной сингонией. Как видно из экспериментальных данных, в образце хитина выделенного из цист *Artemia parth.* Аральского моря 65 % кристаллической фазы имеет моноклинную сингонию, которая соответствует  $\beta$ -фазе, а 35 % имеет орторомбическую сингонию соответствующей  $\alpha$ -фазе.

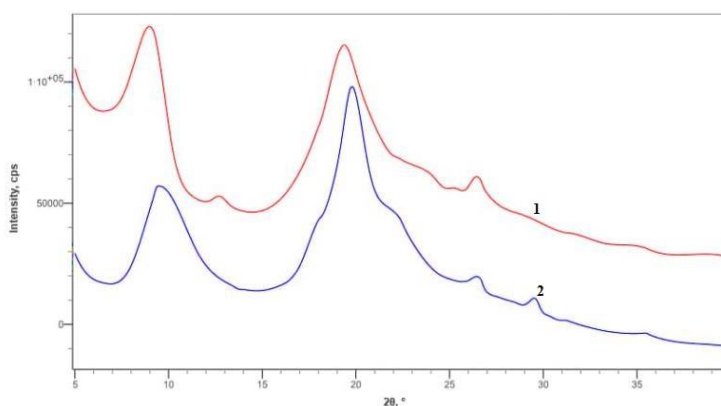


Рис. 1. Дифрактограммы хитина и хитозана из цист *Artemia parth.* Аральского моря

При этом на дифрактограммах хитозана, полученного из указанного выше хитина наблюдаются кристаллические рефлексы с максимумами при  $2\theta=5.79^\circ$ ,  $10.52^\circ$ ,  $20.3^\circ$  и  $28.9^\circ$ . При значении угла  $2\theta=20.3^\circ$  наблюдается наиболее интенсивный максимум, который относится к кристаллографическому рефлексу (020). Рентгенофазовый анализ показал, что в образце хитозана сосуществуют кристаллы с триклинной и моноклинной сингониями, которые связаны с условиями деацетилирования. Хитозан с триклинной сингонией имеет параметры решетки  $a=2.63 \text{ \AA}$ ,  $b=9.01 \text{ \AA}$ ,  $c=16.19 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=75.80^\circ$ ,  $\beta=105.00^\circ$ ,  $\gamma=98.00^\circ$ . Степень кристалличности при переходе хитина в хитозан уменьшается, что хорошо согласуется с литературными данными [10,11].

ИК-спектроскопические исследования хитина, полученного из цист Аральского моря, выявили в его спектре широкую полосу поглощения  $3109\text{--}3600 \text{ см}^{-1}$  с максимумом в области  $3444 \text{ см}^{-1}$  за счет валентных колебаний межмолекулярных и внутримолекулярных связанных ОН – групп и симметричных колебаний аминогрупп- N-H. Наблюдается полоса поглощения при  $1653 \text{ см}^{-1}$  – Амид I (валентные колебания C=O групп). Полоса поглощения при  $1561 \text{ см}^{-1}$  – угловая деформация N-H аминогруппы. Интенсивная полоса с максимумом в области  $2925 \text{ см}^{-1}$  – валентные и деформационные колебания метильных групп. Полосы  $1000\text{--}1200 \text{ см}^{-1}$  относятся к различным колебаниям C–O–C групп. Полосы  $1075 \text{ см}^{-1}$  и  $1029 \text{ см}^{-1}$  соответствуют валентным колебаниям групп C–O, все полосы соответствуют хитину, т.е. наблюдаются все пики, характерные хитину, которые соответствуют литературным данным [12].

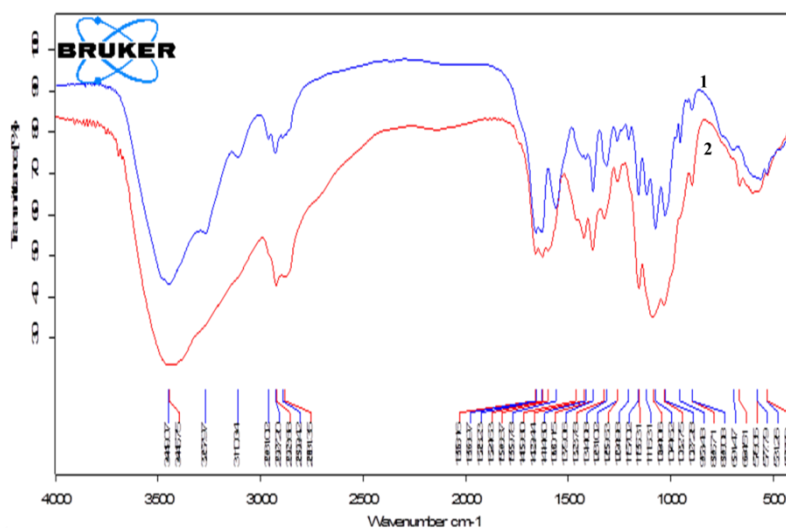


Рис. 2. ИК спектры: 1.Хитин, 2. Хитозан из цист *Artemia parth.* Аральского моря

На ИК-спектре хитозана наблюдается полоса поглощения ОН и NH, включенная в водородную связь в виде интенсивной широкой полосы в области  $3600\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ . Валентные колебания СН- СН<sub>2</sub>- групп наблюдаются в области  $2925, 2923$  и  $2855\text{ см}^{-1}$ . Наблюдается полоса поглощения в области  $1658\text{ см}^{-1}$ , которая объясняется осевым растяжением связей С=О ацетамида (амид-I) и полоса при  $1596\text{ см}^{-1}$  – угловая деформация N–H аминогруппы (амид-II) и резкие интенсивные полосы поглощения различных деформационных колебаний в области  $1382\text{--}1200\text{ см}^{-1}$ . Т.е., наблюдаются все полосы поглощения, характерные для хитозана.

Таким образом, результаты проведенного исследования показывают, что получены хитин и хитозан достаточной степени чистоты из нового источника – цист *Artemia parthenogenetia* Аральского моря, исследованы физико-химические свойства образцов, выявлено, что у хитина, выделенного из цист *Artemia parthenogenetia* Аральского моря наблюдается два типа модификации  $\alpha$  и  $\beta$  с соответствующими сингониями. Получен хитозан с хорошей растворимостью – 82 % и СДА – 73 %, что позволит в перспективе использовать его как в сельском хозяйстве, так и в медицине. Использование нового сырья в качестве источников хитина должно позволить увеличить производство этого природного биополимера и его производных и расширить ассортимент используемого сырья.

### Список литературы

1. R.Yu. Milusheva, N.L. Voropaeva, S.Sh. Rashidova. Chitin isolation from Aral crustaceans and its derivatives synthesis // J. Chem. Native Comp. 1995, N 4. P. 600–603.
2. S.Sh. Rashidova, R.Yu. Milusheva, N.L. Voropaeva, S.R. Pulatova, I.N. Ruban. Isolation of chitin from a variety of raw materials, modification of the material, and interaction its derivatives with metal ions // J. Chromatographia. 2004. Vol. 59. P. 783–786.
3. I. Mirabdullayev, L. Abdullaeva, A. Musaev, I. Zholdasova, Z. Mustafaeva, N. Jumaniezova. Sharp fluctuations in ecosystem parameters of the East Big Aral // Geophysical Research Abstracts. 2007. Vol. 9. P. 772.
4. N.V. Aladin, I.S. Plotnikov. Modern fauna of residual water bodies formed on the place of the former Aral Sea // Proceedings of the Zoological Institute RAS. 2008. Vol. 312, N 1/2. P. 145–154.
5. Хитозан / Под ред. Скрябина К.Г., Михайлова С.Н., Варламова В.П. М.: Изд. Центр «Биоинженерия РАН». 2013. С. 593.

6. R.A.A. Muzzarelli. The discovery of chitin // In:Chitosan in pharmacy and chemistry / Ed. R.A.A Muzzarelli, C. Muzzarelli // Atec. Italy: 2002. P. 1–8.
7. A.I. Gamzazade, B.M Shlimak., A.M.Sklyar, E.V.Stykova, S.A. Pavlova, S.V. Rogozin // Acta Polym. 1985. Vol. 36, N 8. P. 421–424.
8. В.Н. Цветков. Жесткоцепные полимерные молекулы. – Л.:Наука. 1986. 380 с.
9. В.А. Климова В.А. Основные микрометоды анализа органических соединений. – М.: Химия, 1980. 483 с.
10. M. Rinaudo. Chitin and chitosan: properties and applications // Progress in Polymer Science. 2006. Vol. 31. P. 603–632.
11. M.R. Kumar, R.A.A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiva, A.J. Domb. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives // Chemical Reviews. 2004. Vol. 104. P. 6017–6084.
12. С.М. Югай, С.Ш. Шахобутдинов, А.А. Атаханов, С.Ш. Рашидова. ИК-спектроскопические исследования хитозана *Bombyx mori* его производных // Химический журнал Казахстана. 2019. Т. 67, № 3. С. 254–265.

## **ЗАВИСИМОСТЬ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НАНОАСКОРБАТ ХИТОЗАНА *BOMBYX MORI* ОТ УСЛОВИЙ СИНТЕЗА**

**К.К. Пирниязов, С.Ш. Рашидова**

Институт химии и физики полимеров АН РУз

E-mail: polymer@academy.uz

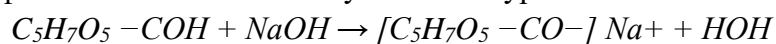
Формирование наночастиц является перспективным направлением для контролируемого высвобождения и транспортировке биологически активных компонентов в фармакологии [1], пищевой промышленности [2] и сельском хозяйстве [3]. Для формирования наночастиц и доставки биологически активного вещества можно использовать некоторые биоразлагаемые матрицы, вызывающие большой интерес благодаря «экологической безопасности» [4]. Указанное свойство матрицы имеет преимущественное значение в фармацевтической и пищевой промышленности [5]. Например, хитозан в качестве матрицы представляет собой большой интерес среди полисахаридов, и широко используется для капсулирования наночастиц и доставки биологически активных соединений, таких как витамины [6, 7].

Однако, при образовании наноструктурных производных хитозана многие факторы могут влиять на размер частиц наносистем. Основными контролируемыми параметрами при образовании наночастиц полисахаридов являются концентрация компонентов хитозана, ТФПNa, кислоты (уксусной, лимонной, аскорбиновой, салициловой кислоты и т.п.) и pH среды [8].

Были изучены такие параметры, как молекулярная масса исходного хитозана, влияние концентрации сшивающего агента (ионносшивателя) ТПФNa и pH раствора на свойства синтезированных наночастиц [8]. Результаты подтверждают, что размер частиц нелинейно увеличивается с повышением концентрации низкомолекулярных, средне- молекулярных и высокомолекулярных хитозанов. Было установлено, что минимальный размер частиц можно получить из низко- или среднемолекулярного хитозана с малой концентрацией. Замечено, что увеличение соотношения хитозана по сравнению с ТПФNa приводит к повышению размеров наночастиц и снижение pH реакционных систем влияет на уменьшение размеров частиц [8, 9].

Водорастворимые производные хитозана, среди которых особый интерес представляют нанопроизводные хитозана с аскорбиновой кислотой, проявляют выраженную биоактивность при росте и развитии растений, обладают антимикробными и иммуноактивными свойствами [10–13]. Нанопроизводные хитозана, в частности наноаскорбат хитозана, являются нетоксичными и экологически безопасными, в составе почвы полностью разлагаются под действием микроорганизмов [10, 13]. В связи с этим, большое значение приобретают научно-практические исследования, направленные на изучение условий синтеза и производства наноаскорбат хитозана *Bombyx mori*, определения его структуры и свойств, а также его применения в сельском хозяйстве.

Реакцию образования наноаскорбат хитозана *Bombyx mori* проводили суспензионным методом при pH 6–6,5 при комнатной температуре в течение 60 минут с варьированием соотношения компонентов в наноаскорбат хитозане, сопровождающимся ионотропным гелеобразованием в присутствии ионов триполифосфат натрия. В качестве стабилизатора использовали 0,5 % раствор триполифосфат натрия. Количество аскорбиновой кислоты в составе наноаскорбат хитозане определено методом щелочного титрования в присутствии индикатора фенолфталеина на основе нижеуказанного уравнения:



Полученные результаты показывают, что с увеличением мольного соотношения исходного хитозана по сравнению с аскорбиновой кислотой происходит увеличение степени связывания аскорбиновой кислоты. Необходимо отметить, что скорость реакции образования наноаскорбат хитозана по сравнению со скоростью реакции образования аскорбат хитозана будет выше, но значения друг от друга отличаются незначительно. Данные факторы обнаруживаются за счет присутствия стабилизирующего агента в реакционной системе. В присутствии стабилизатора ТПФNa в реакционной системе происходит рост pH раствора, но реакционная способность исходного хитозана повышается за счёт депротонирования аминогрупп при нейтральной pH среде.

Результаты РСА-исследований образцов наноаскорбат хитозана подтверждают, что с увеличением содержания аскорбиновой кислоты в составе наноаскорбат хитозана происходит снижение степени кристалличности от 54,8 % до 38 %. Это может происходить за счет увеличения доли гидрофильных функциональных групп, входящих в состав аскорбиновой кислоты, и снижения водородных связей. На дифрактограммах наноаскорбат хитозана не наблюдаются кристаллические рефлексы аскорбиновой кислоты при  $2\theta \approx 10.7, 17.8, 20.3, 25.7$  и  $30.4^\circ$ , соответствующие межплоскостным расстояниям (200), (210), (011), (002), (302), что свидетельствует о разрушении кристаллической структуры аскорбиновой кислоты до молекулярного уровня и объясняется образованием НАХЗ.

В ИК-спектре полученного наноаскорбат хитозана проявляется смещение полос поглощения в сравнении с полосами поглощения хитозана от  $1587 \text{ см}^{-1}$  до  $1550 \text{ см}^{-1}$ , свидетельствующие об образовании донорно-акцепторной связи в присутствии аминогрупп исходного хитозана с енольными группами аскорбиновой кислоты. Установлено некоторое различие за счёт сопоставления полос поглощения ацетамидных групп хитозана и карбонильных групп аскорбиновой кислоты в области  $1624 \text{ см}^{-1}$ .

Установлено, что с варьированием соотношения компонентов ХЗ:АК и концентрации стабилизатора – ТПФNa возможно контролирование размеров частиц НАХЗ, при этом соотношении компонентов ХЗ:АК:ТПФNa – 4:1:0,5 для образования наночастиц АХЗ является оптимальным. Определены структурные характеристики и размеры частиц по поверхности



полученных образцов *НАХЗ В.М.* Размеры частиц НАХЗ по поверхности, находятся в пределах 20–250 нанометров.

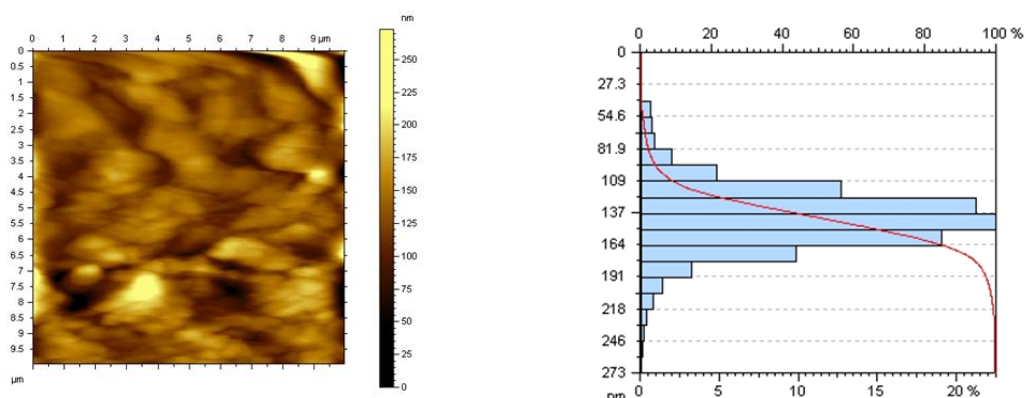


Рис. 1. Топография поверхности наночастиц наноаскорбат хитозана в соотношении компонентов 4:1:0,5, снятая АСМ микроскопом Agilent 5500 в полуконтактном режиме

С целью определения влияния концентрации стабилизатора ТПФNa на образование НАХЗ проведен синтез при постоянных условиях. Полученные результаты свидетельствуют, что с увеличением соотношения стабилизатора наблюдается рост pH раствора. Также отмечено, что при соотношении компонентов ХЗ:АК:ТПФNa – 4:1:0,5 достигается нейтральный pH и самые высокие скорость реакции и степень связывания хитозана с аскорбиновой кислотой. При дальнейшем увеличении соотношения стабилизатора pH и скорость реакции изменяются незначительно. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Зависимость степени связывания хитозана с аскорбиновой кислотой и скорости реакции образования наноаскорбат хитозана от соотношения стабилизатора ТПФNa ( $t=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\tau=5$  минут, молекулярная масса ХЗ 98 кДа, СДА 84 %).  
Исходная концентрация аскорбиновой кислоты 0,05 моль.л**

Соотношение компонентов ХЗ:АК:ТПФNa	$\Delta C_{AK}^*$ моль/л	Степень связывания, %	pH	Выход, %	Скорость реакции $10^{-4}$ мол/л.с.
4:1:0,125	0,033	66,7	6,21	59,0	1,20
4:1:0,50	0,046	92,0	7,57	82,3	1,54
4:1:0,75	0,044	87,5	8,46	82,5	1,45
4:1:1,0	0,042	84,8	8,36	79,4	1,41

В ходе работы оценено влияние молекулярной массы исходного хитозана на образование наноаскорбат хитозана. С этой целью были выбраны хитозаны с молекулярной массой 17, 98, 184 кДа с одинаковой степенью деацетилирования. Синтез проводили при постоянных условиях (соотношение компонентов ХЗ:АК:ТПФNa – 4:1:0,5).

Полученные результаты показывают, что с увеличением молекулярной массы исходного хитозана происходят незначительные изменения в степени связывания и скорости реакции

образования наноаскорбат хитозана. Необходимо отметить, что увеличение молекулярной массы исходного хитозана приводит к росту выхода НАХЗ, это может объясняться увеличением выпадения тяжелых макромолекул в присутствии стабилизатора.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что при соотношении компонентов ХЗ:АК:ТПФNa – 4:1:0,5 устанавливается самая высокая скорость реакции и степень связывания хитозана с аскорбиновой кислотой. Это связано с тем, что при этом соотношении компонентов обнаружена нейтральная рН среды, которая может способствовать увеличению реакционной способности за счет депротонирования аминогрупп макромолекул хитозана.

### Список литературы

1. Mora-Huertas C.E., Fessi H., Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery // *International Journal of Pharmaceutics*. 2010. Vol. 385 (1-2). P. 113–142.
2. Fathi, M.; Martín, Á.; McClements, D. J. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems // *Trends in Food Science & Technology*. 2014. Vol. 39 (1). P. 18–39.
3. Badang M.C.N., Chakraborty S. Carbohydrate polymers as controlled release devices for pesticides // *Journal of Carbohydrate Chemistry*. 2019. Vol. 38 (1). P. 67–85.
4. Kumari A., Yadav S.K.; Yadav S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010. Vol. 75 (1). P. 1–18.
5. Santos P.P. et al. Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules // *Trends in Food Science & Technology*. 2016. Vol. 53. P. 23–33.
6. Britto D. et al. N,N,N-trimethyl chitosan nanoparticles as a vitamin carrier system // *Food Hydrocolloids*. 2012. Vol. 27 (2). P. 487–493.
7. Britto D. et al. Entrapment characteristics of hydrosoluble vitamins loaded into chitosan and N,N,N-trimethyl chitosan nanoparticles // *Macromolecular Research*. 2014. Vol. 22 (12). P. 1261–1267.
8. Gan Q., Wang T. et al. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery // *Colloid Surface B*. 2005. Vol. 44. P. 65–73.
9. Gokce, Y. et al. Ultrasonication of chitosan nanoparticle suspension: Influence on particle size // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014. Vol. 462. P. 75–81.
10. Пирниязов К.К., Рашидова С.Ш. Синтез аскорбата и наноаскорбата хитозана и их биологически активные свойства // *Наука и инновационное развитие*. 2020. № 5. С. 47–62.
11. Пирниязов К.К. Синтез, свойства и применение аскорбат хитозана *Bombyx mori*: дис. ... PhD. хим. наук. Ташкент, 2020. С. 67–69.
12. Sekar V. et al. Synthesis and characterization of chitosan ascorbate nanoparticles for therapeutic inhibition for cervical cancer and their in silico modeling // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2018. Vol. 62. P. 239–249.
13. Pirniyazov K.K., Tixonov V.E., Rashidova S.Sh. Oligochitosan and oligochitosan ascorbat: preparation and properties // *International Journal of Modern Agriculture*. 2021. Vol. 10, N 2. P. 1244–1262.

# ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ РЕАКЦИИ СУЛЬФАТИРОВАНИЯ ХИТОЗАНА *BOMBYX MORI*

**В.Н. Рахманова, С.Ш. Рашидова**

*Институт химии и физики полимеров АН РУз, г. Ташкент, ул. А. Кадыри, 7<sup>б</sup>  
E-mail: polymer@academy.uz*

В последние годы накоплен большой научный материал, анализ которого позволяет выявить необходимые условия проведения реакций химического превращения хитозана в сульфат хитозана с выбором перспективных источников сырья, одним из которых является хитозан из хитина куколок тутового шелкопряда *Bombyx mori*. Проводятся комплексные исследования по получению хитозана и его производных из хитина *Bombyx mori*, по применению полученных полисахаридов в медицине, сельском хозяйстве, ветеринарии, косметологии [1, 2]. В мире сульфат хитозана получают, в основном, на основе крабовых источников и в литературе нет данных о синтезе сульфата хитозана на основе хитозана *Bombyx mori*. Таким образом, нами впервые синтезирован сульфат хитозана на основе хитозана *Bombyx mori*.

Исследование кинетических закономерностей химического превращения хитозана *Bombyx mori* в сульфат хитозана проводили путем варьирования продолжительности и температуры реакции, а также соотношения сульфатирующего агента олеума с хитозаном.

В данной работе сульфатирование проводили согласно [3, 4, 6] при варьировании соотношений компонентов ХЗ: ХСК в интервале от 1:2 до 1:10 и температуры от 20 до 80 °С.

Эксперименты показали, что по мере увеличения времени реакции ( $t$ ) повышается содержание серы (S, %) в массе получаемого сульфата хитозана, что и приводит к увеличению степени замещения (СЗ) сульфогруппы в цепи. Причем, увеличение количества S, % заметно интенсивнее происходит до 3 часов, после этого реакция продолжается с некоторым спадом темпа, и рост значений серы и СЗ незначительным образом снижается. При этом выход конечного продукта примерно с такой же закономерностью изменяется.

В качестве сульфатирующего агента использовалась хлорсульфоновая кислота. Изучено влияние условий синтеза на образование сульфопроизводных хитозана: соотношение компонентов ХЗ: ХСК, времени и температуры синтеза на молекулярно-массовые характеристики СХЗ. Для синтеза использовали предварительно подготовленные растворы хлорсульфоновой кислоты с диметилсульфоксидом (ДМСО), реакция СХЗ проводилась при комнатной температуре в течение 3 ч. Полученные результаты показывают, что с увеличением соотношения хлорсульфоновой кислоты в реакционных системах происходит закономерное увеличение степени замещения и выхода конечных продуктов, и в связи с этим снижается доля элементарного азота в составе сульфата хитозана. Также обнаружено значительное снижение молекулярной массы по сравнению с другим сульфатирующим агентом, что подтверждает деструкцию макромолекул СХЗ. Полученные данные представлены в таблице 1.

Растворимость полученных образцов повышается в зависимости от степени замещения сульфогрупп. Обнаружено, что самая высокая степень замещения установлена при соотношении компонентов ХЗ: ХСК 1:6. Для изучения кинетики образования сульфата хитозана проводили синтез при комнатной температуре 20 °С в соотношении компонентов 1:6. Варьированием времени синтеза в интервале 0,5–5 ч определены значения степени замещения

сульфогрупп и скорость реакции образования сульфата хитозана в зависимости от продолжительности синтеза. Выявлено, что с увеличением продолжительности синтеза происходит закономерное увеличение степени замещения и содержания серы, а также снижается молекулярная масса от 68,4 кДа до 19 кДа, что является подтверждением деструкции макромолекул при длительном воздействии хлорсульфоновой кислоты. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 1

**Сульфатирование хитозана хлорсульфоновой кислотой с варьированием соотношения компонентов ХЗ: ХСК при температуре 25 °С, 3 ч**

№	Соотношение	S, %	N, %	СЗ	Выход, %	Р* %	ММ, кДа
1	1:2	11,9	4,30	0,90	63,9	78	68,0
2	1:3	12,5	4,08	0,96	73,1	85	55,3
3	1:4	13,4	3,90	1,07	78,4	89	46,4
4	1:6	14,6	3,76	1,22	86,3	92	35,9
5	1:8	13,8	3,89	1,12	79,0	90	24,5
6	1:10	14,0	3,83	1,14	82,5	95	20,2

*Р\*-растворимость*

Таблица 2

**Влияние времени синтеза на образование сульфата хитозана при использовании ХСК (соотношение компонентов 1:6, при температуре 25°С)**

№	Время, ч.	S, %	N, %	СЗ	Скорость реакции, *10 <sup>-4</sup> моль/л.сек	Выход, %	Р*, %	ММ, кДа
1	0,5	8,76	5,30	0,56	8,46	66,31	68,0	68,4
2	1	9,76	4,38	0,68	5,14	71,6	76,0	54,0
3	2	10,8	4,20	0,78	2,95	77,3	86,0	44,7
4	3	14,6	3,76	1,22	3,07	86,3	92,0	35,9
5	4	14,1	3,90	1,15	2,17	81,2	90,0	26,9
6	5	13,8	4,0	1,12	1,79	79,0	89,0	19,0

Выявлено, что с увеличением продолжительности синтеза происходит закономерное увеличение степени замещения и содержания серы, а также снижается молекулярная масса от 68,4 кДа до 19 кДа, что является подтверждением деструкции макромолекул при длительном воздействии хлорсульфоновой кислоты. На основе полученных результатов выявлено, что время синтеза – 3 ч является самым оптимальным для образования сульфата хитозана. Результаты определения скорости реакции свидетельствуют о том, что с увеличением времени синтеза наблюдается снижение скорости реакции от  $8,46 \times 10^{-4}$  до  $1,79 \times 10^{-4}$ , которое обусловлено уменьшением количества нереагирующих молекул хлорсульфоновой кислоты.

С целью изучения зависимости свойств сульфата хитозана от температуры синтеза реакцию проводили в присутствии ХСК в соотношении компонентов ХЗ: ХСК 1:6 в течение 3 ч при температуре 20-70°С. Обнаружено, что с увеличением температуры происходит не только образование конечных продуктов, но и наблюдается обратный процесс, при котором

снижается степень замещения сульфата хитозана. Полученные результаты подтверждают, что с увеличением температуры более чем 50°C происходит уменьшение степени замещения сульфогруппы и содержания серы. Это может происходить за счет увеличения скорости обратной реакции под действием высоких температур. Полученные данные представлены в таблице 3.

Таблица 3

**Влияние температуры синтеза на образование сульфата хитозана**

№	Т°С	S, %	N, %	СЗ	Выход, %	Р*	ММ, кДа
1.	20	14,6	3,76	1,22	86,3	92,0	35,9
2.	30	14,8	3,46	1,24	83,0	90,0	29,1
3.	40	15,6	3,30	1,37	78,2	94,0	24,5
4.	50	15,7	3,20	1,38	76,5	95,0	22,0
5.	60	14,2	3,87	1,17	68,4	87,0	17,4
6.	70	14,4	3,70	1,20	65,2	88,0	15,0

Установлено, что при температуре 50°C происходит высокая степень замещения и содержания серы. Однако необходимо отметить, что с увеличением температуры синтеза обнаруживается снижение выхода конечных продуктов от 86,3% до 65,2%.

Таким образом, установлено, что сульфат хитозана может быть синтезирован путем проведения реакции сульфатирования ХЗ различными сульфатирующими агентами. При этом процесс характеризуется непостоянной скоростью реакции. Увеличение степени замещения приводит также к закономерному снижению степени полимеризации вследствие гидролиза гликозидной связи. Оптимальными условиями синтеза являются продолжительность 3 ч, температура 50°C и соотношение компонентов ХЗ:ХСК 1:6. При этих условиях удается получать СХЗ с достаточно высокой СЗ.

**Список литературы**

1. Милушева Р.Ю., Рашидова С.Ш. Хитин, хитозан *Bombyx mori* и наносистемы на их основе // Издательство «Фан» АН РУз. 2016. 247 с.
2. Vikhoreva G., Bannikova G., Stolbushkina P., Panov A., Drozd N., Makarov V., Varlamov V., Galbraikh L. Preparation and anticoagulant activity of a low-molecular-weight sulfated chitosan // Carbohydrate Polymers. 2005. Vol. 62. P. 327–332.
3. Vazira N. Rakhmanova, Sayyora Sh. Rashidova. Molecular-weight characteristics of chitosan sulfate *Bombyx mori* // Journal of Scientific and Engineering Research. 2020. Vol.7(8). P. 57–60.
4. Huang R., Du Y., Zheng L., Liu H., Fan L. A new approach to chemically modified chitosan sulfates and study of their influences on the inhibition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* growth. // Reactive & Functional Polymers. 2004. Vol. 59. P. 41–51.
5. Wang R., Huang J., Wei M., Zeng X. The synergy of 6-O-sulfation and N- or 3-O-sulfation of chitosan is required for efficient inhibition of P-selectin mediated human melanoma A375 cell adhesion. Bioscience Biotechnology Biochemistry // 2010. Vol. 74. P. 1697–1700.
6. Jayakumar R., New N., Tokura S., Tamura H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials // International Journal of Biological Macromolecules. 2007. Vol. 40. P. 175–181.

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ХИТОЗАНА, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ *APIS MELLIFERA*

А.С. Менглиев, Г.А. Ихтиярова

Ташкентский государственный технический университет им. Ислама Каримова,  
Ташкент, Узбекистан  
E-mail: mengliyev\_as@mail.ru

Интерес к хитину и хитозану связан с их уникальными физиологическими и экологическими свойствами, такими как биосовместимость, биодеструкция, физиологическая активность при отсутствии токсичности, способность к селективному связыванию тяжелых металлов и органических соединений, способность к волокну- и пленкообразованию и т.п. [1, 2].

Благодаря биологической совместимости, безопасности, биodeградируемости хитозан используют в медицине, сельском хозяйстве, пищевой, бумажной и кожевенной промышленности [3]. Считают, что он является ключом для развития химико- биологических материалов в 21-ом веке.

Методами химической модификации хитозана создан ряд новых биологически активных материалов. Приоритетный интерес к этим продуктам связан с тем, что сохраняются основные физико-химические и биологические свойства исходного полимера и, в зависимости от характера вводимых групп, он приобретает новые свойства [4].

Растворимость этих полисахаридов в слабых и разбавленных кислотах определяется степенью деацетилирования, т.е. содержанием в молекуле свободных аминогрупп. Когда степень деацетилирования менее 50 %, биополимер принято называть хитином. При степени деацетилирования более 50 % (обычно более 60 %) полисахарид становится растворимым в разбавленных растворах органических и неорганических кислот. Такой полисахарид получил название хитозан. Обычно этот термин используется для глубоко деацетилированного хитина, который является растворимым в разбавленной уксусной кислоте [5].

Целью данной работы является определение растворимости хитозана *Apis Mellifera*, определение вязкости и молекулярной массы хитозана, а также с использованием известных и наиболее доступных методов определение степени деацетилирования хитозана *Apis Mellifera*.

*Растворимость.* Определение растворимости хитозана в уксусной кислоте — важный показатель качества. Хитин в отличие от хитозана не растворим в уксусной кислоте, следовательно, проверка растворимости и определение массы нерастворимой фракции хитозана показывает эффективность процесса деацетилирования [6]. Растворимость хитозана в уксусной кислоте обусловлена наличием в хитозане первичных аминогрупп, способных ионизироваться (протонироваться) в кислой среде.

Образец хитозана растворяли в 2 % растворе уксусной кислоты при перемешивании, через 10 минут раствор фильтровали и определяли массу нерастворенного хитина по остатку на фильтре после высушивания до постоянной массы. Результаты опыта представлены в табл. № 1.

Таблица 1

## Содержание нерастворимых фракций хитозана

№	Вид хитозана	Доля нерастворимой фракции, %
1.	Из подмора пчел <i>Apis Mellifera</i> .	5

*Определение вязкости хитозана.* Характеристическую вязкость хитозана определяли вискозиметрическим методом (рисунок 1, вискозиметр Хёплера, Thermo Scientific, Германия). В качестве растворителя использовали 2 % раствор уксусной кислоты, измерение вязкости проводили с растворами хитозана концентрацией: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 %. Полученные результаты представлены в табл. № 2. Характеристическая вязкость представлена на рисунке 2.

Таблица 2

**Определение вязкости хитозана *Apis Mellifera*  
t растворителя (2 % раствор уксусной кислоты) = 10,15 сек**

№	Концентрация хитозана, С %	t <sub>1</sub> , секунд	$\eta_{отн.}=t_1/t_0$	$\eta_{удел}=\eta_{отн.}-1$	$\eta_{хар.}=\eta_{удел}/C$
1.	0,1	37,29	3,67	2,67	26,70
2.	0,2	74,40	7,33	6,33	31,67
3.	0,3	133,2	13,12	12,12	40,40
4.	0,4	249,6	24,59	23,59	58,97

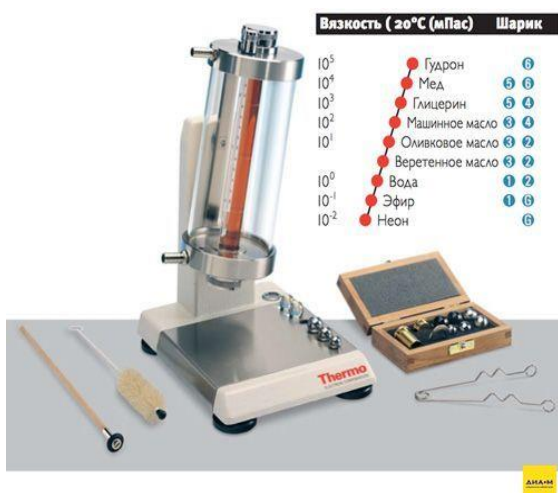


Рис. 1. Вискозиметр Хёплера

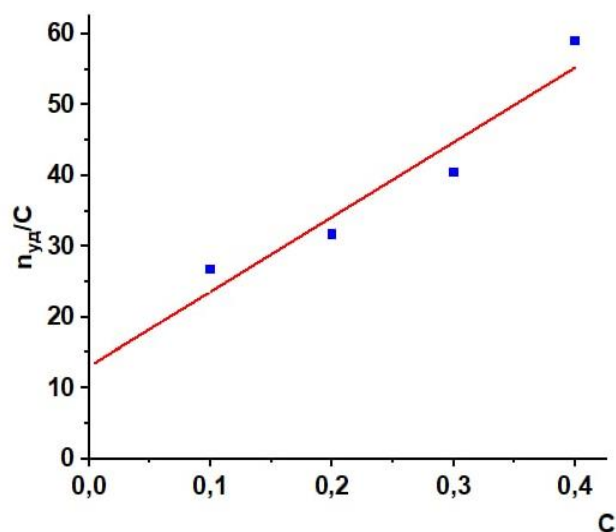


Рис. 2. Зависимость характеристическая вязкости хитозана *Apis Mellifera* от концентрации

Из графических данных характеристическая вязкость хитозана *Apis Mellifera*, составляет  $\eta_{хар.}=12,00$ .

Таким образом, источником для получения хитина и хитозана является подмор пчел *Apis Mellifera*. Расширение областей применения данных биополимеров обуславливает поиск новых перспективных источников исследуемых полисахаридов.

### Список литературы

1. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение / под. ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревской, В.П. Варламова. М., 2002. С. 368.
2. Гальбрайт Л.С. Хитин и хитозан: строение, свойства, применение // Соросовский образовательный журнал. 2001. Т. 7, №. 1. С. 51–56.

3. Немцев С.В. и др. Получение хитина и хитозана из медоносных пчёл // Прикладная биохимия и микробиология. 2004. Т. 40, № 1. С.46–50.
4. Гришин А.А., Зорина Н.В., Луцкий В.И. Хитин и хитозан: химия, биологическая активность, применение. Известия вузов. прикладная химия и биотехнология, 2014, № 1 (6). С. 29–34.
5. Быкова В.М., Немцев С.В. Сырьевые источники и способы получения хитина и хитозана // Тр. ВНИРО. М.: ВНИРО, 1988. С. 22–25.
6. Растворимость хитина и хитозана в ионных жидкостях растворенного строения / А.А. Муравьев [и др.] // Известия высших учебных заведений. 2012. Т. 17, № 3. С. 67–71.

## **О-АЦИЛИРОВАНИЕ N-ФТАЛОИЛХИТОЗАНА С ПРИМЕНЕНИЕМ МАЛОТОКСИЧНЫХ РЕАГЕНТОВ И РАСТВОРИТЕЛЕЙ**

**А.А. Захаревич<sup>1,2</sup>, С.Н. Малахов<sup>1</sup>, С.Н. Чвалун<sup>1</sup>, Т.Е. Григорьев<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,  
площадь Академика Курчатова, д. 1, Москва, 123182, Россия*

<sup>2</sup> *ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет»,  
проспект Вернадского, дом 78, Москва, 119454, Россия*

*E-mail: bestiamalum@yandex.ru*

Зеленая химия – современная концепция развития науки и техники, главными приоритетами которой являются безопасность и экологичность деятельности человека: начиная с научно-исследовательской деятельности и синтеза новых соединений, и заканчивая промышленным получением различных материалов. Ее идеи давно перешли из разряда сугубо философских в плоскость прагматичных интересов в связи с высокой актуальностью проблем экологии. Кроме того, существующий уровень развития науки и технологий позволяет пересмотреть приоритеты промышленных процессов в пользу безопасности человека на всех этапах производства [1]. Особенно актуально это для химической отрасли и требует внедрения новых подходов к получению уже известных продуктов. Разработка безопасных и экологичных процессов подразумевает, в том числе, замену опасных реагентов и растворителей на малотоксичные или нетоксичные.

Хитин – второй по распространенности в природе биополимер, который присутствует в экзоскелетах членистоногих, в организмах водорослей, грибов и губок [2]. Защитная и опорная функции хитина обусловлены его низкой растворимостью, способностью образовывать комплексы с белковыми молекулами и другими полисахаридами, а также высокой степенью кристалличности, благодаря которой полимер приобретает прочность и жесткость [2].

Хитозан представляет собой частично или полностью деацетилированное производное хитина (степень деацетилирования  $\geq 50\%$ ) и находит более широкое применение: в создании кровоостанавливающих и ранозаживляющих препаратов, систем доставки лекарственных средств, а также безопасных флокулянтов для очистки сточных вод. В растворах с рН ниже 6.0–6.5 первичные аминогруппы хитозана, высвободившиеся в процессе деацетилирования, способны присоединять протоны, что делает хитозан растворимым в разбавленных кислотах поликатионом [3]. Положительные заряды на цепи полисахарида определяют его полезные свойства, а именно фунгицидную и антибактериальную активность, противовоспалительные



и ранозаживляющие свойства, способность связываться с биологическими мембранами. Стоит отметить, что сырьем для производства хитозана часто являются отходы рыбоперерабатывающих предприятий, что также согласуется с принципами бережного использования природных ресурсов.

Несмотря на спектр уникальных свойств хитозана, его применение для изготовления материалов может быть осложнено ограниченной растворимостью полисахарида в органических растворителях, в то время как современные методы получения материалов – электроспиннинг или 3D-печать, – часто требуют их использования.

Среди способов химической модификации хитозана для придания ему органорастворимости наиболее часто упоминается ацилирование по гидроксильным группам [4]. Такой способ подразумевает селективное воздействие на молекулы биополимера, не затрагивающее аминогруппы, что позволяет сохранить биологические эффекты и сорбционную активность хитозана. Среди методов, позволяющих исключить из реакции ацилирования аминогруппы, наиболее часто упоминается применение фталевой защиты [5] или защиты протонированием, для чего реакцию ацилирования проводят в среде сильной кислоты, в основном метансульфоновой [6].

Каждый из методов имеет свои достоинства и недостатки: ацилирование в среде метансульфоновой кислоты действительно позволяет минимизировать взаимодействие аминогрупп с ацилирующим агентом, но не исключает его полностью. Кроме того, в сильной кислоте хитозан подвергается деполимеризации, что негативно сказывается на физико-механических свойствах получаемого из него материала. Применение фталевой защиты обеспечивает хорошую селективность O-ацилирования, но требует дополнительной стадии удаления защиты, которое осуществляется посредством гидразинолиза.

Ацилирование хитозана в подавляющем большинстве случаев проводят в среде пиридина, который выступает в роли основания и растворителя [7]. При этом стоит учитывать, что и пиридин, и гидразин, нужный для удаления фталевой защиты, не только представляют опасность для экологии, но и наносят вред здоровью людей, контактирующих с ними.

В настоящем исследовании предложен подход к синтезу O-ацилированных производных хитозана с применением фталимидной защиты на примере 6-O-бутирилхитозана. Главным преимуществом разрабатываемого подхода является отказ от высокотоксичных реагентов в пользу более безопасных. Так реакцию ацилирования хитозана бутирилхлоридом предложено вести в среде ДМСО. ДМСО – недорогой высококипящий низкотоксичный растворитель, который подлежит очистке и повторному использованию. Применяется в качестве противовоспалительного средства в медицине и как криопротектор для клеток.

В качестве безопасной альтернативы гидразинолизу предложено использовать восстановление аминогрупп хитозана при помощи борогидрида натрия, который не только менее токсичен в сравнении с гидразином, но и позволяет вести процесс в более мягких условиях, что минимизирует деструктивные изменения в цепи полимера.

Синтезированный 6-O-бутирилхитозан проявляет растворимость в апротонном сильнополярном растворителе ДМСО, который считается перспективным с точки зрения «зеленых» технологий [8].

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения № 075-15-2023-324.*

## Список литературы

1. Н.П. Тарасова, Ф.И. Ингель, А.С. Макарова. Зеленая химия как инструмент снижения рисков, обусловленных воздействием химически опасных объектов на окружающую среду // *Химическая физика*. 2015. Т. 34, № 6. С. 5–11.
2. B.T. Iber. A Review of Various Sources of Chitin and Chitosan in Nature // *Journal of renewable materials*. 2022. Vol. 10, N 4. P. 1097–1123.
3. G. Kumar, J.F. Bristow et al. // *Polymer*. 2000. Vol. 41, N 6. P. 2157–2168.
4. V.K. Mourya, N.N. Inamdar. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore // *Reactive & Functional Polymers*. 2008. Vol. 68. P. 1013–1051.
5. K. Kurita et al. N-Phthaloylated chitosan as an essential precursor for controlled chemical modifications of chitosan: synthesis and evaluation // *Polymer Journal*. 2007. Vol. 39, N 9. # 945.
6. H. Sashiwa et al. Chemical Modification of Chitosan 121: Synthesis of Organo-soluble chitosan derivatives toward palladium absorbent for chemical plating // *Chemistry Letters*. 2002. Vol. 31, N. 6. P. 598–599.
7. C. Chen et al. Long-alkane-chain modified N-phthaloyl chitosan membranes with controlled permeability // *Carbohydrate Polymers*. 2013. Vol. 91. P. 269–276/
8. O.A. El Seoud et al. Chemistry and applications of polysaccharide solutions in strong electrolytes/dipolar aprotic solvents: An Overview // *Molecules*. 2013. Vol. 18. P. 1270–1313.

## НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ ХИТОЗАНА

А.С. Критченков<sup>1,2</sup>, А.А. Киричук<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Российский университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Институт экологии, Факультет физико-математических и естественных наук, Объединенный институт химических исследований, Москва*

<sup>2</sup> *Институт технической акустики Национальной академии наук Беларуси, Витебск, Беларусь  
E-mail: platinist@mail.ru*

До недавнего времени химия природных полимеров хитина и хитозана в значительной степени была ограничена традиционными органическими реакциями. Расширение круга полимераналогичных превращений, в которые могут быть вовлечены хитин и хитозан, является важной и актуальной задачей современной химии высокомолекулярных соединений. Новые полимераналогичные превращения указанных полисахаридов позволят получить новые их полимеры с привлекательными физико-химическими, механическими и биологическими (в том числе и фармакологическими) свойствами.

В нашей научной группе в данной области проводятся исследования в двух направлениях: (1) промотируемые ультразвуком новые полимераналогичные производные хитина и хитозана и (2) электрохимические полимераналогичные превращения хитина и хитозана. В результате развития указанных направлений нами внедрены в химию хитина и хитозана ультразвуковое тиол-иновое и фенол-иновое присоединение, нитрон-нитрильное 1, 3-диполярное циклоприсоединение, электрохимическое прямое *N*-арилирование, получены новые высокоактивные антибактериальные полимеры, плёнки и пищевые покрытия на их

основе, наночастицы и системы доставки лекарств. Этим и другим достижениям в химии полисахаридов будет посвящен данный доклад.

### Список литературы

1. Kritchenkov A. S., Zhaliuzniak N. V., Egorov A. R., Lobanov N. N., Volkova O. V., Zabodalova L. A., Suchkova E. P., Kurliuk A. V., Shakola T. V., Rubanik V. V., Rubanik V. V., Yagafarov N. Z., Khomik A. S., Khrustalev V. N. Carbohydrate Polymers. 2020. Vol. 242.

*Работа выполнена при поддержке РНФ, проект № 22-23-00044.*

## DFT INVESTIGATION ON THE INTERACTION OF CHITOSAN WITH COLLAGEN

**I.N. Nurgaliev, N.J. Burkhanova, S.Sh. Rashidova**

*Institute of Chemistry and Physics of Polymers of the Academy  
of Sciences of the Republic of Uzbekistan  
E-mail: ilnarvodnik@gmail.com*

In recent years, there has been an increase in demand for new materials based on polyelectrolyte complexes (PEC), the focus of scientists is attracted by the capability of chitosan (CS) complexes with biologically active polymers [1–6]. These CS based PECs exhibit favorable physicochemical properties with preservation of CS biocompatible characteristics. These complexes are therefore good candidate excipient materials for the design of different types of dosage forms [7, 8]. Complexation is greatly affected by the conformation and molecular mass of CS macromolecules, degree of polydispersity, degree of deacetylation, dissociation constant of the protonated amino groups of chitosan and the distribution of functional (amino and acetamido) groups along the polymer chain. Indeed, calculations of interaction energy and what functional groups and atoms interact is a key information in the interaction of collagen protein with CS.

The theoretical objective of the current work is to investigate the interaction of CS with collagen using the DFT method to be a primer for understanding the interaction so as to theoretical validation of literature experimental results. A monomeric link was taken as the structural unit of CS, as the structural unit of collagen was taken the asparagine and glutamine.

The calculations were performed using the GAUSSIAN 09 package [9] and the Gaussview 5.0.9 molecular visualization program using DFT with the standard set basis 6-31++G (d,p) [10]. The first stage of the theoretical calculation was the determination of the optimized molecular structures of CS and amino acids (AA). The charges of atoms are calculated, diagrams of boundary molecular orbitals are constructed: the highest occupied (HOMO) and lowest unoccupied (LUMO) molecular orbitals and their energies are determined. Interactions of CS with AAs were studied using reactivity descriptors. A monomeric link was taken as the structural unit of CS; in calculations in the gas phase, AAs are considered as a nonionic form due to the greater intrinsic affinity for the proton of the carboxylate oxygen atom compared to the nitrogen atom of the amino group. The interaction energy ( $\Delta E_{inter}$ ) is calculated using the equation-based approach:

$$\Delta E_{inter} = E_{CS-AA} - (E_{CS} + E_{AA}) + E_{BSSE}$$

where ECS-AA, ECS and EAA are the energy of the complex, CS and AAs, respectively. EBSSE is a base set superposition error (BSSE) correction calculated using the direct difference method for calculating molecular interactions based on a bivariate transcorrelation approach together with special methods for estimating other errors [11].

The calculated group charge distribution for the tertiary hydrogen atom of the protonated amino group of CS is 1.54 a.u [12]. These values indicate that these hydrogen atoms have a tendency to form hydrogen bonds with electronegative centers. Similarly, a group charge of 1.55 a.e. for oxygen atom in Asparagine and 1.56 a.e. for oxygen atom in Glutamine allowed us to evaluate the atypical CS-AA interaction between electronegative atoms with  $-\text{COO}^-$  and  $-\text{NH}_3^+$  CS group. The optimized structure of the complexes under consideration is shown in Figure 1.

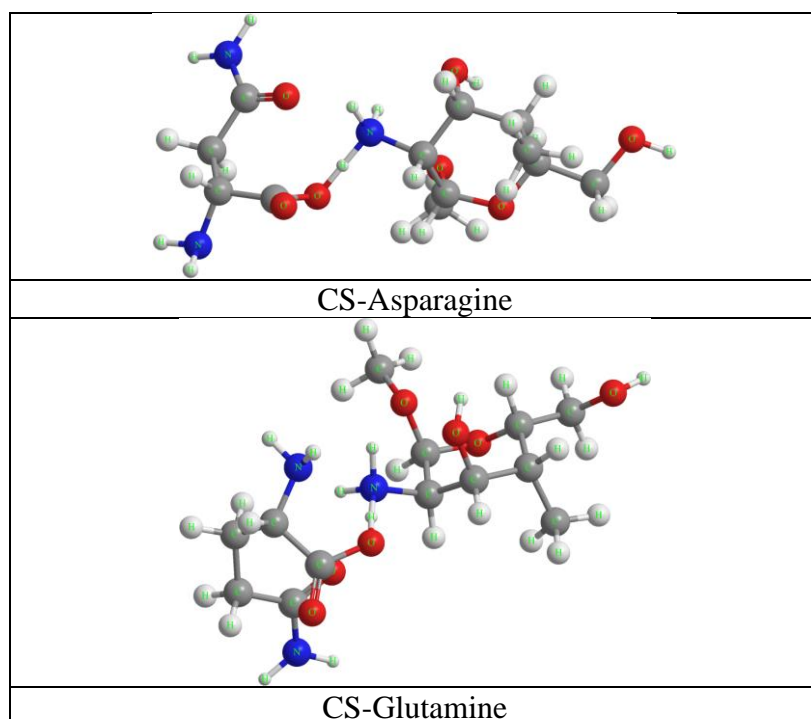


Fig. 1. Optimized geometries of CS complexes with AAs

The DFT calculations showed the presence of hydrogen bonds between the nitrogen atom of the amino group of the CS and the O atom of the  $-\text{COO}^-$  groups of the studied amino acids (Table 1). According to Table 1, the distance between the H atom of the  $-\text{NH}_3^+$ -group of CS and the O atom of the  $-\text{COO}^-$  groups of AAs is in the range of 1.001 Å (Asparagine) and 0.999 Å (Glutamine) which is typical for hydrogen bonds [13]. This indicates that CS forms hydrogen bonds with amino acids during the formation of complexes. Various protonation states of the complexes were tested as starting points for geometry optimization. The results have not confirmed the proton transfer complexes. Cationic or anionic AAs are well known for their ability to form hydrogen bonds with oppositely charged species [14], however, the formation of such a salt bridge in the gas phase of the complexes under consideration was not observed. A high value of  $\Delta E_{\text{inter}}$  promotes strong binding between CS and AAs in the complex while a decrease in energy values promotes the dissociation of the complex. Moreover, on the basis of the  $\Delta E_{\text{inter}}$  values the suitability of the carrier with respect to a particular AA can be assessed. The calculated values of  $\Delta E_{\text{inter}}$  in gas and Aqueous phases are presented in Table 1. As can be seen from the Table 1 the calculated values of  $\Delta E_{\text{inter}}$  are negative in all cases which contributes to the formation of complexes. As for the high value of  $\Delta E_{\text{inter}}$  for CS-

Glutamine, this may be due to the strong Coulomb force of attraction which leads to hydrogen migration. The charge O atom of  $-\text{COO}^-$  group of is more glutamine (-0.64 e) negative than of asparagine (-0.62 e).

Table 1

**Hydrogen bond distance and BSSE corrected interaction energy  
of CS with AAs complexes**

Complex	Aqueous phase, Å	$\Delta E_{\text{inter.}}$ , kkal/mol (Gas phase)	$\Delta E_{\text{inter.}}$ , kkal/mol (Aqueous phase)
CS-Asparagine	1.001	-89.51	-18.96
CS-Glutamine	0.999	-105.49	-23.1

Since the reaction of formation of complexes of CS with Collagen was carried out in the aqueous phase and the interaction energy is of decisive importance for the biomedical applications of such complexes a calculation was carried out on the effect of the aqueous phase on the interaction to simulate the behavior of the passage of complexes through the cellular media of living organisms. As can be seen from Table 1, the influence of the aqueous phase largely affects the interaction energy of these systems. There is a progressive destabilization of CS complexes with AAs. The results show that molecules with opposite charges are indeed more separated and more stable than complexes in water which leads to a decrease in interaction energy. This can also be explained by the fact that in polar environments the interaction with the environment (solvation) is probably more important than the electrostatic interaction between the two interacting molecules which leads to their preferential stabilization. Due to the solvation of positively charged fragments, the repulsive interaction between them decreases which can increase the strength of their interaction with the formation of hydrogen bonds.

Understanding the chemical activity of the studied complexes in various media is important from the point of view of their medical applications. Reactivity descriptors determined [15] on the basis of a theoretical physicochemical study by the DFT and electronic structure have become an auxiliary tool for interpreting the chemical and biological activity of compounds.

The calculated values of these parameters among the selected systems in the gas and water phases are presented in Tables 2 and 3. The measurement of the EHOMO of the complexes is an important factor since this characteristic indicates the electron donating capacity, i.e. reactivity of compounds. The narrow band gap means that the system has low kinetic stability and high biological activity. The calculation results shows there is a decrease in the HOMO and LUMO energy in AAs during the formation of a complex with CS which speaks in favor of a more stable structure in complexes than in AAs. This result means that complexes of CS with AAs are less prone to attack by any electrophile than the AAs themselves. Similarly, a high negative value of  $\mu$  means a relatively large stability of the system. As can be seen from Tables 2 and 3, in accordance with  $E_{\text{HOMO}}$  and  $E_{\text{LUMO}}$ , data on the chemical potential also characterize the greater chemical stability of the complexes than AAs and also show differences in the nature of the interaction with respect to different AAs. The narrow energy gap characterizes the nucleophilic properties of the complexes. All complexes have a wide HOMO-LUMO band gap. According to the calculation data given in Table 2, the smallest band gap  $\Delta E$  (10.15 eV) is observed for the CS-Asparagine complex and 10.16 eV for CS-Glutamine. This may be due to low chemical activity and high kinetic stability.

Chemical hardness quantitatively determines the chemical stability of a molecular system in various media [16]. The higher the electronegativity, the more electronegative the molecule, and the higher the value of chemical hardness, the “harder” the molecule [17–19].

Table 2

**Calculated electronic parameters in the gas phase of complexes**

Amino acid	$E_{\text{HOMO}}$ , eV	$E_{\text{LUMO}}$ , eV	$\Delta E$	Complex	$E_{\text{HOMO}}$ , eV	$E_{\text{LUMO}}$ , eV	$\Delta E$
Asparagine	-9.92	0.79	10,71	CS-Asparagine	-9.6	0.55	10,15
Glutamine	-10.13	0.62	10,75	CS-Glutamine	-9.65	0.51	10,16

Table 3

**Calculated descriptors of reactivity in the gas phase of complexes**

Complex	Chemical hardness ( $\eta$ ), eV	Electrophilicity Index ( $\omega$ ), eV	Chemical potential ( $\mu$ ), eV	Softness ( $\zeta$ ), eV <sup>-1</sup>
CS-Asparagine	4,52675	2,8691	-5,09665	0,220909
CS-Glutamine	4,5875	2,8307	-5,0963	0,217984

According to Table 3, the value of chemical hardness (4,5875 eV) for CS-Glutamine indicates a greater stability of the complex than AAs but at the same time characterizes a large difference in the interaction energy compared to other AAs. The softness of CS-Asparagine increases and the activity increases. Moreover, in all cases, the maximum stiffness is not associated with a small value of electrophilicity. In addition, it is worth noting that the stability predicted by the change in the interaction energy of the gas phase coincides with the trend shown by the values of  $E_{\text{HOMO}}$  and  $\eta$ . The order of stability in the gas phase of the complexes according to the values of  $E_{\text{HOMO}}$ ,  $\eta$ , and  $\zeta$ , which also correlates with the value of the interaction energy. However, this correlation of interaction energy values with reactivity descriptor values for the complexes is not consistent with those of other interactions of CS with AAs, the highest values of the interaction energy do not correlate with the values of  $\eta$  and  $\zeta$ . This fact of discrepancy can be explained by the fact that the LUMO of AAs (acting as an H-donor/acceptor of electrons) in two complexes interact to a different extent. Although the nature of the change in  $\eta$  does not allow us to make any general conclusion about the chemical stability of the studied complexes, the values of HOMO and  $\eta$  do confirm the greater stability of the CS-Glutamine complex compared to glutamine, as well as the orders of stability, the calculated values of  $\eta$  and  $\zeta$  are in full agreement with calculated values of interaction energy.

The results indicate a strong interaction between CS and AAs in a non-polar environment and a gradual weakening of the interaction in the aqueous phase, these results are of interest in modeling the process of penetration of complexes through a cell membrane which is non-polar in nature. Significantly high value of interaction energy in the gas phase at a very low energy value in the aqueous phase for the complexes indicates its suitability for use in biomedicine.

### References

1. D. Wu, L. Zhu, Y. Li, X. Zhang, Sh. Xu, G. Yang, Th. Delair. Chitosan-based colloidal polyelectrolyte complexes for drug delivery: a review // *Carbohydr. Polym.* 2020. Vol. 238, 15, P. 116126.
2. Y. Luo, Q. Wang. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery // *Int. J. Biol. Macromol.* 2014. Vol. 64, P. 353–367.
3. D. Nikolova, M. Simeonov, Ch. Tzachev, A. Apostolov, L. Christov, E. Vassileva. Polyelectrolyte complexes of chitosan and sodium alginate as a drug delivery system for diclofenac sodium // *Polym. Int.* 2022. Vol. 71, I. 6, P. 668–678.

4. M.A. Krayukhina, N.A. Samoilova, I.A. Yamskov. Polyelectrolyte complexes of chitosan: formation, properties and applications // *Russ. Chem. Rev.* 2008. Vol. 77, N 9, P. 799–813.
5. N.P. Birch, J.D. Schiffman. Characterization of self-assembled polyelectrolyte complex nanoparticles formed from chitosan and pectin // *Langmuir*. 2014. Vol. 30, I. 12, P. 3441–3447.
6. J.H. Hamman. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems // *Mar. Drugs*. 2010. Vol. 8, I. 4. P. 1305–1322.
7. A.V. Il'ina, V.P. Varlamov, Chitosan-based polyelectrolyte complexes: a review // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2005. Vol. 41, P. 5–11.
8. V.P. Varlamov, A.V. Il'ina, B.Ts. Shagdarova, A.P. Lunkov, I. S. Mysyakina. Chitin/chitosan and its derivatives: fundamental problems and practical approaches // *Biochem. (Moscow)*. 2020. Vol. 85, Suppl. 1, P. S154S176.
9. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, et al. Gaussian, Inc., Wallingford CT. 2010.
10. A.D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange // *J. Chem. Phys.* 1993. Vol. 98, P. 5648–5652.
11. A. Galano, J.R.A. Idaboy, New approach to counterpoise correction to BSSE // *J. Comput. Chem.* 2006. Vol. 27, N 11, P. 1203–1210.
12. M. Emmanuel, A. Pogrebnoi, T. Pogrebnyaya, Theoretical study of the interaction between chitosan constituents (glucosamine and acetylglucosamine dimers) and Na<sup>+</sup> ions // *Open Access Library Journal*. 2015. Vol. 2, # e1978.
13. B.C. Deka, P.K. Bhattacharyya, Understanding chitosan as a gene carrier: A DFT study // *Comput. Theor. Chem.* 2015. Vol. 1015, P. 35–41.
14. J.E. Donald, D.W. Kulp, W.F. DeGrado E. Donald, Salt bridges: geometrically specific, designable interactions. *Proteins: structure, functions* // *Bioinform.* 2010. Vol. 79, No 3, P. 898–915.
15. P.K. Chattaraj, D.R. Roy, Update 1 of electrophilicity Index // *Chem. Rev.* 2007. Vol. 113, N 5, P. PR46–PR74.
16. R.G. Parr, P.K. Chattaraj, Principle of maximum hardness // *J. Am. Chem. Soc.* 1991. Vol. 113, N 5, P. 1854–1855.
17. K.B. Lipkowitz, D. B. Boyd, Population analysis and electron densities from quantum mechanics // *Rev. Comput. Chem.* 2007. P. 171–228.
18. P.K. Chattaraj. *Chemical reactivity theory: a density functional view*, 1st edition. P.K. Chattaraj. CRC Press. 2009. 616 p.
19. P.K. Chattaraj, D.R. Roy, Update 1 of: electrophilicity Index // *Chem. Rev.* 2007. Vol. 113, N 5, P. PR46–PR74.

## Секция 2. ХИТИНОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ

### ВЫДЕЛЕНИЕ ХИТИНАЗ ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА И КРАБА-СТРИГУНА ОПИЛИО

**К.С. Рысакова, В.Ю. Новиков, Н.В. Шумская, А.М. Мухортова**

*Полярный филиал ФГБНУ «ВНИРО» («ПИНРО им. Н.М. Книповича»),  
ул. Академика Книповича, дом 6, Мурманск, 183038, Россия  
E-mail: nowitaly@yandex.ru*

Получение ферментных препаратов (ФП) специфического действия является одним из важных направлений развития современной биотехнологии. В качестве сырья наибольший интерес представляют отходы промышленной переработки морских гидробионтов, которые могут достигать 60 % от массы улова. Одним из потенциальных источников ферментов разной субстратной специфичности в последние годы стал гепатопанкреас краба, масса которого составляет до 8 % массы тела животного [1, 2]. Актуальность получения ФП в настоящее время связана также с развитием береговой переработки краба.

Помимо протеолитических ферментов с коллагенолитической активностью, в гепатопанкреасе камчатского краба обнаружены хитинолитические ферменты, которые представляют особый интерес для промышленной модификации хитина и хитозана и позволяют оценить возможность более рентабельного использования внутренних органов промысловых беспозвоночных в качестве сырья для их получения [3].

Хитинолитические ферменты выделяют преимущественно из культуральной жидкости микроорганизмов (бактерий и грибов), растущих на хитинсодержащих средах [4]. Образование больших объемов гепатопанкреаса краба при береговой переработке открывает возможность выделения из него хитинолитических ферментов. Из отходов переработки гидробионтов получают обычно препараты, содержащие смесь ферментов. Выделение отдельных ферментов связано со значительными затратами и многостадийными процессами. Для разделения комплексных ФП на отдельные ферменты используются различные методы [5]: мембранные методы, осаждение органическими растворителями и солями, методы избирательной денатурации, адсорбции и др. Наиболее перспективным для промышленного фракционирования, по-видимому, являются ультрафильтрация и аффинное связывание ферментов со специфическим субстратом [6].

Ультрафильтрация позволяет очистить ФП от балластных белков с высокой молекулярной массой, низкомолекулярных пептидов и минеральных солей. Аффинная хроматография обеспечивает дополнительную очистку хитиназ. Хитиназы из различных микробных источников очищали до почти гомогенного состояния с помощью аффинной хроматографии на хитине, коллоидном хитине или хитозане [7]. Также использовали метод аффинной хроматографии на колонке, заполненной хитином [8]. ФП растворяли в буфере (рН 8,4), наносили на колонку с хитином, а затем хитиназу вымывали ацетатным буфером с градиентом рН от 5,4 до 3,2 и окончательно уксусной кислотой рН 3,2. В работе [9] хитиназы сорбировали на аффинной колонке с набухшим хитином краба и затем элюировали линейным градиентом NaCl от 0 до 1 моль/дм<sup>3</sup>.

Целью данного исследования являлось изучение способов выделения и фракционирования хитинолитических ферментов из гепатопанкреаса камчатского краба и краба-стригуна опилио.



## Объекты исследования и методики эксперимента

В работе использовали гепатопанкреас камчатского краба (*Paralithodes camtschaticus*) и краба-стригуна опилио (*Chionoecetes opilio*), заготовленный ООО «Антей-Север». Время вылова камчатского краба – осень 2021 г., краба-стригуна опилио – весна 2023 г.

Из образцов гепатопанкреаса получали комплексный ферментный препарат (ФП) по следующей технологии. Замороженный гепатопанкреас краба (камчатского или стригуна) размораживали до минус 5–0°C и измельчали, затем полученную суспензию смешивали с дистиллированной водой, охлажденной до 3–5°C. Суспензию центрифугировали при 10000 об/мин и 4°C в течение 60 мин. Отделяли среднюю фракцию – раствор белков, фильтровали и сушили в лиофильной сушилке. Высушенный ФП промывали 34 раза ацетоном, для удаления остатков липидов и сушили в вакуумном сушильном шкафу при комнатной температуре и остаточном давлении менее 0,1 атм.

Фракционирование комплексного ФП проводили на ультрафильтрационной установке УП–1 (НПП «Биоспектр», СССР) на мембранах с молекулярно-массовым пределом задержания (ММПЗ) 300, 100, 50 и 10 кДа. Обессоливание осуществляли на мембране с ММПЗ 5 кДа.

Химический состав сырья и продуктов (массовые доли воды, жира, золы, белка) определяли по ГОСТ 7636.

Экзохитиноподобную активность ( $A_{exo}$ ) определяли по реакции продукта гидролиза N-ацетилглюкозамина с 4-диметиламинобензальдегидом [10].

Эндохитиноподобную активность ( $A_{endo}$ ) измеряли в процентах уменьшения оптической плотности при 700 нм суспензии коллоидного хитина после инкубации в течение 30 мин при 37°C [11].

Суммарную активность рассчитывали на массу каждой белковой фракции, выделенной из 1 кг исходного гепатопанкреаса краба.

Молекулярно-массовое распределение белков определяли методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе LC–10A<sub>VP</sub> («Shimadzu», Япония) на колонке TSK-gel Alpha-4000 (30 × 0,78 см) («TOSOH», Япония). В качестве элюента использовали 0,15 моль/дм<sup>3</sup> раствор NaCl, pH 7, скорость 0,8 см<sup>3</sup>/мин. Фракции белков регистрировали по оптическому поглощению с помощью детектора SPD–10A<sub>VP</sub> на длине волны 280 нм.

Аффинную хроматографию выполняли на коллоидном хитине, полученным ацетилированием хитозана уксусным ангидридом в водно-спиртовой среде. Измельченный хитин (СД = 19,0 %) и хитозан получали из панциря краба по известным методикам [12]. Хитин измельчали и просеивали через сито с размером отверстий 150 меш (0,1 мм). Регенерированный хитин получали из хитозана по методике [13]. Массовая доля сухого хитина составляла 6,4 %. Хитин имел СД = 7,9 %. Полученный гель коллоидного хитина был измельчен и промыт водой на мембране. Коллоидным хитином заполняли хроматографическую колонку низкого давления. Раствор ФП в физиологическом растворе наносили в колонку при pH 6–7. Скорость элюента – 0,2 мл/мин. После элюирования неадсорбированных на хитине белков и уравнивания колонки pH элюента устанавливали равным 3,0 и вымывали белки, аффинно-связанные на хитине.

## Экспериментальные результаты и их обсуждение

Химический состав гепатопанкреасов крабов, исследованных в настоящей работе, приведен в таблице 1.

**Химический состав гепатопанкреаса камчатского краба и краба-стригуна**

Показатель	Гепатопанкреас камчатского краба	Гепатопанкреас краба-стригуна
Массовая доля воды, %	68,7	68,6
Массовая доля золы, %	1,64	1,55
Массовая доля жира, %	10,8	17,3
Массовая доля белка, %	12,7	10,5
Протеолитическая активность, мкмоль Туг/г	17,9	11,6
Эндохитинолитическая активность, %	1,5	3,3
Экзохитинолитическая активность, мкмоль GlcNAc/г	0,061	0,177

По описанной в методической части технологии было изготовлено около 500 г комплексного ФП из гепатопанкреаса камчатского краба и около 500 г – из гепатопанкреаса краба-стригуна опилио. Ферментная активность этих образцов приведена в таблице 2.

Результаты фракционирования приведены в таблице 2 и на рисунке 1. Молекулярно-массовое распределения белковых фракций после ультрафильтрации ФП из гепатопанкреаса крабов приведены на рисунке 1.

**Выход фракций и сумма хитинолитической активности в ФП и во фракциях, полученных после ультрафильтрации комплексных ферментных препаратов из 1 кг гепатопанкреаса**

Показатель	ФП из гепатопанкреаса камчатского краба	ФП из гепатопанкреаса краба-стригуна
<b>Выход от ГП, %</b>		
ФП	11.2	10.1
100–300 кДа	0.333	0.750
50–100 кДа	0.006	0.0045
10–50 кДа	0.313	0.155
<b>Эндохитинолитическая активность, %</b>		
ФП	18.9	27.4
100–300 кДа	16.9	18.9
50–100 кДа	0.195	0.075
10–50 кДа	8.73	5.70
<b>Экзохитинолитическая активность, мкмоль GlcNAc/мин</b>		
ФП	4.03	4.59
100–300 кДа	0.693	1.36
50–100 кДа	0.0007	0.0004
10–50 кДа	0.927	0.0895

Полученные результаты показали, что хитинолитические ферменты сконцентрированы преимущественно в двух фракциях с молекулярной массой (ММ) 100–300 и 10–50 кДа.

На хроматограммах белковых фракций видно, что каждая фракция обогащена белками с разной молекулярной массой. В первой фракции 100–300 кДа отчетливо виден пик около 9 мл, который принадлежит белкам с ММ около 110 кДа и, по-видимому, отвечающий за эндохитинолитическую активность. Аналогичный результат был получен в [3]. Во фракции

10–50 кДа отмечается различие в пике 10,5 мл, который, вероятно, связан с хитинолитической активностью. ММ этой фракции лежит в диапазоне 40–50 кДа.

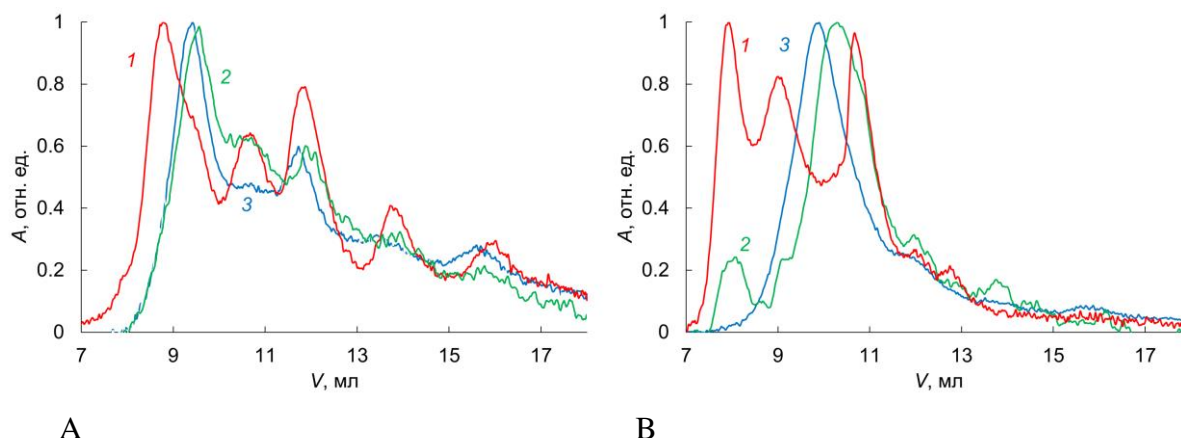


Рис. 1. Хроматограммы белков фракций ферментного препарата, полученного из гепатопанкреаса камчатского краба (А) и краба-стригуна (В). 1 – 100-300 кДа, 2 – 50-10 кДа, 3 – 10-50 кДа

Хроматограмма элюирования предварительно связанных с хитином, представленная на рисунке 2, показывает, что существует несколько фракций, которые могут быть разделены аффинной хроматографией. Предварительные результаты показали, что элюированная фракция содержит эндо- и экзохитинолитическую активность, 2,650 % и 0.144 мкмоль GlcNAc/г/мин.

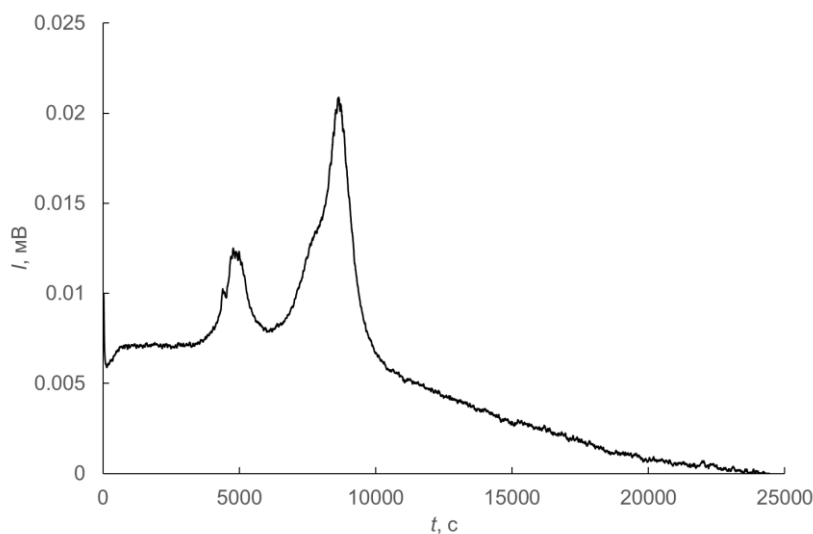


Рис. 2. Хроматограмма белков после элюирования с коллоидного хитина при pH 3,0.

Практическое использование колонки с коллоидным хитином показало, что требуется стабилизация условий. По-видимому, из-за деструкции матрицы под действием хитинолитических ферментов наблюдается сжатие хитина в колонке. Наши результаты являются предварительными, но они показали возможность очистки хитинолитических ферментов из гепатопанкреаса крабов аффинной хроматографией. Мы планируем изготовить полупрепаративную колонку для аффинной ВЭЖХ с использованием мелкокристаллического хитина.

### Список литературы

1. Ponomareva T., Timchenko M., Filippov M. et al. Prospects of red king crab hepatopancreas processing: fundamental and applied biochemistry // *Recycling*. 2021. Vol. 6, N 1. # 3.
2. Мухин В.А., Новиков В.Ю., Мухортова А.М. и др. Химический состав и биохимические свойства камчатского краба в Баренцевом море // В кн. Камчатский краб в Баренцевом море / Изд. 3-е. – Москва: ФГБНУ «ВНИРО», 2021. С. 391–452.
3. Рысакова К.С. Хитинолитическая активность ферментов у некоторых беспозвоночных Баренцева моря: диссертация ... кандидата биологических наук : 03.00.04 / Рысакова Кира Сергеевна. – Мурманск, 2008. 145 с.
4. Jeuniaux C. Chitinase of vertebrates and invertebrates // *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 1963. Vol. 71. P. 307.
5. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов. – М.: Агропромиздат, 1987. 335 с.
6. *Highly Selective Separations in Biotechnology* / G. Street (Ed.). – Chapman and Hall: London, 1994. 244 p.
7. Cheba B.A. Microbial chitinases purification: conventional protocols and affinity-based strategies (Review) // *World J. Fish. Mar. Sci.* 2015. Vol. 7, N 6. P. 458–461.
8. Yanai K., Takaya N., Kojima N. et al. Purification of two chitinases from *Rhizopus oligosporus* and isolation and sequencing of the encoding genes // *J. Bacteriol.* 1992. Vol. 174, N 22. P. 7398–7406.
9. Cheba B.A., Zaghoul T.I., El-Mahdy A.R., El-Massry M.H. Affinity purification and immobilization of chitinase from *Bacillus sp. R* // *Proc. Technol.* 2015. Vol. 19. P. 958–964.
10. Reissig J.L., Strominger J.L., Leloir L.F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars // *J. Biol. Chem.* 1955. Vol. 217, N 2. P. 959–966.
11. Declaire M., De Cat W., Tang V.H. et al. Determination of endo- and exochitinase activities of *Serratia marcescens* in relation to the culture media composition and comparison of their antifungal properties // *Chitin Enzymology*. Vol. 2 / Ed. by A. A. Muzzarelli. – Grottammare, Italy: Atec Edizioni, 1996. P. 165–169.
12. Новиков В.Ю., Коновалова И.Н., Долгопятова Н.В. Химические основы технологии получения хитина и его производных из панциря ракообразных. – СПб : ГИОРД, 2012. 208 с.
13. Hirano S., Ohe Y., Ono H. Selective N-acylation of chitosan // *Carbohydr. Res.* 1976. Vol. 47, N 2. P. 315–320.

## Секция 3. ОЛИГОХИТОЗАНЫ: ПОЛУЧЕНИЕ, АНАЛИЗ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

### ВЛИЯНИЕ ОЛИГОХИТОЗАНА 45,3 кДа НА СИНТЕЗ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ РЯДА ВИДОВ *LACTOBACILLUS*

В.П. Курченко<sup>1\*</sup>, Т.Н. Головач<sup>1</sup>, М.И. Шрамко<sup>2</sup>, А.Д. Лодыгин<sup>2</sup>, В.Е. Тихонов<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Белорусский государственный университет, пр. Независимости,  
дом 4, Минск, 220030, Беларусь

<sup>2</sup> Северо-Кавказский федеральный университет,  
ул. Маршала Жукова, 9, Ставрополь, 355000, Россия

<sup>3</sup> Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН,  
ул. Вавилова, 28, Москва, 119334, Россия

Молочная кислота (МК) имеет большой и быстро расширяющийся рынок потребления. Растущая потребность в МК обусловлена ее применением в различных отраслях промышленности: пищевой, химической, косметической, фармацевтической. Кроме того, в настоящее время МК используют в химическом синтезе ряда таких соединений, как пропиленоксид, пропановая кислота, дилактид. Актуально применение МК в синтезе конкурентоспособных биоразлагаемых растворителей и полимеров за счет отсутствия токсичности, подверженности фото- и биodeградации. Одним из таких полимеров может служить полимолочная кислота (лактид).

МК получают путем химического и микробного синтеза. Микробный синтез является наиболее предпочтительным ввиду возможности использования для сбраживания микроорганизмами дешевых субстратов, таких как меласса, рафинадная патока, сахарный сироп и др. Микробный синтез позволяет получать оптически чистые L- и D- формы МК, из которых можно синтезировать полилактиды. Гомоферментативное молочнокислое брожение, при котором синтезируется только МК, характерно, главным образом, для бактериальных и грибных микроорганизмов. Основными продуцентами молочной кислоты являются молочнокислые бактерии родов *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* и *Leuconostoc*. В промышленной биотехнологии в качестве продуцента МК широко применяются различные штаммы *Lactobacillus delbrueckii*. Кроме того, МК продуцируют мутантные штаммы *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluveromyces lactis* и *Escherichiacoli* и микромицеты.

В настоящее время многочисленные исследования направлены на совершенствование способов микробного синтеза МК, способствующих повышению технико-экономических показателей ее производства. Оптимизация микробного синтеза МК происходит за счет скрининга перспективных штаммов-продуцентов, условий ферментации, состава применяемых питательных сред. Ускорение микробного синтеза МК можно достигнуть путем взаимодействия отрицательно заряженных лактобактерий с олигохитозанами (ОХ), имеющими различную молекулярную массу [1], [2].

В соответствии с положениями о взаимодействии грамположительных микроорганизмов с полиэлектролитами при культивировании *Lactobacillus*, в присутствии ОХ возможно их многоточечное ионное взаимодействие с отрицательно заряженными молекулами тейхоевой

кислоты, заряд которым придают многочисленные остатки фосфорной кислоты [3–6]. Кроме этого, ОХ способны взаимодействовать с белками цитоплазматической мембраны. Следствием этого процесса может быть изменение метаболических процессов в клетках лактобактерий и ускорение синтеза молочной кислоты.

Целью работы являлось сравнительное изучение закономерностей биосинтеза молочнокислой кислоты при культивировании: *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus manufacturing*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* в присутствии различных концентраций ОХ с молекулярной массой 45,3 кДа.

Объектом исследования являлись *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus manufacturing*, *L. acidophilus* и *L. plantarum*.

В работе использовался ОХ с молекулярной массой 45,3 кДа и степенью ацетилирования 1% полученный по ранее описанной методике [7]; молоко сухое обезжиренное (изготовитель: АО «Молочный комбинат «Ставропольский», Россия); закваска чистых культур *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus manufacturing*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* (изготовитель: АО «Молочный комбинат «Ставропольский», Россия).

Сухое обезжиренное молоко восстанавливали в дистиллированной воде при температуре 30–35°C до массовой доли сухих веществ 10,0 %, которую контролировали рефрактометрически по ГОСТ 3626–73. После восстановления в обезжиренном молоке содержалось: 0,15 % жира, 3,2 % белка, 5 % лактозы. В опытные образцы к 100 мл восстановленного обезжиренного молока добавляли раствор ОХ 45,3 кДа до конечных концентраций 0,0025, 0,005, 0,0075 и 0,01 %. В качестве контроля использовали образец, приготовленный из сырья того же состава без добавления растворов ОХ. Опытные и контрольные образцы пастеризовали при температуре 85–87°C с выдержкой в течение 3–5 минут. После охлаждения до температуры заквашивания 43–45°C вносились бактериальные закваски *Lactobacillus* в количестве 3 % от общего объема образцов. Культивирование проводили 20 часов при температуре 45°C.

В процессе культивирования в контрольном и опытных образцах определяли: активную кислотность (рН) потенциметрически по ГОСТ 32892–2014 «Метод измерения активной кислотности», титруемую кислотность титрометрически по ГОСТ 3624–92 «Титриметрические методы определения кислотности», количество молочнокислых микроорганизмов (КОЕ/см<sup>3</sup>) по ГОСТ 10444.11-2013 «Методы определения молочнокислых микроорганизмов». Содержание (молярную концентрацию, моль/л) молочной кислоты и лактозы определяли расчетными методами по ранее описанной методике [8].

В качестве питательной среды использовалось восстановленное сухое обезжиренное молоко, которое является естественный субстратом при культивировании лактобактерий. В результате исследования процесса культивирования *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus manufacturing*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* обнаружены значительные различия влияния ОХ на молочнокислое брожение, представленные в таблице.

При культивировании *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus manufacturing* в течение 20 часов, в зависимости от содержания ОХ относительно контроля, происходило изменение активной и титруемой кислотности культуральной жидкости. При концентрации с ОХ 0,0025 % наблюдалось максимальное снижение рН культуральной жидкости. При этой концентрации через 20 часов культивирования активная кислотность уменьшалась относительно контроля на 75 %. С увеличением концентрации ОХ с 0,005 % до 0,01 % происходит увеличение рН культуральной жидкости и достигает значения близкого к контролю. Титруемая кислотность

культуральной жидкости уменьшалась с увеличением концентрации ОХ. С увеличением концентрации ОХ содержание мономеров глюкозамина, входящих в его состав, возрастало. В связи с этим, увеличивалось количество положительно заряженных групп, способных взаимодействовать с лактобактериями. Полученные результаты влияния ОХ на культивирование *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus manufacturing* свидетельствует о значительных изменениях процесса синтеза молочной кислоты.

Таблица

**Влияние различных концентраций олигохитозана с молекулярной массой 45,3 кДа на активную и титруемую кислотность, концентрацию молочной кислоты и скорость ее синтеза после 20 часов культивирования *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus manufacturing*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* при 45°C**

Параметры культивирования	Доза внесения олигохитозана, %				
	контроль	0,0025	0,005	0,0075	0,01
<i>L. delbrueckii subsp. Bulgaricus manufacturing</i>					
Активная кислотность, ед. рН	5,08	3,82	3,92	4,80	4,87
Титруемая кислотность, °Т	65	212	194	112	104
МК, моль/л	0,065	0,212	0,194	0,112	0,104
Средняя скорость накопления МК, 10 <sup>-3</sup> моль/л/час	3,25	10,6	9,7	5,6	5,2
<i>Lactobacillus Acidophilus</i>					
Активная кислотность, ед. рН	5,98	5,01	5,10	5,16	4,94
Титруемая кислотность, °Т	83	101	104	100	125
МК, моль/л	0,083	0,101	0,104	0,100	0,125
Средняя скорость накопления МК, 10 <sup>-3</sup> моль/л/час	4,15	5,05	5,2	5,0	6,25
<i>Lactobacillus plantarum</i>					
Активная кислотность, ед. рН	4,18	4,24	4,26	4,75	7,13
Титруемая кислотность, °Т	125	127,5	115	65	15
МК, моль/л	0,125	0,1275	0,115	0,065	0,015
Средняя скорость накопления МК, 10 <sup>-3</sup> моль/л/час	6,25	6,37	5,75	3,25	0,75

По окончании процесса культивирования количество молочнокислых микроорганизмов в контроле и опытных образцах было близким и составило  $9,0 \times 10^9$  КОЕ/см<sup>3</sup>. При культивировании в течение 20 часов *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus manufacturing* и содержании в среде мономеров глюкозамина  $1,39 \times 10^{-4}$  моль/л в ОХ (0,0025 %) происходило увеличение синтеза молочной кислоты в 2,7 раза. С увеличением концентрации мономеров глюкозамина до  $5,56 \times 10^{-4}$  моль/л в ОХ (0,01 %) биосинтез молочной кислоты замедлялся, но был выше контроля. При содержании в культуральной жидкости мономера глюкозамина ОХ  $1,39 \times 10^{-4}$  моль/л наблюдается существенное снижение рН, увеличение титруемой кислотности, рост содержания молочной кислоты и возрастание скорости ее синтеза. Это можно объяснить тем, что ОХ эффективно взаимодействует с плазматической мембраной бактерий, вызывая абиотический стресс. Она включает метаболические изменения, необходимые для выживания лактобактерий. С увеличением концентрации ОХ их избыток выступает в качестве пленкообразователя. Происходит электростатическое взаимодействие избытка положительно заряженных аминогрупп мономеров глюкозамина ОХ с отрицательно заряженными клеточными стенками лактобактерий, отрицательный заряд которым придают многочисленные остатки фосфорной кислоты, связанные с тейхоевой кислотой [9]. Это приводит к замедлению скорости биосинтеза молочной кислоты.

Таким образом, при культивировании *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus manufacturing*, использование ОХ в концентрации 0,0025 % стимулирует синтез молочной кислоты до концентраций, которые достигаются в промышленном производстве. В этих биотехнологиях, при получении молочной кислоты с использованием *L. delbrueckii*, за 48 часов культивирования, ее продукция составила 115 г/л, а удельный выход 0,2–0,4 г/л×ч. Использование ОХ с молекулярной массой 45,3 кДа позволяет ускорить этот процесс и может найти применение в промышленной биотехнологии ее получения.

Исследование зависимостей процесса культивирования *L. acidophilus* от концентраций ОХ на активную и титруемую кислотность, содержание молочной кислоты и скорость ее синтеза показали значительное отличие от *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus manufacturing*. Олигохитозан в исследованных концентрациях не оказывал существенного влияния на рН и титруемую кислотность в процессе культивирования *L. acidophilus* в сравнении с контролем. При этом количество молочнокислых микроорганизмов в контроле и опытных образцах было близким и составило  $1,1 \times 10^{10}$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Вместе с тем, ОХ взаимодействовал с клеточными стенками *L. acidophilus*, что проявилось в процессе длительного хранения полученного продукта. При его длительном хранении, в течение 17 суток в опытных образцах, с ОХ с увеличением его концентрации наблюдалось снижение активной и титруемой кислотности, средней скорости синтеза молочной кислоты, а также возрастание численности жизнеспособных клеток *L. acidophilus* [6]. Таким образом, ОХ проявляет пребиотические свойства, которые могут быть использованы при приготовлении кисломолочных продуктов с *L. acidophilus*, с длительным сроком хранения.

Как видно из таблицы, при культивировании *L. plantarum* в течение 20 часов в контроле наблюдалось уменьшение активной кислотности до 4,18. Возрастающие концентрации ОХ в среде культивирования ведут к увеличению значения рН, что может быть связано с замедлением процесса метаболизма лактозы. Полученные результаты согласуются с анализом титруемой кислотности культуральной жидкости. Возрастание концентраций ОХ ведет к уменьшению титруемой кислотности в сравнении с контролем, что свидетельствует об эффективном взаимодействии ОХ с молочнокислыми бактериями. Это связано с тем, что к 20



часу культивирования ОХ с увеличением концентрации снижает количество жизнеспособных *L. plantarum* в опытных образцах до  $1,5 \times 10^3$  КОЕ/см<sup>3</sup> в сравнении с контролем –  $8,5 \times 10^9$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

В результате проведенных исследований дана оценка эффективности процесса молочнокислого брожения *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus manufacturing*, *L. Acidophilus*, *L. plantarum*, в присутствии различных концентраций ОХ с молекулярной массой 45,3 кДа. Показано, что влияние различных концентраций ОХ на метаболизм лактозы и образование молочной кислоты зависит от вида исследованных лактобактерий. Внесение в культуральную среду *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus manufacturing* различные концентрации ОХ вызывают ускорение метаболизма лактозы, что приводит к уменьшению pH и увеличению титруемой кислотности. Этот процесс замедляется с увеличением концентрации ОХ. При культивировании *L. Acidophilus* добавление в культуру различных концентраций ОХ не вызывало существенных изменений pH и титруемой кислотности. Наличие в среде культивирования *L. plantarum* различных концентраций ОХ приводило к значительному замедлению метаболизма лактозы и накоплению молочной кислоты, а также снижению жизнеспособных клеток.

### Список литературы

1. P. Zou, X. Yang, J. Wang, Y. Li, H. Yu, Y. Zhang, G. Liu. Advances in characterization and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides // Food Chemistry. 2016. Vol. 190. P. 1174–1181.
2. T. Ristić, S. Lasić, I. Kosalec, M. Bračić, L. Fras-Zemljič. The effect of chitosan nanoparticles onto *Lactobacillus* cells// Reactive and Functional Polymers. 2015. Vol. 97. P. 56–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2015.10.007>.
3. H.-Woo Lee, Y.-S. Park, J.-S. Jung, W.-S. Shin. Chitosan oligosaccharides, dp 2–8, have prebiotic effect on the *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus sp.* // Anaerobe. 2002. P. 319–324. DOI: 10.1016/S1075-9964(03)00030-1.
4. M.I. Shramko, A.D. Lodygin, I.A. Evdokimov, N.V. Sushinskaya, V.P. Kurchenko. Influence of oligochitosans and highly molecular chitosan on *Lactobacillus Bulgaricus* cultivation // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2020. Vol. 548, # 082066. P. 1–13. DOI: 10.1088/1755-1315/548/8/082066.
5. V. Kurchenko, T. Halavach, M. Shramko, A. Lodygin, I. Evdokimov. Application of chitosan for fermented dairy products with *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus manufacturing* // Lecture Notes in Networks and Systems; Eds. V. Kurchenko et al. Springer Nature Switzerland AG, 2022. LNNS 408. P.167–175. DOI: [10.1007/978-3-030-96641-6\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-030-96641-6_20).
6. В.П. Курченко, Т.Н. Головач, С.М. Денищик, М.И. Шрамко, А.Д. Лодыгин, И.А. Евдокимов, Л.Р. Алиева, В.Е. Тихонов, Е.С. Симоненко, С.В. Симоненко. Зависимость свойств кисломолочного напитка с *Lactobacillus acidophilus* от молекулярных масс и концентраций хитозанов // Пищевая промышленность. 2022. № 11. С. 24–25.
7. S. Kulikov, V. Tikhonov, I. Blagodatskikh, E. Bezrodnykh, S. Lopatin, R. Khairullin, Y. Philippova, S. Abramchuk. Molecular weight and pH aspects of the efficacy of oligochitosan against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) // Carbohydrate Polymers. 2012. Vol. 87. P. 545–550.
8. J.N. De Vit. Lecturer's handbook on whey and whey products // Brussels: European Whey Products Association. 2001. 88 p.
9. R. Hatti-Kaul, L. Chen, T. Dishisha, H. El Enshasy. Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals // FEMS Microbiology Letters. 2018. 365. doi: 10.1093/femsle/fny213.

## Секция 4. ХИТОЗАНСОДЕРЖАЩИЕ ПРЕПАРАТЫ И МАТЕРИАЛЫ (ВСЕ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ, КРОМЕ БИОМЕДИЦИНСКИХ)

### ПЛЕНКИ НА ОСНОВЕ СУКЦИНАТА ХИТОЗАНА ДЛЯ ЗАЩИТЫ ПОВЕРХНОСТЕЙ КОНСТРУКЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ ОТ ВОЗДЕЙСТВИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Т.А. Алехова<sup>1</sup>, А.В. Александрова<sup>1</sup>, Н.А. Загустина<sup>2</sup>, В.А. Александрова<sup>3</sup>, А.А. Башаров<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991, Россия

<sup>2</sup> Институт биохимии им. А.Н. Баха Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, 119071, Россия

<sup>3</sup> Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, Москва, 119991, Россия

<sup>4</sup> Ракетно-космическая корпорация «Энергия» им. С.П. Королёва, Королёв, Московская обл., 141070, Россия

С начала первых полетов на орбитальных станциях «Мир», а затем и МКС проводился мониторинг микрофлоры на конструкционных материалах станции, который показал присутствие на поверхности разнообразной микрофлоры [1, 2]. В результате исследования и идентификации микрофлоры конструкционных поверхностей в течение более, чем 20 лет собрана коллекция микроорганизмов – обитателей конструкционных поверхностей РС МКС. В ходе мониторинга микрофлоры отбирались пробы, из которых в дальнейшем были выделены и идентифицированы штаммы бактерий, дрожжей, грибов, которые депонировали в коллекциях ВКМ и ВКПМ. Наиболее часто встречающиеся в пробах штаммы микроорганизмов бактерии и грибы были исследованы на способность повреждать конструкционные материалы – алюминий-магниевые сплавы АМг6 и 1570, это грибы – *Aspergillus niger*, *A. sydowii*, *A. versicolor*, *A. flavus*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. spinulosum*, *P. chrisogenum* и *Rhodotorula* sp. и *Ulocladium botrytis*. Они составляют "ядро" микробиоты станции, относятся к группе технофилов, способны образовывать органические кислоты. Кроме того, представители рода *Aspergillus* и многие виды из рода *Penicillium* являются токсинообразователями и условными патогенами, их споры могут быть причиной аллергических заболеваний. Среди бактерий преобладают различные виды рода *Bacillus*.

Для оценки их способности повреждать поверхность алюминий-магниевых сплавов в лабораторных условиях проводили ускоренные испытания по обрастанию образцов сплавов при повышенной влажности (90 %) и температуре (по ГОСТ 9.048–89 и ГОСТ 9.049–91) в присутствии источников углерода в течение трех месяцев. Для эксперимента отбирали наиболее часто встречающиеся во взятых образцах микроорганизмы, которые по данным литературы являются наиболее активными деструкторами. Смоделированные условия повышенной температуры и влажности позволили показать способность выделенных штаммов вызывать обрастание образцов алюминий-магниевых сплавов (рис. 1), результатом чего явилось повреждение их поверхности.

Через месяц и три месяца после окончания эксперимента по экспонированию образцов, проводили их исследование различными методами электронной микроскопии. Исследования показали возможность образования на поверхности металла глубоких каверн до 250–300 мкм при повышенной влажности и температуре при обрастании образцов. Повреждение образцов сплава АМг6 могло иметь глубину около 250 мкм. Оценку степени биокоррозионного поражения образцов алюминиевых сплавов АМг6 и 1570С при исследовании возникших дефектов поверхности проводили с использованием универсального исследовательского стереомикроскопа OLYMPUS SZX10, методом сканирующей лазерной микроскопии.

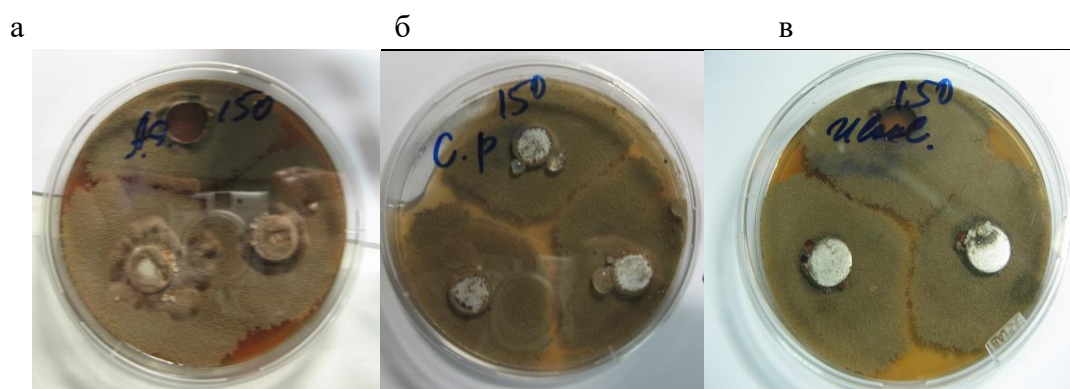


Рис. 1. Обрастание образцов алюминий-магниевого сплава в экстремальных условиях в течение месяца (а – *A. sydowii*, б – *Chaetomium sp.*, в – *Ulocladium botrytis*) [3]

Таким образом, было показано, что среди наиболее часто встречающихся в пробах с РС МКС грибов, наиболее активные в условиях ускоренных испытаний могли вызывать обрастание и различные виды коррозионных повреждений: образование питтингов и проявление межкристаллитной коррозии.

В дальнейшем были испытаны различные материалы с целью подавить рост микроорганизмов или ограничить его и локализовать при заражении поверхности бактериями, спорами грибов, клетками дрожжей, предотвращая обрастание и последующее воздействие на окружающую среду. Такие материалы-дезинфектанты должны обладать способностью останавливать рост микроорганизмов и при этом не должны оказывать негативного воздействия на окружающую среду и человека.

Среди химических соединений, обладающих бактерицидной, спорацидной, фунгицидной и вирулицидной активностью, по-видимому, наиболее безопасным и активными являются наночастицы серебра, широко изучаемые в настоящее время. Наночастицы серебра являются относительно новым классом материала с существенными, по сравнению с макрочастицами, различиями в физико-химических характеристиках, оптических, электромагнитных и каталитических свойствах. Физические свойства наночастиц серебра отличаются от свойств ионного серебра. Для непосредственного нанесения на поверхность оптимальным решением может быть нанесение наночастиц серебра в составе пленочного материала. Такие пленки могут быть получены при их формировании с включением в состав наночастиц серебра. Для подбора использовали пленки на основе природных полимеров, абсолютно безвредных для человека, используемые в пищевой промышленности, косметологии и медицине.

Для получения и испытания таких безопасных покрытий, формировали пленки из таких материалов, как сукцинат хитозана («Биопрогресс»), поливиниловый спирт (ПВС),

карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ). При формировании в структуру пленок включали в качестве дезинфицирующего агента НЧ серебра. Из полученных растворов пленки получали методом полива. Использовали также в качестве подложки для нанесения вязкого раствора полимера с НЧ серебра и последующего высушивания полимерные пленки, допущенные к использованию на МКС из фторопласта. При проведении испытаний высушенные пленки с различными концентрациями наночастиц наносили на поверхность агаризованной среды, которая предварительно была засеяна спорами культур грибов, суспензией клеток дрожжей и бактерий, выделенных с поверхности конструкционных материалов на РС МКС. На рис. 2 видно отсутствие роста под пленками с НЧ серебра и даже зоны отсутствия роста вокруг на разных культурах и контрольные пленки, заросшие испытываемыми культурами микроорганизмов: *Bacillus subtilis* (а), *Penicillium chrysogenum* (б) и *Rhodotorula* sp. (в).

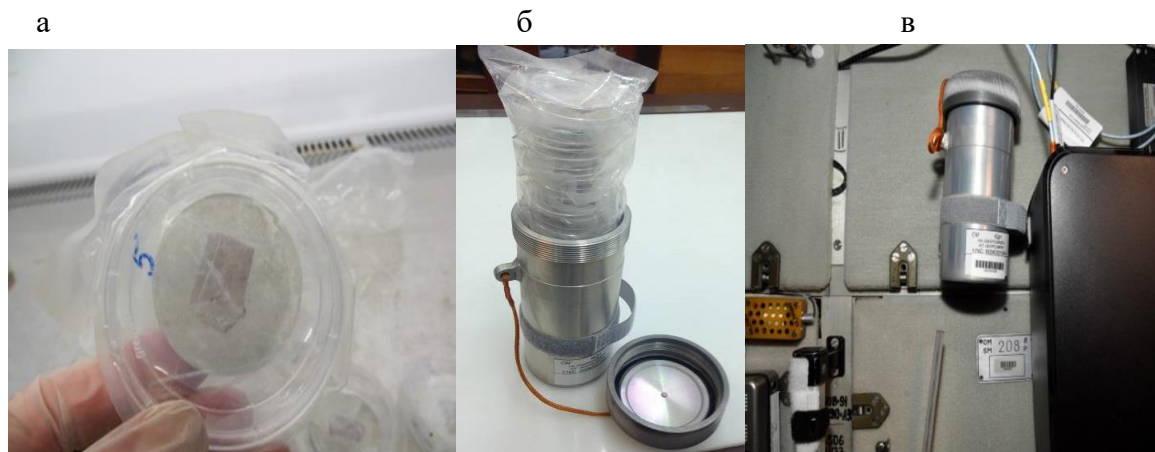


Рис. 2. Чашки Петри, засеянные бактериями *Bacillus subtilis* (а), грибами *Penicillium chrysogenum* (б) и дрожжами *Rhodotorula* sp.(в) с нанесенными на газоны пленками из хитозана: а – видна полностью заросшая бактериями контрольная пленка без НЧ серебра; б – пленки на поверхности с выросшим мицелием грибов; в – пленки с НЧ серебра на поверхности чашки Петри, засеянной дрожжами

Результаты, полученные в лабораторных условиях, позволили провести эксперимент на станции с дублированием в наземных условиях. При подготовке эксперимента суспензии спор грибов и бактерий наносили непосредственно на поверхность модельных образцов алюминий-магниевого сплава АМг6 (рис. 3 а). Смоделированное на поверхности сплава таким образом загрязнение суспензией клеток микроорганизмов (споры грибов, бактерии, дрожжи) покрывалось полученными пленками их хитозана. Образец размещали в чашке Петри, запаивали во фторопластовую пленку. 11 таких упаковок формировали следующую упаковку, также запаивая во фторопластовый пакет. Пакет с 11 герметизированными образцами помещали в контейнер, который в дальнейшем доставлялся на РС МКС для экспонирования рис. 3 б и в.

После 2–4 месяцев полетного эксперимента, контейнер доставлялся на Землю. В наземных условиях при постоянной температуре экспонировали 2 заполненных таким же образом контрольных контейнера. Нанесенные на образцы АМг6 клетки смывали несколько раз, полученные суспензии объединяли и рассеивали на чашки Петри на различные среды для оценки жизнеспособности клеток под пленками. Показано, что пленки, сформированные на основе сукцината хитозана и других испытанных полимеров с НЧ серебра при его концентрации 100 ppm оказывали фунгицидное действие в отношении испытанных дрожжей и грибов (*Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* и др.), а также бактериостатическое в отношении испытанных бактерий различных видов рода *Bacillus*.

Было выполнено несколько экспериментов, в ходе которых были испытаны пленки с различными концентрациями НЧ серебра, полученного различными методами. Исследована их способность подавлять рост и размножение различных микроорганизмов, которые были выделены с конструкционных поверхностей РС МКС. Для локализации размножения микрофлоры и изоляции ее от атмосферы герметизированных объектов было испытано использование пленок с биоцидными свойствами, которые формировались с включением наночастиц серебра. В качестве пленкообразующих материалов использовали биополимеры, применяемые в пищевой промышленности и не обладающие какой-либо токсичностью (карбоксиметилцеллюлоза и сульфат хитозана) и поливиниловый спирт.



*Рис. 3.* Образец алюминий-магниевого сплава в чашке Петри с нанесенными клетками микроорганизмов закрытые пленкой с НЧ серебра (а); для создания барьера с атмосферой в процессе проведения космического эксперимента чашка запаяна во фторопластовый конверт и уложена в контейнер для эксперимента с 11 чашками с образцами (б); в – контейнер в условиях экспонирования на борту РС МКС

Таким образом в результате проведенных работ было показано, что безопасные органические полимеры, которые способны формировать пленки с НЧ серебра способны подавлять размножение различных видов микроорганизмов. НЧ серебра полностью безопасны для применения в составе различных пленок. Кроме того, полученные вязкие композиты с НЧ серебра могут быть нанесены на более прочные пленки и использоваться для тех же целей. Испытания в течение длительного времени (6 месяцев) показали возможность полного подавления размножения грибов и дрожжей и незначительное сохранение жизнеспособности клеток бактерий, которые были выделены из образцов собранных с конструкционных материалов на РС МКС.

### Список литературы

1. Алехова Т.А., Александрова А.В., Новожилова Т.Ю. и др. Мониторинг микроорганизмов-деструкторов на пилотируемых орбитальных комплексах // Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Т. 41, № 4. С. 435–443.
2. Алехова Т.А., Александрова А.В., Загустина Н.А., и др. Микроскопические грибы на Российском сегменте международной космической станции // Микология и фитопатология. 2009. Т. 43, Вып. 5. С. 9–19.

3. Алехова Т.А., Александрова А.В., Новожилова Т.Ю. и др. Применение атомно-силовой микроскопии для мониторинга микробиологической коррозии алюминий-магниевых сплавов // Поверхность. 2005. № 1. С. 54–59.
4. Алехова Т.А., Шкловер В.Я., Загустина Н.А. и др. Электронно-микроскопические исследования повреждений поверхности алюминиевого сплава АМг6, вызванных выделенными на космических станциях микроорганизмами // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2010. № 9. С.49–55.
5. Плотников А.Д., Корнеева Е.Ю., Алехова Т.А., Загустина Н.А. Исследование влияния биокоррозионных поражений на механические характеристики образцов из алюминиевых сплавов АМГ6 И 1570С применительно к условиям эксплуатации российского сегмента МКС. Космическая техника и технологии. 2017. № 4 (19). С. 35–44.

## **ВЛИЯНИЕ НАНОПРЕПАРАТОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ПРИ РОСТЕ И РАЗВИТИЯ ХЛОПЧАТНИКА**

**Д.К. Рашидова<sup>1</sup>, Ш.Б. Амантурдиев<sup>1</sup>, С.Ш. Рашидова<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт селекции, семеноводства и агротехнологии выращивания хлопка, ул. Университетская, дом 1, Ташкент, 111218, Узбекистан

<sup>2</sup> Институт химии и физики полимеров АН Республики Узбекистан., ул. А. Кодирий, дом 7б, Ташкент, Узбекистан

E-mail: [etoile111@yandex.ru](mailto:etoile111@yandex.ru)

**Аннотация.** В статье приводятся результаты анализов лабораторной всхожести семян и активности ферментов в проростках хлопчатника сорта Ан-Баяут-2, семена которых обработаны нанополимерными препаратами. Наночастицы хитозана индуцировали всхожесть семян и активность ферментов – пероксидазы и полифенолоксидазы, а также увеличивали общее содержание белка в прорастающих семенах. Повышенная активность ферментов подтверждается снижением содержания белка в прорастающих семенах. Биохимические и физиологические исследования показывают, что наночастицы хитозана усиливают рост проростков хлопчатника и устойчивость к патогенам за счет более высокой активности пероксидазы.

**Ключевые слова:** семена, сорт, проросток, всхожесть, фермент, белок, активность, хитозан, нанополимерный препарат, хлопчатник.

### **Введение**

Изучение реакции растения на воздействие элиситоров - одно из наиболее динамично развивающихся направлений физиологии растений. Элиситоры, имитируя контакт растения с фитопатогенном, инициируют включение защитных механизмов, препятствующих проникновению фитопатогенных грибов, бактерий и вирусов. Одним из наиболее изученных элиситоров является хитозан, который регулирует экспрессию защитных генов, индуцируя синтез *PR*-белков.

Препараты на основе хитина обычно характеризуются как индукторы устойчивости растений, запускающие различные защитные реакции растений от фитопатогенных

микроорганизмов. Эти реакции характеризуются повышением активности ряда защитных ферментов и белков, таких как пероксидазы, полифенолоксидазы, фенилаланинаммоний-лиаза, являющихся важнейшими компонентами природной защиты растительной клетки, способствующими индуцированную устойчивость к фитопатогенам.

Одним из ферментов, первым отвечающим на появление элиситоров, является пероксидаза. Этот фермент можно считать антителом подобным белком, реагирующим на стрессовые ситуации повышением активности и изменением количества молекулярных форм. Поэтому пероксидазу рассматривают как одну из важнейших каталитических систем среди биохимических факторов защиты растений от патогенных микроорганизмов.

Полифенолоксидаза участвует в процессе окисления полифенолов в хиноны, которые обладают антимикробной активностью, и лигнификации клеточных стенок во время микробной инвазии. Ряд работ показывают, что полифенолоксидаза принимает участие в защитных реакциях и реакциях гиперчувствительности, которые индуцируют системную устойчивость растений к воздействию грибов.

Показан высокий стимулирующий эффект на всхожесть и рост проростков сои по сравнению с контролем, среди которых наноразмерные Со- и Мо-содержащие составы показали самые высокие индексы роста. Ферментативный анализ побегов из нанообработанной сои также продемонстрировал сходную особенность. Все исследованные составы проявляли более высокую активность амилазы и липазы по сравнению с контрольной [7].

Наночастицы металлов электронейтральны, что позволяет им равномерно распределяться в пленкообразователе и тонким слоем обволакивать семена, обеспечивая их надежную защиту от патогенов. Постепенно окисляясь в почве, они создают неблагоприятные условия для патогенных микроорганизмов и в то же время поглощаются растениями как микроэлементы в процессе роста [4, 5].

Полимерметаллокомплексы хитозана с ионами кобальта и меди представляют собой водорастворимые природные биополимеры, обладающие активным ростостимулирующим и противогрибковым свойствами [3, 9].

Лабораторную и полевую всхожесть повышают нанопорошки и наночастицы металлов, которые достаточно легко проникают в клетки семян, подготовленных к посеву и, активно влияют на ферментативную систему физиолого-биохимических реакций [6, 8, 9].

Целью исследования является выявление значения действия биологически активных нанополимерных комплексов на основе хитозана и его производных на ферментативную реакцию.

### **Материалы и методы**

Объектом исследований служили семена хлопчатника Ан-Баяут-2, обработанных исследуемыми полимерными и нанополимерными препаратами на основе хитозана и его производных ПМКCu<sup>2+</sup>:Ag 7:3, ПМКCu<sup>2+</sup>:Ag 8:2, Хитозан исходный 0,5%, НаноХЗ 0,5% (90 кда), Аскорбатхитазан, НаноАХЗ 0,5% (4:1), а также эталонами УЗХИТАН и Далброн. Предметом исследования является оценка эффективности обработки семян изучаемыми полимерными нанопрепаратами, их влияние на активность ферментов хлопчатника. Активность ферментов определяли по методике «Практикум по биохимии растений» [2], статистическую обработку результатов полученных в процессе исследований проводили по Б. А. Доспехову [1].

## Результаты исследований

Одной из актуальных задач в исследованиях является изучение влияния нанопрепаратов на морфофизиологические показатели и посевные качества семян сельскохозяйственных культур, их поведение при взаимодействии с биологическими материалами влияние на метаболические процессы в растениях. В получении высоких и гарантированных урожаев хлопко-сырца важное место отводится использованию перспективных технологий подготовки посевных семян, которые предусматривают применение широкого ассортимента экологических чистых средств защиты растений.

Влияние нанополимерных препаратов на лабораторную всхожесть семян хлопчатника изучена в лаборатории биохимии и физиологии растений НИИССАВХ в течение трех лет. Лабораторную всхожесть семян сорта хлопчатника Ан-Баяут-2 обработанные нанополимерными препаратами была изучена в термостате при 25 °С на 4 и 12 сутки.

Из таблицы 1 видно, что наилучшие показатели по всхожести семян сорта Ан-Баяут-2 R<sub>1</sub> имели семена обработанные нанопрепаратами ПМКCu<sup>2+</sup>: Ag 8:2, НаноАХЗ 0,5 % (4:1) – 98,5 %, ПМКCu<sup>2+</sup>: Ag 7:3 – 98 %, что выше контроля на 3,75–4,25 % и выше эталона (Далброн) на 4,0–3,5 %.

*Таблица 1*

### Определение лабораторной всхожести семян хлопчатника сорта Ан-Баяут-2 (R<sub>1</sub>) обработанные нанопрепаратами за 2018–2020 гг.

№	Варианты	на 4 сутки	на 12 сутки	± к контролю
1	Контроль	94,0±0,3	94,25±0,3	0
2	Далброн (эталон)	94,25±0,4	94,5±0,2	+0,25
3	УЗХИТАН (эталон)	94,75±0,6	96,25±0,4	+2,0
4	Хитозан исх. 0,5%	94,75±0,2	95,5±0,2	+1,25
5	НаноХЗ 0,5%(90 кда)	94,75±0,4	95,25±0,3	+1,0
6	ПМК Cu <sup>2+</sup> : Ag 7:3	94,5±0,2	98,0±0,1	+3,75
7	ПМК Cu <sup>2+</sup> : Ag 8:2	95,25±0,3	98,5±0,2	+4,25
8	Аскорбатхитозан	92,0±0,2	93,5±0,3	-0,75
9	НаноАХЗ 0,5% (4:1)	95,0±0,1	98,5±0,2	+4,25
		НСР <sub>05</sub> =2,26%		

Ферменты широко распространены в животных и растительных клетках, участвуют в фотосинтезе, энергетическом обмене, в трансформации пероксидов и веществ, чужеродных организму. Нами в лабораторных условиях определена активность некоторых ферментов на 25-дневных семидольных проростках семян хлопчатника. В соответствии с рисунком наименьшей активностью пероксидазы обладали 25-дневные проростки хлопчатника сорта Ан-Баяут-2, семена которых, были обработаны УЗХИТАНом, у которых значение активности составляло 17,27 ед/мг белка, у необработанных проростков (контроль) - 19,68 ед/мг белка. Проростки семян, обработанные другими препаратами, обладали большей активностью фермента пероксидазы. Наиболее высокая активность данного фермента - 45,7 ед/мг белка была выявлена у проростков, семена которых были обработаны ПМКCu<sup>2+</sup>:Ag7:3, что превышало значение активности в контроле – в 2,3 раза, аскорбатхитозана и нанохитозана в 1,9 раза.



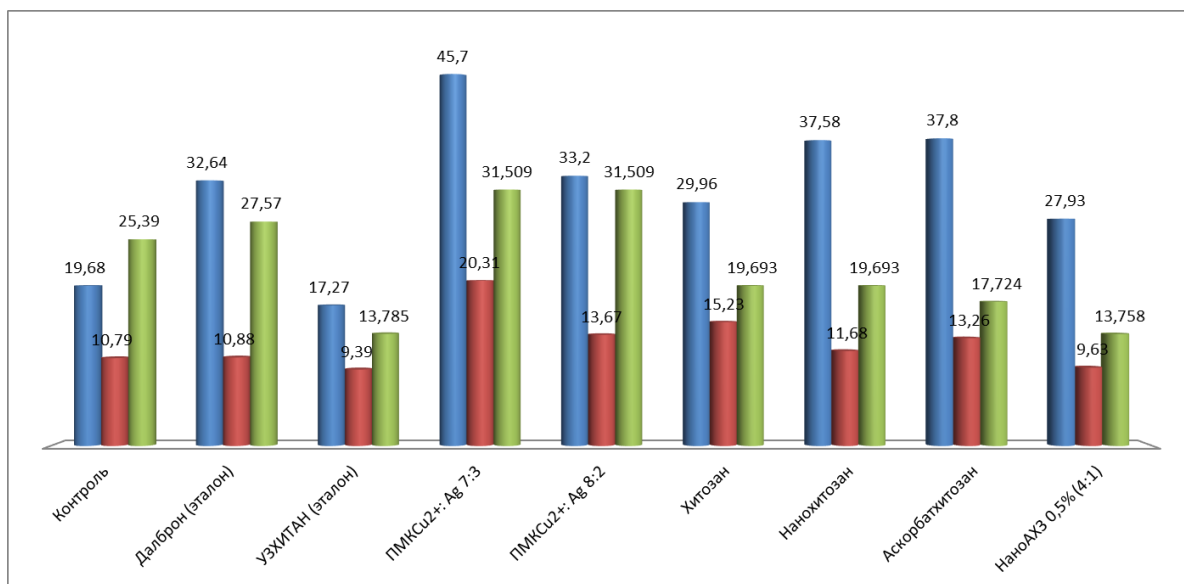


Рис. Активность ферментов пероксидазы и полифенолоксидазы в 25-дневных проростках хлопчатника сорта АН-Баяут-2, 2018-2020 гг. (усредненные данные)

Наименьшее значение активности полифенолоксидазы – 9,39 ед/мг белка показали проростки хлопчатника из семян обработанных УЗХИТАНОм у которого значение активности фермента почти в 2,2 раза было ниже чем в проростках с обработкой семян ПМКCu<sup>2+</sup>:Ag 7:3 (20,31 ед/мг белка).

В проростках хлопчатника, у которых семена были обработаны другими препаратами, значения активности фермента полифенолоксидазы были в 0,2–1,62 раза выше значений в контроле.

### Выводы

Установлено, что наиболее высокая активность пероксидазы была в 25 дневных проростках семян хлопчатника обработанных ПМКCu<sup>2+</sup>:Ag 7:3 – 45,7 ед/мг белка, что выше контроля на 26,02, аскорбатхитозаном на 18,12 ед/мг белка и нанохитозаном на 17,9 ед/мг белка, наименьшую активность пероксидазы показали проростки от семян хлопчатника, обработанных УЗХИТАНОм 17,27 ед/мг белка и необработанные (контроль) 19,68 ед/мг белка. Исследования изменения активности фермента пероксидазы показали, что ПМКCu<sup>2+</sup>:Ag7:3 и аскорбатхитозан могут стимулировать защитные реакции растительной ткани и стимулировать процессы фото дыхания, за счет включения ионов Cu<sup>2+</sup> в реакции транспорта электронов в дыхательной цепи и участвовать в накоплении метаболитов для роста и развития растений;

По активности полифенолоксидазы наименьшую активность 9,39 ед/мг белка показали проростки семян хлопчатника, обработанные эталоном УЗХИТАН, активность фермента была почти в 2,2 раза ниже по сравнению с проростками от семян, обработанных ПМКCu<sup>2+</sup>: Ag 7:3, а в проростках от семян, обработанных другими препаратами активность фермента были в 0,2–1,62 раза выше от значений в контроле. В проведенных исследованиях повышение или понижение активности полифенолоксидазы при действии различных препаратов может свидетельствовать о стимулировании или ингибировании процессов, связанных с реакциями образования лигнина, как защитный фактор при биотических и абиотических воздействиях среды.

## Список литературы

1. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – М., 1985. 347 с.
2. Ермаков А. Методы биохимического анализа, «Практикум по биохимии растений» – М., 1971. 47 с.
3. Свойства растворов смесей хитозана с наночастицами кобальта и композитных пленок на их основе / А.М. Бочек, Н.Р. Вохинова, Н.Н. Сапрыкина, Н.Ш. Ашуров, С.М. Югай, С.Ш. Рашидова // Высокомолекулярные соединения, Серия А. 2015. Т. 57, № 4. С. 354–360.
4. Влияние физико-химических характеристик модифицированных поверхностей наноразмерных частиц меди на ингибирование роста культуры клеток и электростатические свойства поверхности бактерий / Л.А. Володина, А.Н. Жигач, И.О. Лейпунский, Е.С. Зотова, Н.Н. Глушченко // Биофизика. 2013. № 58(3). С. 507–515.
5. Глушченко Н.Н., Богословская О.А., Ольховская И.П. Сравнительная токсичность солей и наночастиц металлов и особенность их биологического действия // Материалы Международной научно-практической конференции «Нанотехнологии и информационные технологии – технологии XXI века». М., 2006. С. 93–95.
6. Павлов Г.В., Фолманис Г.Э. Биологическая активность ультрадисперсных порошков // Исследовательский центр проблем качества подготовки специалистов. М., 1999. С. 77.
7. Nguyen Hoai Chau, Quang Ha Doan, Thi Hao Chu, Thi Thuy Nguyen, Hien Dao Trong, Quoc Buu Ngo. Effects of different nanoscale microelement-containing formulations for presowing seed treatment on growth of soybean seedlings // Hindawi Journal of Chemistry. 2019. Vol. 8. # 8060316.
8. Evaluation of nanoparticles for promoting seed germination and growth rate in MR263 and R269 paddy seeds / N.A.M. Said, R.A. Rahman, M.R. Rani, M. Ghazali // Journal of Tropical Agriculture and Food Science. 2017. Vol. 45, N 1. P. 13–24.
9. Synthesis and some physical and chemical properties of metal complexes of the *Bombyx mori* chitosan / N.R. Vokhidova, K.K. Pirniyazov, M.Yu. Yunusov, R.Yu. Milusheva, S.Sh. Rashidova // Proc. 13<sup>th</sup> School–Conference for Young Scientists “Current Topics in Organic Chemistry”, Novosibirsk, September 12–19, 2010. P. 94.

## НОВЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОБЪЕКТОВ КУЛЬТУРНОГО НАСЛЕДИЯ В ГОСУДАРСТВЕННОЙ ТРЕТЬЯКОВСКОЙ ГАЛЕРЕЕ

А.А. Жгун<sup>1</sup>, Д.А. Авданина<sup>1</sup>, А.А. Ермолюк<sup>1</sup>, К.В. Шумихин<sup>2</sup>, Г.К. Нураева<sup>1</sup>,  
Ю.В. Жуйкова<sup>1</sup>, Е.В. Троян<sup>2</sup>, М.Г. Степанов<sup>2</sup>, Б.Ц. Шагдарова<sup>1</sup>, А.В. Ильина<sup>1</sup>,  
А.Ш. Хайрова<sup>1</sup>, С.А. Лопатин<sup>1</sup>, М.В. Шитов<sup>2</sup>, В.П. Варламов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, Ленинский проспект, дом 33, стр. 2, Москва, 119071, Россия

<sup>2</sup> Государственная Третьяковская галерея, Лаврушинский переулок, дом 10,

Москва, 119017, Россия

E-mail: zzhgun@mail.ru

Человечество на протяжении многих веков предпринимает попытки для сохранения объектов культурного наследия, разрушающихся под воздействием как абиотических, так и

биотических факторов, среди которых важнейшую роль играют микроорганизмы. Это обусловлено тем, что многие органические материалы, из которых состоят объекты культурного наследия, в том числе произведения живописи, являются подходящей питательной средой для роста различных типов микроорганизмов и их консорциумов [1]. В условиях музейного хранения соблюдаются регламентированные условия консервации экспонатов, в частности, необходимый температурно-влажностный режим, подавляющий рост микроорганизмов. Государственная Третьяковская галерея (Лаврушинский переулок 10, Москва) является одним из ведущих музеев мира, где четко соблюдается необходимый для произведений живописи режим (19°C, 55 % влажность). Однако даже в ведущих музеях мира при четком соблюдении условий консервации случаются внештатные отклонения, выражающиеся в локальном микробиологическом поражении объектов культурного наследия [2]. Для борьбы с биодеструкцией одним из наиболее эффективных методов является плановая или экстренная обработка антисептиками [3]. Однако в последнее время число антисептиков, применяемых для защиты произведений живописи, значительно сократилось. Это связано с тем, что многие вещества, эффективно используемые как антисептики в других случаях, способны взаимодействовать с живописными материалами и повреждать их. Кроме того некоторые эффективные антисептики были изъяты из реставрационной практики, поскольку оказались токсичными для реставраторов и посетителей [4,5]. В связи с этим актуальной задачей видится разработка антисептиков нового поколения, эффективных против микроорганизмов-деструкторов в составе живописных материалов, инертных по отношению к самим материалам и нетоксичных для человека.

Хитозан – природный биополимер, широко применяемый в различных сферах жизнедеятельности человека [6]. Одна из областей применения связана с его антимикробной активностью. Многочисленные исследования продемонстрировали активность хитозана как против бактерий [7], так и против грибов [8]. Также было показано, что различные модификации могут усиливать биоцидную активность хитозана [9,10]. Однако до начала 2020-х не изучали возможность использовать хитозан как антисептик для защиты объектов культурного наследия (в том числе, произведений живописи) от биодеградациии. Недавно показали эффективность применения наночастиц на основе хитозана в качестве носителя тимола для защиты объекта культурного наследия (известняк Фэй-лайфэн, Ханчжоу, Китай) от *Aspergillus niger* [11]. В 2020 г. мы предприняли первую попытку изучить возможность использования хитозана для защиты произведений живописи от биопоражения [12]. Для этого определили активность низкомолекулярного хитозана против 10-ти плесневых грибов-деструкторов темперных материалов, выделенных с экспонатов XV–XVI вв. (i) «Церковь Воинствующая», 1550-е гг.; ii) фрагмента бюста статуи «Святой Великомученик Георгий Победоносец», 1464 г., известняк, темпера; iii) иконы «Святой Великомученик Димитрий Солунский», датируется 16-ым веком) в залах древнерусской живописи Государственной Третьяковской галереи (Лаврушинский переулок, д. 10, Москва) [12, 13]. Исследования провели на агаризованной питательной среде Чапека-Докса (CDA) для хитозанов, полученных из камчатского краба (*Paralithodes camtschaticus*), с молекулярной массой (ММ) 6, 12, 18, 25 и 45 кДа [12]. Оказалось, что хитозаны с ММ 25 и 45 кДа наиболее эффективно ингибируют рост изученных тест-культур. Однако многие вещества могут изменять свои химические и/или физические свойства при добавлении в состав материалов [14], поэтому важно показать, что соединение эффективно работает в составе живописных материалов и при этом не меняет их спектральных и поверхностных свойств. Кроме того, известно, что хитозаны, выделенные из

альтернативных источников сырья, например из мухи Чёрная львинка (*Hermetia illucens*), могут обладать отличными антимикробными средствами, что потенциально может расширить палитру таргетированных антисептиков [15].

В связи с этим целями нашей работы явилось: 1) исследование биозащитной активности хитозанов из *P. camtschaticus* в составе макетов на основе осетрового клея, характеристика спектральных и поверхностных свойств макетов; 2) оценка перспективы использования хитозана из *H. Illucens* для защиты произведений живописи в Третьяковской галерее.

Для получения макетов на основе осетрового клея (широко применяемого в темперной живописи в качестве адгезивного материала) использовали добавки хитозанов с ММ 25 и 45 кДа. Также сделали макеты с добавлением традиционных для живописи антисептиков, Катамина АБ и пентахлорфенолята натрия (ПХФН), и без добавок (контроль) [16]. На предварительном этапе для подбора концентраций хитозанов, необходимых для приготовления макетов, определили метаболическую активность десяти тест-культур. Пять видов грибов были из семейства *Aspergillaceae* (*Aspergillus versicolor* STG-25G, *A. creber* STG-57, *A. versicolor* STG-86, *A. sp.* STG-93W, *A. amoenus* STG-106), два вида – из семейства *Cladosporiaceae* (*Cladosporium halotolerans* STG-52B, *C. parahalotolerans* STG-93B) и по одному представителю было из семейств *Pleosporaceae* (*Ulocladium chartarum* STG-36), *Cordycipitaceae* (*Simplicium lamellicola* STG-96) и *Microascaceae* (*Microascus paisii* STG-103). После изготовления макетов их спектральные свойства определили с помощью ИК спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR). Спектральный анализ также провели для отдельных материалов (осетрового клея и хитозанов с ММ 25 и 45 кДа). Показали, что при используемой концентрации (1 %) добавляемые материалы (низкомолекулярные хитозаны и стандартные антисептики) не вносили вклада в результирующий спектр при рабочей концентрации. Также методом атомно-силовой микроскопии показали, что добавление изучаемых соединений не оказывает существенного влияния на поверхность созданных моделей. На заключительном этапе провели инокуляцию аликвотами текст-культур плесневых грибов на поверхность макетов (на основе хитозанов, стандартных антисептиков и без добавок – контроль). Изучили динамику ингибирования радиального грибного роста на поверхности опытных макетов по сравнению с контролем в течение 6 недель. Оказалось, что добавление хитозанов с ММ 25 и 45 кДа в целом эффективнее, на 25–50 %, подавляет рост изученных тест-культур по сравнению со стандартными антисептиками (рис. 1). Настоящее исследование впервые показывает, что низкомолекулярный хитозан может проявлять эффективные противогрибковые свойства в составе живописного материала, осетрового клея. Используемые концентрации (1 %), эффективные против плесневых грибов, не оказывают существенного влияния на спектральные и поверхностные свойства осетрового клея. Этот результат важен, потому что клеи животного происхождения, используемые в живописи для склеивания холста и лакокрасочного материала, крайне восприимчивы к биологическому воздействию.

С целью расширения спектра потенциальных хитозановых антисептиков для защиты произведений живописи также охарактеризовали антигрибковые свойства хитозана из альтернативного источника сырья, личинок насекомого *H. Illucens*. Этот материал интересен для изучения, поскольку в недавней работе продемонстрировал более высокую активность против микроорганизмов, чем хитозан, выделенный из краба *P. camtschaticus*, традиционного источника сырья для получения хитозана [15]. Несмотря на сходную каноническую полисахаридную структуру, хитозаны, выделяемые из различных природных объектов, могут

иметь отличия в ИК-спектрах. Это обусловлено ассоциациями с различными белковыми и другими компонентами, что может приводить к различным модификациям. В нашей работе показали характерные отличия во FTIR-спектрах между хитозанами, полученными из *P. camtschaticus* и *H. Illucens*. Для более детального сравнения их антигрибковых свойств мы расширили панель тест-культур до 12 доминантных грибов-деструкторов живописных материалов, изолированных в Третьяковской галерее (в частности, добавили зигомицеты). Противогрибковую активность хитозанов с ММ 33, 36, 39, 53 и 88 кДа из *H. illucens* изучили в сравнении с наиболее активными хитозанами из *P. camtschaticus* (с ММ 25 и 45 кДа) на питательной среде СДА. Оказалось, что активность хитозанов из *H. illucens* снижается в ряду от 33 до 88 кДа. Причем наибольшая активность соответствует хитозану с ММ 33 кДа (и находится на уровне контрольных крабовых хитозанов), а наименьшая активность соответствует хитозану с ММ 88 кДа. В целом крабовые хитозаны были более активны (чем хитозаны из *H. Illucens*) против аспергилл, а хитозаны из *H. Illucens* были более активны (чем хитозаны из *P. camtschaticus*) – против зигомицетов.

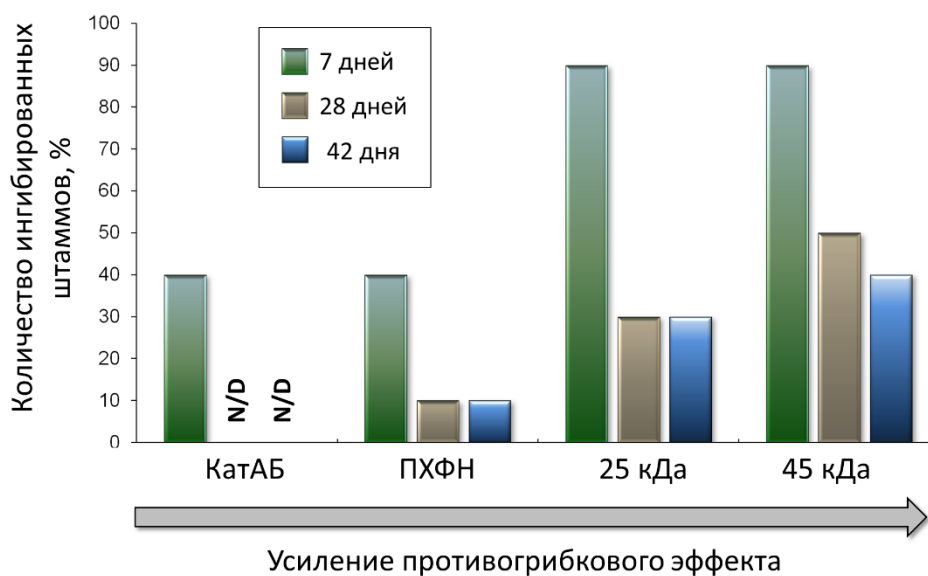


Рис. 1. Количество (%) полностью ингибированных тест-культур на 7, 28 и 42 сутки после инокуляции [16]

Наши эксперименты показали, что хитозан, полученный из *H. illucens*, как и крабовый хитозан, может служить перспективным материалом для защиты произведений живописи. Перекрестная активность этих соединений может позволить создать палитру хитозановых антисептиков, таргетированных против различных групп биодеструкторов. Данные, полученные в нашей работе, открывают возможность для дальнейших разработок в области изучения хитозана для защиты объектов культурного наследия от биодegradации.

### Список литературы

1. Obidi O.F. et al. Microbial evaluation and deterioration of paints and paint-products. // J. Environ. Biol. 2009. Vol. 30, N 5 Suppl. P. 835–840.
2. Micheluz A. et al. The extreme environment of a library: Xerophilic fungi inhabiting indoor niches // Int. Biodeterior. Biodegradation. Elsevier. 2015. Vol. 99. P. 1–7.

3. Unger A., Schniewind A.P., Unger W. Conservation of Wood Artifacts. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 2001. 578 p.
4. Ciferri O. Microbial degradation of paintings // *Appl. Environ. Microbiol.* American Society for Microbiology (ASM). 1999. Vol. 65, N 3. P. 879–885.
5. Gordon D. How dangerous is pentachlorophenol? // *Med. J Aust.* 1956. Vol. 43, N 13. P. 485–488.
6. Jiménez-Gómez C.P. et al. Chitosan: A Natural Biopolymer with a Wide and Varied Range of Applications // *Mol.* 2020, Vol. 25, # 3981. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. 2020. Vol. 25, N 17. # 3981.
7. Wang Y. et al. A Myb transcription factor represses conidiation and cephalosporin C production in *Acremonium chrysogenum* // *Fungal Genet. Biol.* 2018. Vol. 118. P. 1–9.
8. Shih P.Y. et al. A potential antifungal effect of chitosan against *Candida albicans* mediated via the inhibition of SAGA complex component expression and the subsequent alteration of cell surface integrity // *Front. Microbiol.* Frontiers Media S.A.. 2019. Vol. 10, N 3. # 602.
9. Alorbu C., Cai L. Fungal resistance and leachability of genipin-crosslinked chitosan treated wood // *Int. Biodeterior. Biodegradation.* Elsevier. 2022. Vol. 169. # 105378.
10. Ing L.Y. et al. Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles and Correlation with Their Physical Properties // *Int. J. Biomater.* Hindawi Limited. 2012. Vol. 2012.
11. Wang X. et al. The application of thymol-loaded chitosan nanoparticles to control the biodeterioration of cultural heritage sites // *J. Cult. Herit.* Elsevier Masson. 2022. Vol. 53. P. 206–211.
12. Zhgun A.A. et al. Search for Efficient Chitosan-Based Fungicides to Protect the 15th–16th Centuries Tempera Painting in Exhibits from the State Tretyakov Gallery // *Microbiol. (Russian Fed.)*. 2020. Vol. 89, N 6. P. 750–755.
13. Zhgun A. et al. Detection of potential biodeterioration risks for tempera painting in 16<sup>th</sup> century exhibits from State Tretyakov Gallery // *PLoS One.* Public Library of Science (PLoS). 2020. Vol. 15, N 4. # e0230591.
14. Composites and Their Properties // *Composites and Their Properties* / ed. Hu N. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. 502 p.
15. Khayrova A. et al. Evaluation of Antibacterial and Antifungal Properties of Low Molecular Weight Chitosan Extracted from *Hermetia illucens* Relative to Crab Chitosan // *Multidisciplinary Digital Publishing Institute.* 2022. Vol. 27, № 2. P. 577.
16. Zhgun A. et al. The application of chitosan for protection of cultural heritage objects of the 15–16<sup>th</sup> centuries in the State Tretyakov Gallery // *Materials (Basel).* Multidisciplinary Digital Publishing Institute. 2022. Vol. 15, N 21. # 7773.

## ПОЛИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ХИТОЗАНА И БЕЛКА *BOMBYX MORI*

Р.Ю. Милушева, С.Ш. Рашидова

*Институт химии и физики полимеров Академии наук Узбекистана,*

*Ташкент, 100128, Узбекистан*

*E-mail: rumilusheva@gmail.com*

Строение хитозана, благодаря наличию аминогруппы у второго атома углерода пиранозного цикла обуславливает его комплексообразующие свойства по отношению к белкам. Поскольку хитозан (ХЗ) обладает большей способностью к межмолекулярным взаимодействиям, то одним из наиболее эффективных способов улучшения его характеристик является образование полимолекулярных комплексов (ПМК) с другими биополимерами, такими как белки [1–4].

В связи с этим, учитывая большие потенциальные возможности хитозана, актуальным представляется исследование полимолекулярных комплексов белка с хитозаном *Bombyx mori*.

Получение полимолекулярных комплексов белка и хитозана *Bombyx mori*, особенно в электролитных растворах, недостаточно изучены. Процесс получения комплексов на основе белковых щелочных гидролизатов и хитозана *Bombyx mori*, неизбежно сопровождается распадом надмолекулярной и молекулярной структуры отдельных функциональных групп и элементов его макромолекул. При этом скорость процесса образования комплекса зависит от рН среды и температуры. Однако эффективность образования комплекса во многом определяется также исходным поведением макромолекулы биополимеров в среде растворов.

Важнейшим свойством белков является их способность проявлять как кислые, так и основные свойства, то есть выступать в роли амфотерных электролитов. Это обеспечивается за счет различных диссоциирующих группировок, входящих в состав радикалов аминокислот. Общий фрагмент молекулы белка обладает полярными свойствами, потому что содержит кислую карбоксильную группу ( $-\text{COOH}$ ) и основные ( $-\text{NH}_2$ ) группы, поэтому белок обладает амфотерными свойствами. Однако при определенных значениях рН, число положительных и отрицательных зарядов уравнивается, и молекула становится электронейтральной. Такое значение рН среды определяется как изоэлектрическая точка белков. При этом белок находится в наименее устойчивом состоянии и при незначительных изменениях рН в кислую или щелочную сторону легко выпадает в осадок. Для большинства природных белков изоэлектрическая точка находится в слабокислой среде (рН 4,8–5,4), что свидетельствует о преобладании в их составе дикарбоновых аминокислот [5].

Для прямого титрования из раствора белкового щелочного гидролизата очень важен выбор необходимого значения рН. Применение титранта – раствора хитозана в уксусной кислоте обеспечивало достижение необходимого значения рН.

Получение комплекса осуществляют смешением полученных растворов ХЗ *Bombyx mori* и белкового щелочного гидролизата при перемешивании в течение 1 часа при комнатной температуре в диапазоне рН 6,0–6,5. Полученный суспензионный комплекс фильтруют для удаления отработанной жидкой смеси. Затем отфильтрованный комплекс промывают водой до нейтральной рН. Полученный комплекс лиофильно сушат при температуре:  $-50^\circ\text{C}$ . Получение полимолекулярных комплексов проводилось из белкового гидролизата

плотностью 1,028 кг/м<sup>3</sup> и рН 10,96 осаждением хитозана с M<sub>n</sub>=146,2 kDa и содержанием азота 8,20 %, при различных рН среды: 4.88; 6.27; 6,7.

Титрование раствора белка хитозаном проводят до выпадения осадка комплекса при рН=4,88. Полученный осадок отфильтровывают, промывают до рН=7 и высушивают лиофильно в течение 2 часов. Содержание азота в полученном комплексе – 12,57 %. Данные по получению комплексов при различных рН приведены в таблице 1.

Таблица 1

**Физико-химические характеристики комплексов хитозана и белка**

№	Белковый гидролизат, мл рН-10,96	2% укс. кислота, мл рН-3,16	2% ХЗ, мл рН-3,60	рН	Выход, г	Азот, %	Сера, %	Зольность, %
1	50	-	77	4,88	7,52	12,57	5,84	2,04
2	50	-	40	6,27	6,28	14,37	4,83	2,65
3	50	-	30	6,7	4,12	15,42	4,57	5,45
4	50 (контроль)	26,5	-	4,28	2,36	11,70	4,56	5,62

В образцах полученных комплексов № 1–3, происходит увеличение содержания серы на 28,0; 6,0 и 0,2 %, соответственно, что является подтверждением образования комплексов ХЗ с белком. Происходит также увеличение содержания азота с 12,57 до 15,42 % (контроль 11,7 %) вследствие синергетического эффекта при образовании комплекса. Одновременно с этим происходит снижение содержания зольности, исключая обр. № 3, поскольку здесь значение рН довольно высокое, что не позволяет достичь полноценного образования комплекса.

Метод ИК-спектроскопии является методом, позволяющим исследовать механизмы межмолекулярных взаимодействий при различных рН среды. Проведение сравнительных исследований методом ИК-спектроскопии представлено на рис. 1.

Видно, что на ИК-спектре исходного хитозана (1) и белка *Bombux mori* (2) имеются характерные полосы поглощения для этих соединений.

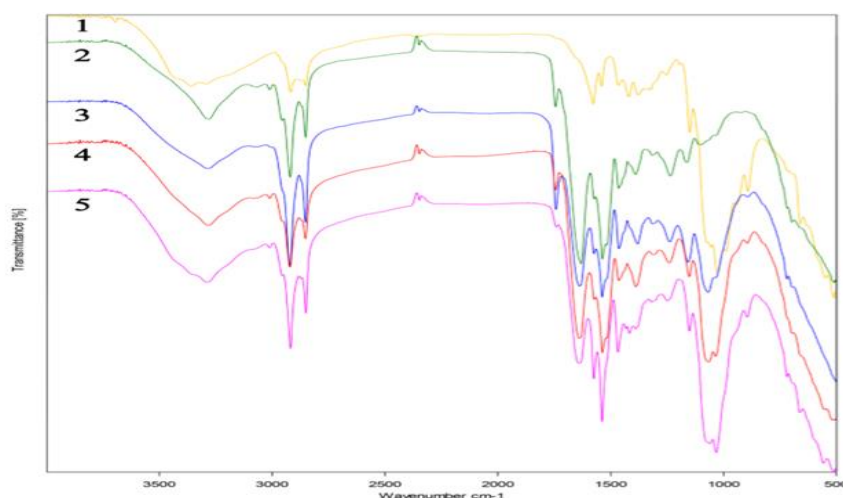


Рис. 1. ИК-спектры исходного хитозана (1), белка (2) и их комплексов при рН= 4,88 (3), рН= 6,27 (4) и рН= 6,7 (5)



На ИК-спектре хитозана (обр. 1) имеются полосы поглощения при 3320, 3288 и 2950  $\text{см}^{-1}$ , 2880  $\text{см}^{-1}$ , соответствующие валентным колебаниям NH-, OH- и CH-,  $\text{CH}_2$ -групп, соответственно. Выраженные полосы поглощения при 1590–1620  $\text{см}^{-1}$  (амид I) и при 1510–1550  $\text{см}^{-1}$  (амид II), а также 1440  $\text{см}^{-1}$ , соответствуют деформационным колебаниям NH-, CN-, CO- и CH-,  $\text{CH}_2$ -групп. Полосы поглощения, характеризующие CO-, C-O-C- эфирные связи, наблюдаются при 1000–1150  $\text{см}^{-1}$ .

На ИК-спектре белка *Bombyx mori* (обр. 2) проявляются несколько относительно сильных полос поглощения, которые как правило относятся к колебаниям пептидной группы –CO–NH-, как общему структурному компоненту белковых молекул. Наблюдается пик при волновых числах 3282  $\text{см}^{-1}$  – NH-, OH-, а также пики в области 2919, 2851 и 1744  $\text{см}^{-1}$ , соответствующие валентным колебаниям CH-,  $\text{CH}_2$ -, -COOH групп, соответственно.

Наличие двух основных полос поглощения, обусловленных валентными колебаниями NH-связи, пик при 1631  $\text{см}^{-1}$  и плоскостных деформационных колебаний  $\text{NH}_2$ -связи – пик при 1537  $\text{см}^{-1}$  характерны для структуры белка.

Комплекс должен реализоваться при pH выше изоэлектрической точки белка (pH $\approx$ 4,88), при которой происходит ион-дипольное взаимодействие между отрицательно заряженным белком и хитозаном с полярными группами  $\text{NH}_2$ . В результате образования комплексов: в образцах при pH =4,88 (3), 6,27 (4) и 6,7 (5) происходят некоторые изменения в полосах поглощения вышеуказанных групп и связей. А именно, появляются ярко выраженные полосы при волновых числах 3000–3500  $\text{см}^{-1}$  из-за смещения валентных колебаний полосы  $\text{NH}_2$ -групп хитозана и NH-групп белка. Особенно ярко выражены некоторые изменения и смещения полос поглощений в ИК-спектрах образца (5), полученного при pH 6, 7. Полосы поглощения деформационных колебаний при 3287  $\text{см}^{-1}$  смещены на 13  $\text{см}^{-1}$  (3300  $\text{см}^{-1}$ ) и становятся более широко выраженными, а также более выражена интенсивность поглощения асимметричной угловой деформации при 2918  $\text{см}^{-1}$ . Отсутствие полос поглощений валентных колебаний при 1517  $\text{см}^{-1}$ , характерных для  $\text{NH}_2$ -групп (амид I), а также валентных колебаний в области 1467  $\text{см}^{-1}$  становятся ярко выраженными в образцах №3 и №4.

В целом, обнаруженные изменения и смещения полос поглощений в ИК-спектрах, подтверждают протекание реакции комплексообразования между молекулами хитозана и белка при pH 4,88–6,7 с выходом до 60 % и увеличением содержания азота на 14–22 %.

Комплексный препарат на основе белка и хитозана *Bombyx mori* предназначен для добавления в составе рецептур в корма в рыбоводстве в целях повышения продуктивности рыбы и предотвращения болезней.

Проведены испытания полученных препаратов в Научно-исследовательском Институте развития рыбоводства в составе комбикормов (с содержанием сырого протеина 33,3 %) по различным показателям: выход рыбопродукции, выживаемость, эффективность использования корма. Работы проводились на промышленном виде рыбы – карпе (*Cyprinus carpio*), который является одним из основных объектов рыбоводства во многих странах мира. Ингредиенты животного происхождения считаются лучшей альтернативой источников белка в рыбных кормах, потому что они содержат больше незаменимых аминокислот, чем ингредиенты растительного происхождения [6]. Исследования проводились в течение 60 дней. В рамках эксперимента карпов разделили на 2 группы: I – контрольная группа (корм без добавления комплекса), II – экспериментальная группа (корм с добавлением комплекса).

Контрольный улов проводили каждые 15 дней, а суточный рацион корректировали в соответствии с ростом рыбы. Рыба во всех группах положительно росла в ходе эксперимента (табл. 2).

Показатели темпа роста рыб во время эксперимента

Показатели	Экспериментальные бассейны	
	I (контроль)	II (эксперимент)
Исходная масса тела, г	96.2±0.13	95.8±0.11
Конечная масса тела, г.	258.7±0.22	263.6±0.55
Средний привес массы тела, г.	162.5±0.8	167.8±0.44
Среднесуточная прибавка массы тела, г/сут	2.70	2.78
Кормовой коэффициент (FCR)	3.11	2.96

Суточные темпы роста рыб в г/сут. были практически одинаковыми. Этот показатель равен 2,70 в 1-й группе и 2,78 во 2-й группе. Известно, что одним из основных факторов достижения экономического успеха в искусственном рыбоводстве является то, сколько кг корма расходуется на кг прироста живой биомассы. В нашем эксперименте он показал хороший результат у 2 групп рыб и был равен 2,96. Полимерный комплекс, используемый в наших исследованиях, богат незаменимыми для рыб аминокислотами, что отчетливо ощущалось в эксперименте.

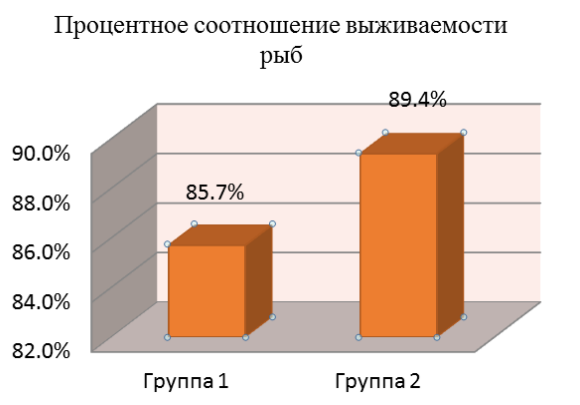


Рис. 2. Процентное соотношение выживаемости рыб в эксперименте

За время опыта выживаемость рыб в контрольной группе составила 85,7 %, а в опытной группе этот показатель был выше на 3,7 % и составил 89,4 % (рис.2).

Таким образом, получены полимолекулярные комплексы на основе белка и хитозана, структура комплексов доказана ИК-спектроскопией и элементным анализом. Проведенные испытания полученных комплексов в Научно-исследовательском Институте развития рыбоводства в составе комбикормов выявили, что комплексы положительно воздействовали на динамику развития рыб и в перспективе могут использоваться как активные добавки в составе комбикормов при разведении рыбы. Экспериментальными опытами показано, что при использовании препарата на основе белка и хитозана *Bombux mori*, произошло увеличение выживаемости рыбы, увеличились темпы роста рыбы и снизился кормовой коэффициент. Это позволит создавать сбалансированные высокопротеиновые корма с бактерицидной активностью для рыбоводства, используя местное сырье, являющееся отходом производства шелка.

### Список литературы

1. Механизм взаимодействия хитозана с белками / Л.Р. Алиева, Т.В. Буткевич, Т.Н. Головач, И.А. Евдокимов, В.П. Курченко // Современная наука и инновация, 2017, Т. 19, №: 3. С. 100–108.
2. Иощенко Ю.П. Получение и исследование полимолекулярных комплексов хитозана с белками и гидроксилсодержащими полимерами : дис. ... канд. техн. наук. Волгоград: ВГТУ, 2006. 119 с.
3. В.Ф. Каблов, Ю.П. Иощенко, Д.А Кондрущий // Современные наукоемкие технологии. 2004. № 4. С. 87–88.
4. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем / В.П. Курченко, Л.Р. Алиева, Т.В. Буткевич, Н.В. Гавриленко // Труды БГУ. 2013. Т. 8, ч. 1. С. 45–51.
5. С.М. Dobson. The Nature and Significance of Protein Folding: Mechanisms of Protein Folding / Pain R. H., 2<sup>nd</sup> New York, NY: Oxford University Press, 2000.
6. Benichou A., Aserin A., Garti N. Protein-polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions // Journal of Dispersion Science and Technology. 2002. Vol. 23. P. 93–123.

## ОЦЕНКА ФЛОКУЛЯЦИОННЫХ СВОЙСТВ ХИТОЗАНА ПРИ ОЧИСТКЕ ВОДЫ НА ПРЕДПРИЯТИИ ВОДОПОДГОТОВКИ

**А.Р. Холова<sup>1</sup>, М.Ю. Вожаева<sup>1,2</sup>, И.А. Мельницкий<sup>1</sup>, П.В. Серебряков<sup>1</sup>,  
Р.И. Киекбаев<sup>1</sup>, Е.А. Кантор<sup>2</sup>, А.В. Ялалетдинова<sup>2</sup>, М.А. Малкова<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Государственное унитарное предприятие Республики Башкортостан «Уфаводоканал»,  
ул. Российская, дом 157/2, Уфа, 450098, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Уфимский государственный нефтяной технический университет»,  
ул. Космонавтов, дом 1, Уфа, 450064, Россия  
E-mail: al-pochta@mail.ru

Основными современными способами подготовки воды на предприятиях водоснабжения на сегодняшний день остаются коагуляция, отстаивание, фильтрование и обеззараживание. Сочетание этих этапов при подборе оптимальных доз реагентов позволяет добиться высокой эффективности водоподготовки. Дополнительное увеличение доз реагентов и обеззараживающих агентов в случае повышенной загрязненности воды может быть целесообразно, но при этом увеличивается вероятность роста содержания в воде остаточных количеств реагентов (например, остаточный алюминий), веществ, мигрирующих из материалов (канцерогенный мономер полиакриламида (ПАА) – акриламид), а также побочных продуктов хлорирования, регламентируемых согласно СанПиН 1.2.3685–21. При аварийном залповом загрязнении водоисточника техногенными примесями эффективно использование активного порошкообразного угля (АПУ), что существенно увеличивает барьерную роль сооружений водоподготовки. Такая схема реализована на предприятии ГУП РБ «Уфаводоканал» [1, 2]. Однако АПУ недостаточно эффективен при загрязнении воды водоисточников природными органическими соединениями, например смывами органических высокомолекулярных соединений, входящих в состав почвенных гумусовых веществ при интенсивных паводках. В связи с этим, вопрос подбора материала, обладающего сорбционными и/или флокулирующими свойствами относительно широкого круга загрязнителей воды техногенного и природного происхождения, является актуальным.

В настоящее время в научной литературе встречаются данные об использовании хитозана – природного биологически активного гетерополисахарида, состоящего из N-глюкозаминов и N-ацетоглюкозаминов [3]. Хитозан успешно применяют в биомедицине, косметологии, сельском хозяйстве и др. В литературе имеются данные о перспективности использования хитозана в качестве флокулянта для очистки природной воды от гуминовых веществ [4], сточных вод различных производств [5], технологических растворов и других жидких сред, а также шламов, донных отложений, почв [6] от тяжелых металлов, радионуклидов, бактерий, пестицидов, нефтепродуктов (НП). Кроме того, для увеличения эффективности очистки воды возможно использование модифицированного хитозана или сорбентов модифицированных хитозаном, а также хитозана совместно с различными фильтрующими материалами, коагулянтами и флокулянтами [7–11].

В данной работе проведена оценка эффективности очистки речной воды, дополнительно загрязненной техногенными органическими веществами, в частности НП (по суммарному содержанию алкилбензолов, n-алканов, нафтенов и алкилнафталинов), ди-(2-этилгексил)фталатом (ДЭГФ) и природными органическими соединениями. Для очистки использовали коагулянт сульфат алюминия (СА), флокулянты ПАА и хитозан, сорбент АПУ марки СПДК–27Д.

Исследования проводились на лабораторной установке в условиях, моделирующих технологический процесс подготовки воды на водозаборе. Установка включала в себя 5 емкостей для проведения пробной коагуляции путем перемешивания и отстаивания воды и колонок – фильтров, загруженных горелой породой. Эквивалентный диаметр загрузки фильтров  $d_{экв}=0,8$  мм, коэффициент неоднородности  $K_n=1,2$ . Фильтрование осуществлялось со скоростью 7 м/ч – средней скоростью фильтрования на сооружениях водоподготовки.

Эффективность очистки воды рассчитывалась по формуле:

$$\mathcal{E} = \frac{C_{исх} - C_{получ}}{C_{исх}} \times 100\% ,$$

где  $C_{исх}$  – значение определяемого показателя в исходной воде р. Уфы,  $C_{получ}$  – значение определяемого показателя в воде после очистки и фильтрования.

Подбор дозы хитозана проводился путем добавления в загрязненную воду коагулянта СА с концентрацией 9,5 мг/дм<sup>3</sup> и раствора хитозана с концентрациями 0,1–2 мг/дм<sup>3</sup>. Установлено, что доза хитозана 0,5–1 мг/дм<sup>3</sup> обеспечивает наибольшую эффективность очистки речной воды по обобщенному показателю оптической плотности при 254 нм (A254) (рис. 1). Данный показатель отражает содержание ароматических фрагментов, входящих в состав органических соединений техногенного и природного происхождения (водные гуминовые и фульвокислоты) [12]. Как показали результаты, увеличение дозы хитозана нецелесообразно.

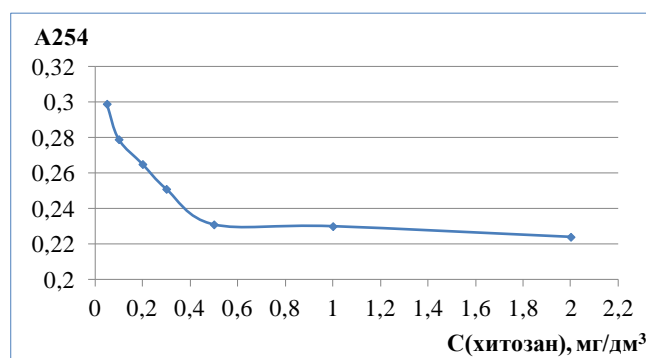


Рис. 1. Зависимость оптической плотности при длине волны 254 нм (A254) от концентрации хитозана

Проведено четыре серии экспериментов по 5 режимов в каждой серии:

Режим 1 – С(СА) = (9,5-11,0) мг/дм<sup>3</sup>, С(ПАА) = (0,25–0,28) мг/дм<sup>3</sup>

Режим 2 – С(СА) = (9,5-11,0) мг/дм<sup>3</sup>, С(ПАА) = (0,25–0,28) мг/дм<sup>3</sup>, С(АПУ) = 10 мг/дм<sup>3</sup>

Режим 3 – С(СА) = (9,5-11,0) мг/дм<sup>3</sup>, С(Хитозан) = 0,5 мг/дм<sup>3</sup>

Режим 4 – С(СА) = (9,5-11,0) мг/дм<sup>3</sup>, С(Хитозан) = 1,0 мг/дм<sup>3</sup>

Режим 5 – С(СА) = (9,5-11,0) мг/дм<sup>3</sup>, С(Хитозан) = 0,5 мг/дм<sup>3</sup>, С(АПУ) = 10 мг/дм<sup>3</sup>

Концентрации добавок НП и ДЭГФ составляли 5 и 0,04 мг/дм<sup>3</sup> соответственно. Контроль речной воды с добавками НП и ДЭГФ и очищенной воды осуществлялся по следующим показателям: перманганатная окисляемость (ПО), растворенный органический углерод (РОУ), A254, SUVA (A254/РОУ), ДЭГФ, н-алканы, алкилбензолы, нафтены, алкилнафталины. В работе использовались методы титриметрии, спектрофотометрии и хромато-масс-спектрометрии [13–15].

Полученные результаты свидетельствуют, что эффективность очистки загрязненной речной воды с помощью коагулянта СА и флокулянта хитозана (режимы 3, 4) по отношению к НП (по суммарному содержанию алкилбензолов, н-алканов, нафтенов и алкилнафталинов) составляет в среднем 90-96 %, к ДЭГФ – 93–98 %, природным органическим соединениям, оцениваемых по показателю перманганатной окисляемости – 62–78 %, что выше по сравнению с используемыми СА в сочетании с флокулянтом ПАА (режим 1) или с ПАА и АПУ (режим 2) (таблица 1). Совместное использование хитозана и АПУ (режим 5) является более эффективным по сравнению с простым углеванием воды (режим 2). Увеличение дозы флокулянта ПАА нежелательно ввиду возможной миграции в воду токсичного мономера акриламида, тогда как хитозан в приемлемых дозах не приводит к росту содержания токсичных продуктов [16].

Таким образом, использование хитозана в качестве флокулянта является перспективным в случае комбинированного загрязнения воды водоисточников органическими соединениями техногенного и природного происхождения.

Таблица 1

**Эффективность очистки (Э, %) исходной воды (р. Уфы, загрязненной НП и ЭФК) с использованием различных вариантов очистки**

№	Показатель	Эффективность очистки, (min-max)%				
		Режим 1	Режим 2	Режим 3	Режим 4	Режим 5
1	ПО	40 - 70	25 - 65	66 - 77	62 - 78	48 - 75
2	РОУ	15 - 17	13 - 21	20 - 27	23 - 29	17 - 28
3	A254	40 - 50	45 - 49	52 - 54	53 - 55	54 - 55
4	SUVA ( A254 /РОУ)	25 - 38	31 - 46	37 - 46	36 - 44	37 - 46
5	Алкилбензолы	60 - 68	74 - 78	78 - 89	78 - 90	74 - 85
6	Н-алканы	97 - 98	97 - 98	99 - 99	99 - 99	98 - 99
7	Нафтены	95 - 96	97 - 97	98 - 99	98 - 99	97 - 98
8	Алкилнафталины	47 - 50	68 - 70	64 - 75	62 - 77	67 - 78
9	НП	89 - 91	93 - 94	90 - 96	90 - 96	93 - 96
10	ДЭГФ	91 - 93	91 - 92	95 - 98	93 - 98	92 - 96

Работа выполнена в рамках государственного задания «Экология» (ЦИТИС 122040600057-3) и государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (FEUR – 2023 – 0006 «Разработка и создание малотоннажных продуктов и реагентов (ингибиторы коррозии и солеотложения, антиоксиданты, биоциды, присадки и др.) для процессов нефтегазохимии и очистки водных сред от загрязнений, замещающих импортные вещества и материалы. Теоретические и экспериментальные подходы»).

## Список литературы

1. Смирнов А.Д., Миркис В.И., Кантор Л.И. Углевание воды при экстраординарных загрязнениях водоисточника – р. Уфы // Водоснабжение и санитарная техника. 2001. № 5, ч. 2. С. 21–22.
2. Экологический мониторинг органических загрязнителей в системе аналитического контроля качества воды / М.Ю. Вождяева, Л.Г. Цыпышева, Л.И. Кантор, Н.В. Труханова, И.А. Мельницкий, Е.А. Кантор; под общ. ред. д.х.н., проф. Кантора Е.А. Уфа: «Гилем», Башк. энцикл. 2016. 200 с.
3. Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты / В.П. Варламов, А.В. Ильина, Б.Ц. Шагдарова, А.П. Луньков, И.С. Мысякина // Успехи биологической химии. 2020. Т. 60. С. 317–368.
4. Removal of humic substances by UF and NF membrane systems / R. Bian, Y. Watanabe, N. Tambo, G. Ozawa // Water Sci. Technol. 1999. Vol. 40, N 9. P. 121–129.
5. Использование хитозана для очистки природных и сточных вод / З.В. Ловкис, О.В. Павлова, Е.А. Белова, М.М. Трусова // Пищевая промышленность: наука и технологии. 2023. Т. 16, № 1. С. 53–61.
6. Машкова С.А. Очистка сточных вод с помощью природных сорбентов и их химически модифицированных аналогов: дис. ... канд. хим. наук: 03.00.16. Дальневост. гос. ун-т. Владивосток. 2007. 118 с.
7. Патент РФ № 2073015 «Способ получения хитинсодержащего материала» / Горовой Л.Ф., Косяков В.М., опубликован 10.02.1997. бюл. 10.
8. Полезная модель № 73618 «Сорбент для очистки воды» / Иощенко Ю.П., Каблов В.Ф., опубликована 20.04.2009.
9. Патент РФ № 2279405 «Способ очистки вод от нефтепродуктов» / Авраменко В.А., Братская С.Ю., Железнов В.В., Сергиенко В.И., Филиппова И.А., Юдаков А.А., Южкам А.А., опубликован 10.07.2006, бюл. 19.
10. Патент РФ № 2184607 «Способ получения органоминеральных сорбентов (варианты)» / Шапкин Н.П. опубликован 10.07.2002, бюл. 19.
11. Технология получения и использования композиционных материалов из хитозана и шелухи проса для очистки стоков от ионов тяжелых металлов / Е.А. Тарановская, Н.А. Собгайда, Д.Ю. Маркина, П.А. Морев // Вестник ПНИПУ. Прикладная экология. Урбанистика. 2016. № 1. С. 50–62.
12. Monitoring and statistical analysis of formation of organochlorine and organobromine compounds in drinking water of different water intakes / M.Y. Vozhdaeva, A.R. Kholova, I.A. Melnitskiy, I.I. Beloliptsev, Y.S. Vozhdaeva, E.A. Kantor, A.T. Lebedev // Molecules. 2021. Vol. 26, # 1852.
13. Определение эфиров фталевой кислоты в питьевой и природной воде методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием / А.Р. Холова, М.Ю. Вождяева, Л.И. Кантор, Е.А. Кантор, И.А. Мельницкий, Н.В. Труханова // Вода: химия и экология. 2012. № 5. С. 85–91.
14. Composition and dynamics of volatile and semi-volatile organic contaminants in potable water transported via extended water distribution networks of a metropolis / A.I. Konstantinov, M. Yu. Vozhdaeva, A.R. Kholova, E.V. Wagner, N.V. Trukhanova, I.A. Melnitskiy, I.V. Perminova, E.A. Kantor, I.I. Beloliptsev // Fifth International Conference of CIS IHSS on Humic Innovative Technologies «Humic substances and living systems» (HIT-2019), October 19–23, Moscow, Russia. P. 39. DOI: 10.36291/HIT.2019.000.
15. А.Р. Холова, М.Ю. Вождяева, Л.И. Кантор, И.А. Мельницкий, Н.В. Труханова, Е.А. Кантор. Обзор хроматографических методов анализа, используемых для определения (контроля) нефтепродуктов в воде // Вода: химия и экология. 2011. № 10. С. 34–40.
16. С.Ю. Братская, Д.В. Червонецкий, А.В. Перфильев, А.А. Юдаков, В.А. Авраменко. Применение хитозана и его производных в питьевом водоснабжении и переработке сточных вод различного состава // Рыбпром. 2010. № 2. С. 58–63.

# БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДИСПЕРСИЙ НАНОЧАСТИЦ ХИТОЗАНА, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ ДРОБНОГО ОСАЖДЕНИЯ

Э.В. Попова<sup>1</sup>, Н.С. Домнина<sup>2</sup>, И.И. Новикова<sup>1</sup>,  
Н.М. Коваленко<sup>1</sup>, И.Л. Краснобаева<sup>1</sup>, И.М. Зорин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,  
шоссе Подбельского, дом 3, Пушкин, Санкт-Петербург, 196608, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет,  
Университетский проспект, дом 26, Петергоф, Санкт-Петербург, 199034 Россия  
E-mail: elzavporova@mail.ru, krasnobaeva08@mail.ru

К настоящему времени природный полимер хитозан стал наиболее востребованным биоматериалом в медицине, пищевой промышленности и в сельском хозяйстве [1–3]. Этот природный биополимер известен своими уникальными свойствами, такими как способность к биологическому разложению, нетоксичность и спектром биологической активности (антигрибная, антибактериальная, антивирусная, элиситорная и др.), что обуславливает широкое его применение в растениеводстве в качестве средств, стимулирующих рост и развитие растений, а также в препаратах, защищающих многие сельскохозяйственные культуры от грибных, вирусных и бактериальных заболеваний [4, 5]. Такие уникальные свойства биополимера хитозана можно дополнительно усилить, используя его в форме наночастиц, так как в этой форме он может проявлять различную биологическую активность с измененными физико-химическими свойствами, такими как размер, катионная природа и площадь поверхности [6].

В ряде работ продемонстрирована более высокая антибактериальная и фунгистатическая активность дисперсий наночастиц по сравнению с раствором хитозана [7–9]. Появились сообщения о том, что наночастицы хитозана могут действовать как иммунологический модулятор в растениях чая и пальчатого проса, индуцируя активность защитных ферментов [6, 10]. На примере *Camellia sinensis* впервые была доказана способность наночастиц хитозана усиливать врожденный иммунитет [6].

Подтверждением эффективности использования наночастиц для повышения болезнестойчивости растений являются результаты работы, в которой показано, что обработка семян проса дисперсией наночастиц индуцировала системную устойчивость к ложной мучнистой росе и приводила к снижению пораженности растений в 5 раз [11]. Об элиситорной активности наночастиц хитозана сообщается в работе Sathiyabama et al. (2016), где авторы связывают снижение проявления симптомов пирикулярноза на листьях проса с применением наночастиц хитозана [10]. Известные литературные данные свидетельствуют о том, что изучение и применение в растениеводстве наночастиц хитозана в виде дисперсий, обладающих разнообразной биологической активностью, является актуальной задачей.

Данная работа посвящена оценке антимикробной и иммуномодулирующей активности дисперсий наночастиц хитозана, полученных методом дробного осаждения с использованием хитозана разной молекулярной массы.

Для получения наночастиц методом дробного осаждения были использованы образцы хитозана с молекулярной массой 6.5, 14 и 60 кДа, ранее полученные нами по известной методике [12] из хитозана с молекулярной массой 150 кДа и степенью деацетилирования 85 % (Биопрогресс, Россия). Процесс образования наноструктурированной формы хитозана и соответствующих дисперсий, а также их характеристика подробно описаны авторами в работе [13].

Среди многообразия способов получения наночастиц хитозана [14–16] метод дробного осаждения раствора хитозана щелочью выгодно отличается отсутствием побочных химических процессов и методической простотой образования наночастиц хитозана, что делает этот способ наиболее перспективным для использования в растениеводстве. [17, 18].

Особенностью получения наночастиц хитозана методом дробного осаждения раствора хитозана щелочью является большая длительность по времени процесса образования наноструктурированной формы, что обусловлено постепенным ростом значения рН в системе (начальный рН=3.4) по мере добавления щелочи. При рН близком к 8 весь полимер в виде гелеобразной массы оседает на дно. Осадок, промытый до нейтрального рН и ресуспендированный в деионизированной воде (рН=6.5) представляет собой дисперсию нанохитозана (НХ).

Нами сделано предположение, что если процесс закончить при рН=5, то образующаяся дисперсия будет представлять собой смесь агрегатов из макромолекул и уже частично сформированной наноструктурированной формы хитозана (дисперсия НХ-5). Методом атомно-силовой спектроскопии путем анализа полученных изображений установлено, что в дисперсиях НХ присутствуют только плотные сплошные частицы, размер которых оценен величинами в диапазоне 5–25 нм [13]. Дисперсии НХ-5 имеют в своем составе гелеобразные мягкие частицы с диаметром около 100 нм, представляющие собой агрегаты макромолекул хитозана, несущие частично положительный заряд, и наночастицы хитозана, уже образовавшиеся в дисперсии до рН=5. Можно предположить, что дисперсии НХ, приготовленные в деионизированной воде (рН=6,5), будут обладать биологической активностью благодаря наличию наноразмерных частиц с большой удельной поверхностью. Для дисперсий НХ-5, имеющих наряду с наночастицами еще и агрегаты макромолекул хитозана, которые при рН=5 несут положительный заряд, можно ожидать усиления биологического действия.

Для биологических испытаний были использованы два типа дисперсий наночастиц хитозана (дисперсии НХ и дисперсии НХ–5) с разной молекулярной массой, различающиеся значением рН среды, что обусловлено условиями их приготовления. Результаты изучения биологической активности полученных дисперсий в отношении гриба *Alternaria solani* показали, что дисперсии НХ–5 характеризуются более высокой фунгистатической активностью по сравнению с дисперсиями НХ. При этом видно, что фунгистатические свойства дисперсий обоих типов не зависят от молекулярной массы хитозана (табл. 1).

Таблица 1

**Фунгистатическая активность дисперсий НХ и дисперсий НХ–5 при ингибировании роста мицелия гриба *A. solani* (концентрация образцов 200 мкг/мл по хитозану)**

М, кДа	Образец	Ингибирование роста мицелия <i>A. solani</i> , %	
		3-е сутки	5-е сутки
14	Дисперсия НХ	17.5	33.3
	Дисперсия НХ-5	46.0	57.2
60	Дисперсия НХ	18.0	28.9
	Дисперсия НХ-5	47.5	57.7
НСР <sub>0,05</sub>		3.5	3.0



Изучение элиситорной активности дисперсий НХ и НХ-5, полученных при использовании хитозана с молекулярной массой 60 кДа, проведено путем оценки способности дисперсий индуцировать устойчивость пшеницы к темно-бурой пятнистости, вызываемой *Cohliobulus. sativus* (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние обработки растений пшеницы дисперсиями НХ и НХ-5 на развитие темно-бурой пятнистости (возбудитель *C. sativus.*), М=60 кДа.**

Образец	Концентрация, %	Пораженность листьев, %
Контроль		50
Дисперсия НХ-5	0.04	20
	0.01	25
Дисперсия НХ	0.04	35
	0.01	40
НСР <sub>0.05</sub>		4.0

Дисперсии НХ-5 и дисперсии НХ показали хорошую элиситорную активность, при этом дисперсия НХ-5 характеризуется более сильным иммуномодулирующим действием по сравнению с дисперсией НХ. Вполне вероятно, что причина преимущества дисперсии НХ-5 кроется в ее составе, сочетающем наночастицы (компактизованные макромолекулы хитозана) и ассоциаты свободных макромолекул хитозана. Последние представляют собой рыхлые с большой подвижностью частицы, у которых на поверхности есть доступность к функциональным аминокетильным группам.

Сравнение элиситорной активности дисперсии НХ-5 с раствором исходного хитозана подтвердило преимущество этой дисперсии (табл. 3).

Таблица 3

**Влияние дисперсии НХ-5 и раствора хитозана на развитие темно-бурой пятнистости пшеницы**

Образец М=60 кДа	Концентрация, %	Пораженность листьев, %
Контроль		50
Дисперсия НХ-5	0.04	20
	0.01	25
	0.004	45
Раствор Хитозана	0.04	45
	0.01	50
	0.004	50
НСР <sub>0.05</sub>		4.0

Из данных таблицы 3 видно, что предобработка растений пшеницы дисперсией НХ-5 в концентрации 0.01 % в два раза снижает пораженность листьев темно-бурой пятнистостью, в то время как раствор хитозана в той же концентрации практически не влияет на развитие болезни. Изученные дисперсии могут рассматриваться в качестве эффективных натуральных антимикробных препаратов, обладающих индуцирующей активностью.

### Список литературы

1. Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С. Хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты // Успехи биологической химии. 2020. Т. 60. С. 317–368.
2. Wang W., Meng Q., Li Q., Liu J., Zhou M., Jin Z., Zhao K. Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine // Int. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21, N 2. # 487.
3. Saharan V., Pal A. Chitosan based nanomaterials in plant growth and protection. Springer: Briefs in Plant Science. Publisher : Springer; 1st ed. 2016. 55 p.
4. Варламов В.П., Немцев С.В., Тихонов В.Е. Хитин и хитозан: природа, получение и применение – М.: Российское Хитиновое Общество, 2010. 292 с.
5. El Hadrami A, Adam L. R., El Hadrami I., Daayf F. Chitosan in plant protection // Marine Drugs. 2010. Vol. 8, N. 4. P. 968–987.
6. Chandra S., Chakraborty N., Dasgupta A., Sarkar J., Panda K., Acharya K. Chitosan nanoparticles: a positive modulator of innate immune responses in plants // Sci. Rep. 2015. Vol. 5. P. 1–14.
7. Ing L.Y., Zin N.M., A., Katas H. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties // Int. J. Biomaterials. 2012. Vol. 1. P. 2–9.
8. Abdeltwab W.M., Abdelalim Y.F., Metry W.A., Eldeghedy M. Antimicrobial effect of chitosan and nano-chitosan against some pathogens and spoilage microorganisms // J. Adv. Lab. Res. Biol. 2019. Vol. 10. P. 8–15.
9. Oh J.-W., Chun S.C., Chandrasekaran M. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles and their broad-spectrum antifungal action compared to antibacterial activities against phytopathogens of tomato // Agronomy. 2019. Vol. 9. # 21.
10. Sathiyabama M., Manikandan A. Preparation of chitosan nanoparticles and its effect on detached rice leaves infected with *Pyricularia grisea* // Carbohydrate Polymers. 2016. Vol. 154. P. 241–246.
11. Siddaiah C. N., Satyanarayana N.R., Mudili V., Gupta V. K., Kalagatur N. K., Satyavati T., Dai X.-F., Chen J.-Y., Mocan A., Singh B. P., Srivastava R. K. Chitosan nanoparticles having higher degree of acetylation induce resistance against pearl millet downy mildew through nitric oxide generation // Sci. Rep. 2018. Vol. 8, N 1. # 2485.
12. Власов П.С., Киселев А.А., Домнина Н.С., Попова Э.В., Тютерев С.Л. Синтез и биологическая активность комплексов хитозана с металлами // ЖПХ. 2009. Вып. 9. С. 1571.
13. Попова Е.В., Domnina N.S., Zorin I.M., Lezov A.A., Novikova I.I., Krasnobaeva I.L. Nanostructured chitosan: Synthesis technique and biological activity // Nanobiotechnology Reports. 2023. Vol. 18, N 2. P. 238–246.
14. Rampino A., Borgogna M., Blasi P., Bellich B., Cesaro A. Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. // Int. J. Pharm. 2013. Vol. 455. # 219.
15. Nugraheni P.S., Soeriyadi A.H., Ustadi U., Sediawan W.B., Budhijanto W. Comparison of Formulation Methods to Produce Nano-Chitosan as Inhibitor Agent for Bacterial Growth // Journal of Engineering and Technological Sciences. 2019. Vol. 51, N 3. # 430.
16. Попова Э. В., Зорин И. М., Домнина Н. С., Новикова И. И., Краснобаева И. Л. Наночастицы хитозан–триполифосфат: синтез методом ионного гелеобразования, свойства и биологическая активность // Журнал общей химии. 2020. Т. 90, № 7. С. 1124–1132.
17. Патент № 2428432. Способ получения наночастиц низкомолекулярного хитозана / Купреев Н.И., Кузнецов В.А., опубликован 2011.
18. Милушева Р.Ю., Рашидова С.Ш. Биоактивные свойства нанохитозана *Bombyx mori* // Высокомолекул. Соед. Серия С. 2017. Т. 59, № 1. С. 33.

# ВЛИЯНИЕ ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS* В СОЧЕТАНИИ С САЛИЦИЛАТОМ ХИТОЗАНА НА АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ И КАТАЛАЗЫ В ЛИСТЯХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕМ ТЕМНО-БУРОЙ ПЯТНИСТОСТИ *B. SOROKINIANA*

И.И. Новикова, Э.В. Попова, Н.М. Коваленко, И.Л. Краснобаева

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (ВИЗР),  
Пушкин, Санкт-Петербург, 196608, Россия  
E-mail: krasnobaeva08@mail.ru

В настоящее время усилия исследователей направлены на разработку методов повышения биологической эффективности биопрепаратов и обеспечения стабильного защитного эффекта.

По нашему мнению, для достижения этой цели заслуживает внимания подход, позволяющий увеличивать способность штаммов-продуцентов запускать каскад защитных реакций и повышать системную устойчивость растений путем включения в состав рецептурной формы природных или синтетических активаторов болезнеустойчивости. При реализации этого направления в ФГБНУ ВИЗР разработан ряд препаративных форм на основе сочетания штаммов микробов-антагонистов возбудителей болезней и активаторов болезнеустойчивости растений – хитозана и его производных. Высокий защитный эффект таких комплексных биопрепаратов обусловлен сочетанием антагонистических свойств штаммов микроорганизмов и способности хитозана совместно с биологически активными веществами активизировать механизмы естественной устойчивости растений к патогенам [1, 2–4], поскольку хитозан и его производные – эффективные элиситоры индуцированной устойчивости в растениях [5, 6].

В лаборатории микробиологической защиты разработаны лабораторные образцы на основе сочетания штаммов *Bacillus subtilis* ВКМ В–2604D и ВКМ В–2605D и салицилата хитозана, и в полевых условиях в течение ряда лет показана их высокая эффективность в защите яровой мягкой пшеницы от корневой гнили и листовых инфекций.

Считается, что биопрепараты вызывают активацию тех физиолого-биохимических процессов, которые участвуют в формировании неспецифического ответа растений на внешнее стрессовое воздействие

В ряде работ установлено, что бактерии-антагонисты способны повышать активность антиоксидантных ферментов, снижающих токсическое действие АФК, и индуцировать устойчивость к болезням у инфицированных растений [7, 8]. Познание механизмов формирования защитного ответа растений биопрепаратами в сочетании с элиситорами позволит значительно повысить эффективность экологически безопасных защитных мероприятий.

Цель работы состояла в изучении влияния штаммов *Bacillus subtilis* ВКМ В–2604D и ВКМ В–2605D и их сочетаний с салицилатом хитозана на активность пероксидазы и каталазы в листьях пшеницы при инфицировании возбудителем темно-бурой пятнистости *B. sorokiniana*.

### Материалы и методы исследований

Место проведения работы – лаборатория микробиологической защиты ФГБНУ ВИЗР. В работе использовали: пшеница *Triticum aestivum* L., сорт Саратовская 29; возбудитель темно-бурой пятнистости *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker; лабораторные образцы на основе культуральной жидкости (КЖ) штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D и их сочетания с салицилатом хитозана (СХ). Титр клеток *B. subtilis* в образцах  $10^9$  КОЕ/мл.

Варианты опыта: контроль (вода); КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D при соотношении 1:1; КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1 % СХ, при получении образца в питательную среду для глубинного культивирования добавляли 0.1 % СХ; композиция КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D + 0.1 % СХ; СХ 0.1 %.

СХ получали из хитозана с молекулярной массой 60 кДа со степенью деацетилирования 85 % («Биопрогресс», Россия) согласно методу [9].

Опыты по оценке иммуномодулирующей активности исследуемых вариантов проводили методом отделенных листьев. Семисуточные проростки мягкой пшеницы восприимчивого сорта Саратовская 29 опрыскивали растворами лабораторных образцов (из расчета 30 мл на 100 растений), согласно схеме опыта, за 24 ч до инокуляции патогеном – листовой формой гемибиотрофа *B. sorokiniana* (титр  $4 \times 10^3$  спор/мл). Концентрация клеток (титр) штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D в образцах составляла  $10^9$  КОЕ/мл. Пораженность листьев оценивали на 4-е сутки после заражения *B. sorokiniana* в % площади листа.

Влияние штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D и их сочетаний с СХ на активность ферментов каталазы (КАТ) [10] и пероксидазы (ПО) [11] оценивали при анализе проб листьев пшеницы, отобранных до заражения и на 1-е, 2-е, 3-е и 4-е сутки после заражения *B. sorokiniana*.

Варианты включали растения, зараженные *B. sorokiniana* (зараженный контроль); растения, обработанные штаммами *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D и их сочетаниями с СХ и 0.1 % СХ за 24 ч до заражения *B. sorokiniana*; растения необработанные и незараженные (незараженный контроль).

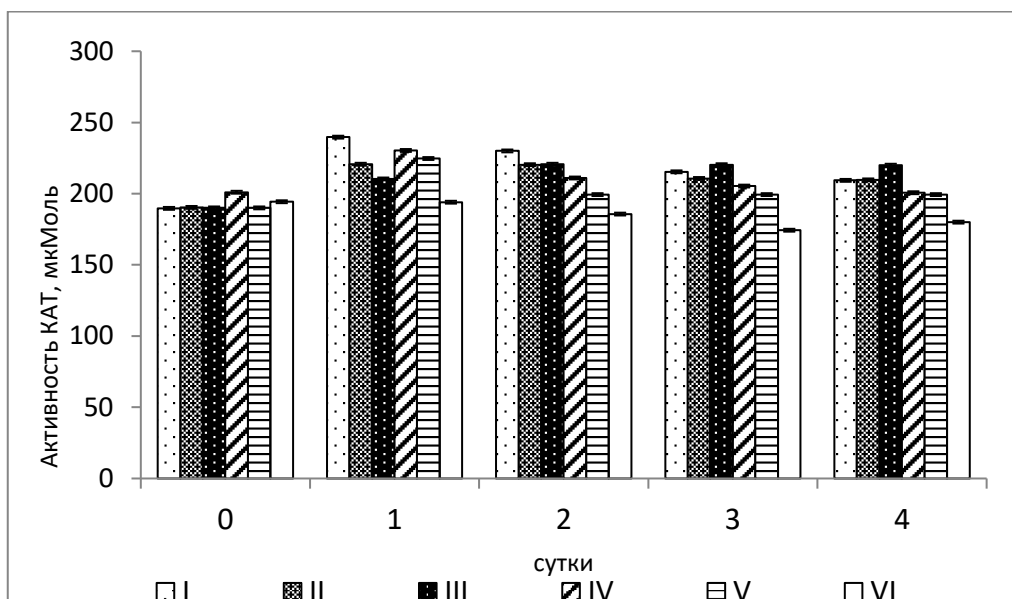
Таблица 1

#### Влияние предварительной обработки листьев штаммами *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D и их сочетаний с салицилатом хитозана (СХ) на пораженность листьев пшеницы *B. sorokiniana*

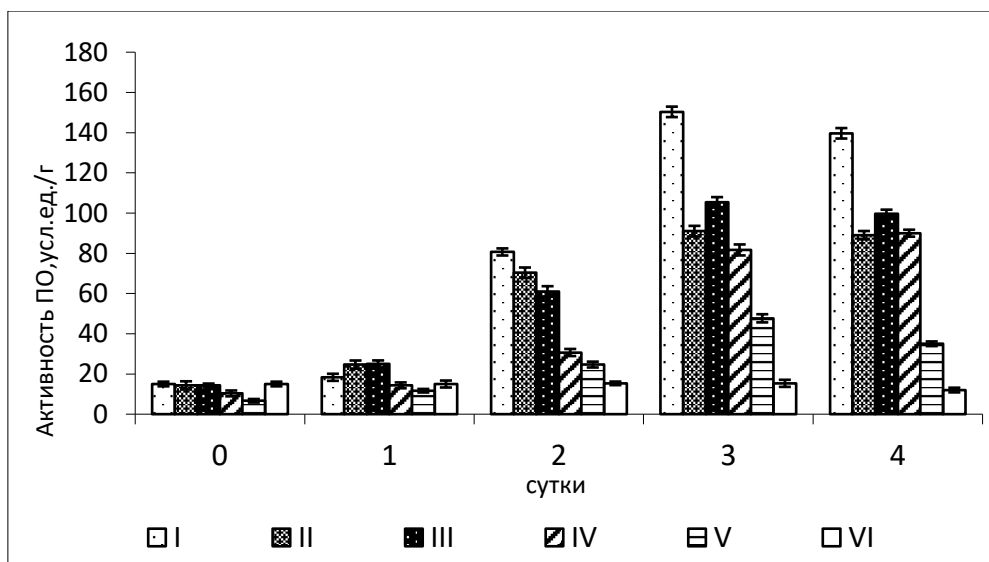
Варианты опыта	Пораженность листьев пшеницы, %
Контроль (вода)	60
КЖ штаммов <i>B. subtilis</i> ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D	40
КЖ штаммов <i>B. subtilis</i> ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ	20
Композиция: КЖ штаммов <i>B. subtilis</i> ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ	15
СХ 0.1%	5
НСР <sub>05</sub>	4.5

Предварительное опрыскивание растений КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D с последующим заражением возбудителем темно-бурой пятнистости снижало площадь поражения листьев на 20 % (таб.1). Добавление СХ к КЖ штаммов в концентрации 0.1 % положительно повлияло на индуцирующую способность антагониста, повысив его биологическую активность в 3–4 раза (таб.1).

Установлено, что процесс заражения растений пшеницы возбудителем темно-бурой пятнистости привел к увеличению активности КАТ и ПО относительно контрольных незараженных растений, что свидетельствует о вовлечении антиоксидантных ферментов в инфекционный процесс.



а



б

Рис. 1. Влияние заражения *B. sorokiniana* листьев пшеницы, обработанных штаммами *B. subtilis* и их сочетаниями с СХ, на активность КАТ (а) (мкМоль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/мин/г сырой массы листьев) и ПО (б) (усл. ед./г сырой массы листьев): I – контроль зараженный; II – кж штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D+ВКМ В-2605D; III – кж штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D+ВКМ В-2605D+0.1 % СХ; IV – композиция: кж штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D+ВКМ В-2605D+0.1 % СХ; V – 0,1% СХ; VI – контроль незараженный.

Данные экспериментов выявили временные различия в повышении активности антиоксидантных ферментов в процессе развития болезни (рис. 2, 3). На 1-е сутки в зараженных патогеном листьях пшеницы наблюдался резкий подъем активности КАТ с постепенным её понижением на 4-е сутки. Максимальное (10–кратное) увеличение активности ПО по отношению к незараженному контролю наблюдалось на 3-и сутки после заражения, когда проявились четкие признаки заболевания в виде коричневых пятен.

Выявлено, что активность КАТ и ПО, в предварительно обработанных штаммами бацилл и их сочетаниями с СХ и зараженных растениях, также возрастала. Однако их уровень был ниже, чем в контрольных зараженных растениях.

Так, на 3-и сутки опыта в растениях этих вариантов активность ПО была выше в 5.0–6.0 раз по отношению к незараженному контролю, что значительно ниже зараженного.

По-видимому, более низкая активность КАТ и ПО в листьях растений, обработанных штаммами *B. subtilis* в сочетании с СХ обусловлена ингибирующим действием на ферменты содержащегося в них СХ.

Следовательно, можно предположить, что более низкая активность КАТ и ПО, регулирующих количество  $H_2O_2$  в обработанных и инфицированных растениях, ведет к её накоплению в тканях, в количестве необходимом для обезвреживания фитопатогена, и к сдерживанию его распространения в период биотрофной стадии. При этом также происходит включение защитных реакций и развитие индуцированной устойчивости в растениях пшеницы к темно-бурой пятнистости, что проявляется в снижении болезни на 20–45 % по отношению к контролю (табл.).

Исследования показали, что механизмы повышения устойчивости растений пшеницы к *B. sorokiniana* связаны с активацией антиоксидантных ферментов КАТ и ПО. Косвенно наше предположение подтверждается исследованиями Яруллиной и др. (2022) [12], которые показали, что обработка растений картофеля штаммом *B. subtilis* совместно с хитоолигосахаридами сопровождается активацией КАТ, ПО, накоплением  $H_2O_2$  и транскриптов генов, кодирующих PR-белки, что ведет к развитию защитных реакций в растениях картофеля к возбудителю фитофтороза по пути индуцированной устойчивости.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности сочетания микроорганизмов-антагонистов возбудителей болезней растений и салицилата хитозана для повышения биологической эффективности и расширения спектра действия разрабатываемых биопрепаратов.

### Список литературы

1. Новикова И.И. Биологическое разнообразие микроорганизмов – основа для создания новых полифункциональных биопрепаратов для фитосанитарной оптимизации агроэкосистем // Вестник защиты растений. 2016. Т. 83, № 3. С. 120–122.
2. Павлюшин В.А., Тютюрев С.Л., Новикова И.И., Попова Э.В. Новые препараты для комплексной защиты растений от болезней разной этиологии // Доклады РАСХН. 2004. № 6. С. 17–21.
3. Павлюшин В.А., Тютюрев С.Л., Попова Э.В., Новикова И.И., Быкова Г.А., Домнина Н.С. Новые комплексные биопрепараты для защиты овощных культур от грибных и бактериальных болезней // Биотехнология. 2010. № 4. С. 69–80.
4. Колесников Л.Е., Новикова И.И., Сурин В.Г., Попова Э.В., Прияткин Н.С., Колесникова Ю.Р. Оценка эффективности совместного применения хитозана и микробов-антагонистов в

- защите яровой мягкой пшеницы от болезней с использованием спектрометрического анализа // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54, № 5. С. 546–552. DOI: 10.1134/S0555109918050082.
5. Yin H, Li Y, Zhang HY, Wang WX, Lu H, Grevsen K, Zhao X, Du Y. Chitosan oligosaccharides–triggered innate immunity contributes to oilseed rape resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* // Int. J. Plant Sci. 2013. Vol. 174, N 4. P. 722–732. DOI: 10.1086/669721.
6. Deepmala K., Hemantaranjan A., Bharti S., Nishant Bhanu A. A future perspective in crop protection: chitosan and its oligosaccharides // Advances in Plants & Agriculture Research. 2014. Vol. 1, N 1. P. 23–30. DOI: 10.15406/apar.2014.01.00006.
7. Radhakrishnan R., Shim K.B., Lee B.W., Hwang C.D., Pae S.B., Park C.H., Kim S.U., Lee C.K., Baek I.Y. Effects of chitin and salicylic acid on biological control activity of *Pseudomonas* spp. against damping off of pepper // J. Microbiol. Biotechnol. 2013. Vol. 23, N 6. P. 856–863. DOI: 10.4014/jmb.1209.09045.
8. Kang S.M, Radhakrishnan R., Lee I.J. *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* GR53, a potent biocontrol agent resists *Rhizoctonia* disease on Chinese cabbage through hormonal and antioxidants regulation // World J. Microbiol. Biotechnol. 2015. Vol. 31, N 10. P. 1517–1527. DOI: 10.1007/s11274-015-1896-0.
9. Попова Э.В., Домнина Н.С., Сокорнова С.В., Коваленко Н.М., Тютюрев С.Л. Инновационные гибридные иммуномодуляторы растений на основе хитозана и биоактивных антиоксидантов и прооксидантов // Сельскохозяйственная биология. 2021. Т. 56, N 1. С. 158–170. DOI: 10.15389/agrobiology.2021.1.158rus.
10. Новиков Н.Н., Таразанова Т.В. Лабораторный практикум по биохимии растений: Учебное пособие. – М.: Издательство РГАУ–МСХА имени К.А.Тимирязева. 2012. 97 с.
11. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Агропромиздат. 1987. 430 с.
12. Яруллина Л.Г., Бурханова Г.Ф., Цветков В.О., Черепанова Е.А., Заикина Е.А., Сорокань А.В, МаксUTOва В.О., Калацкая Ж.Н., Максимов И.В. Стимулирование защитных механизмов *Solanum tuberosum* бактериями *Bacillus subtilis* и хитоолигосахаридами при инфицировании *Phytophthora infestans* // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58, № 2. С. 185–194. DOI: 10.31857/S0555109922020179.

# ПОВЫШЕНИЕ ПРОДУКТИВНОСТИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ И ОПТИМИЗАЦИЯ ФИТОСАНИТАРНОГО СОСТОЯНИЯ ЕЕ ПОСЕВОВ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS* И САЛИЦИЛАТА ХИТОЗАНА

И.И. Новикова<sup>1</sup>, Л.Е. Колесников<sup>2</sup>, Э.В. Попова<sup>1</sup>,  
Хассан Башар Абд Хассан<sup>3</sup>, Н.С. Прияткин<sup>4</sup>, Д.Ю. Радишевский<sup>2</sup>,  
И.Л. Краснобаева<sup>1</sup>, Л.А. Хигерович<sup>1</sup>, Ю.Р. Колесникова<sup>5</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,  
лаборатория микробиологической защиты растений,  
ш. Подбельского, дом 3, Пушкин, Санкт-Петербург, 196608, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный аграрный университет, факультет  
агротехнологий, почвоведения и экологии, кафедра защиты и карантина растений,  
Петербургское шоссе, дом 2, Пушкин, Санкт-Петербург, 196601, Россия

<sup>3</sup> Ministry of Agriculture, Agricultural Research Office,  
Abo-Ghraib, St. Al-Zaytun, H., Baghdad, 10081, Iraq

<sup>4</sup> ФГБНУ Агрофизический научно-исследовательский институт,  
Гражданский проспект, дом 14, Санкт-Петербург, 195220, Россия

<sup>5</sup> ФГБНУ ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений  
им. Н.И. Вавилова, улица Большая Морская, дом 42–44,  
Санкт-Петербург, 190000, Россия E-mail: kleon9@yandex.ru

Зерновое производство исторически является основой устойчивого функционирования национального агропродовольственного сектора и служит своеобразным индикатором экономического благополучия государства [1]. В последнее время ежегодное производство зерна в мире составляет 729 млн тонн, из них 95 % приходится на долю мягкой пшеницы [2]. В современных условиях аграрному производству требуется разработка новых ресурсосберегающих агротехнологий, основанных на использовании инновационных микробиологических средств регуляции роста и защиты растений. Это позволит, в частности, восстановить и поддержать микробиологическую активность почвы антропогенно-трансформированных территорий, повысить продуктивность агроэкосистем и оптимизировать фитосанитарное состояние посевов [3, 4].

Одним из перспективных направлений в области защиты растений является возможность реализации принципа самозащиты растений от вредных организмов. Контроль ограничения численности вредных организмов в этом случае достигается путем управления обменом веществ растений с помощью биологически активных соединений [5]. Химические средства защиты растений необходимо применять только при массовом развитии возбудителей болезней, превышающем экономический порог вредоносности. При этом следует отметить, что в условиях холодного климата они могут быть малоэффективны, что связано с замедлением химических реакций и медленной деградацией пестицидов [6].

В настоящее время важнейшим элементом современных биологизированных технологий фитосанитарной оптимизации агроэкосистем являются микробиологические препараты. Большинство их основано на селективных штаммах бактерий, в том числе, относящихся к



роду *Bacillus Cohn*. Бактерии широко распространены в природе и обитают в ризосфере, обладают способностью эффективно защищать растения от широкого спектра фитопатогенов, в том числе посредством индуцирования системной устойчивости к ним за счет синтеза липопротеидов, этилена, полиаминов и веществ гормонального происхождения [7]. Повысить эффективность биопрепаратов возможно, включив в состав их препаративной формы синтетические активаторы болезнеустойчивости – хитозан и салициловую кислоту [8]. Молекулы хитозана структурно аналогичны компонентам клеточных стенок патогенных грибов [9, 10].

Целью настоящей работы являлась оценка эффективности применения полифункциональных комплексов на основе штаммов *B. subtilis* и 0,1 % салицилата хитозана в отношении морфометрических показателей продуктивности мягкой пшеницы и снижения её поражаемости особо опасными возбудителями болезней.

Место проведения работы – лаборатория микробиологической защиты растений ФГБНУ ВИЗР, кафедра защиты и карантина растений ФГБОУ ВО СПбГАУ.

Объектом исследования являлись бактериальные штаммы *B. subtilis* И-5, *B. subtilis* ВКМ В-2604D и *B. subtilis* ВКМ В-2605D (Государственная коллекция фитопатогенных микроорганизмов и их вредителей ФГБНУ ВИЗР), проявляющие высокую антагонистическую активность в отношении тест-культур фитопатогенных грибов и бактерий. Растительным материалом исследования послужил сорт мягкой пшеницы яровой Ленинградская 6, к-64900.

Схема полевого опыта предусматривала следующие варианты: контроль (вода); «Витаплан, СП» (стандарт); культуральная жидкость (КЖ) штамма *B. subtilis* И-5; КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и *B. subtilis* ВКМ В-2605D при соотношении 1:1 (КЖ *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D); полифункциональный комплекс «*B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1 % СХ»; полифункциональный комплекс «*B. subtilis* И-5 + 0.1 % СХ». Проведение опыта предусматривало обработку семян пшеницы перед посевом и трехкратное опрыскивание препаратами вегетирующих растений. Влияние микробиологических препаратов и полифункциональных комплексов на фитометрические и фитопатологические характеристики посевов пшеницы описывали величинами их относительного изменения к контролю (%), в том числе с учетом данных статистики Стьюдента. Кроме того, при интерпретации различий по вариантам опыта рассчитывали биологическую эффективность бактериальных штаммов (БЭ) по формуле Аббота:

$$\text{БЭ} = \frac{R_K - R_B}{R_K} 100,$$

где  $R_K$  и  $R_B$  – развитие болезни или дополнительные фитопатологические характеристики патогенеза (число пустул, пятен и т.п.), определенные в контроле и опытном варианте [11]. Подробное описание методов учета фитопатологических и фитометрических показателей посевов пшеницы приведено в работе [12].

По сравнению с контролем наибольшее увеличение биологической урожайности  $Y_b$  (с одного растения, г/растение) на 69–93 % и потенциальной урожайности пшеницы  $Y_w$  (с единицы площади, т/га) на 86–92 % зарегистрировано при применении полифункциональных комплексов: *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1 % СХ», «*B. subtilis* И-5 + 0.1 % СХ», а также в варианте «*B. subtilis* И-5». При использовании биопрепарата «Витаплан, СП» увеличение урожайности составило:  $Y_b = 42,7$  % и  $Y_w = 44,1$  % (рис. 1).

При применении полифункциональных комплексов выявлен максимальный рост в значениях следующих морфометрических показателей по сравнению с другими вариантами

опыта: «*B. subtilis* И–5 + 0.1 % СХ» – число первичных корней (на 39,6 %); число узловых корней (на 54,7 %); длина узловых корней (на 21,8 %); продуктивная кустистость (на 57,3 %); число колосков в колосе (на 6,6 %); «*B. subtilis* ВКМ В–2604D + ВКМ В–2605D + 0.1 % СХ» – масса зерен одного колоса (на 18,8 %) с меньшим на 0,9 % числом пустых колосков в колосе. Определено существенное увеличение (на 15,1 %) массы зерен в колоске колоса при применении полифункционального комплекса «*B. subtilis* ВКМ В–2604D + ВКМ В–2605D + 0.1 % СХ», а также в варианте опыта со штаммом *B. subtilis* И–5 – на 15,5 %. Снижение показателя на 14,2 % выявлено при применении полифункционального комплекса «*B. subtilis* И–5 + 0.1 % СХ». Существенный рост числа зерен в колоске колоса на 10,8 % отмечен в варианте «*B. subtilis* И–5», тенденция роста на 3,8 % – в варианте «*B. subtilis* ВКМ В–2604D + ВКМ В–2605D + 0.1 % СХ».

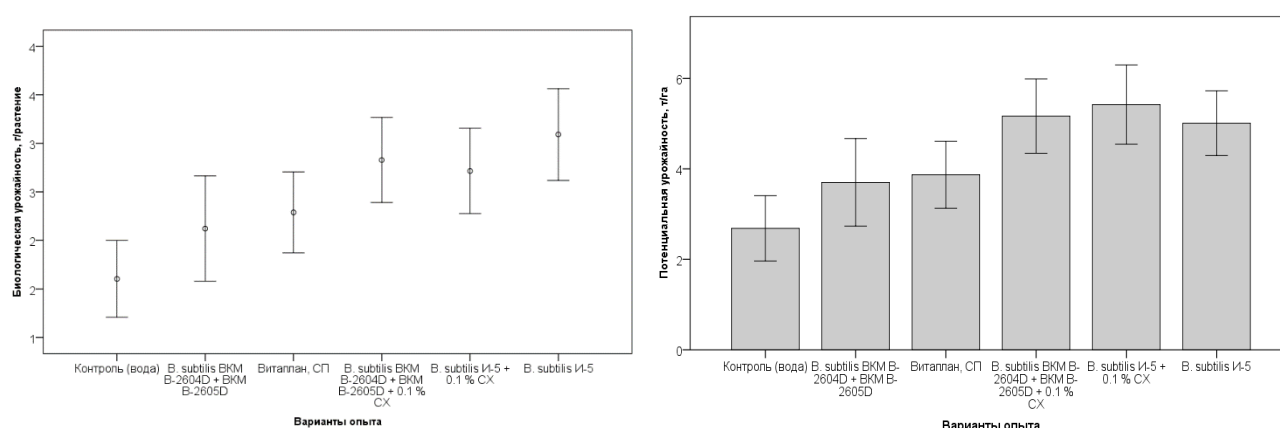


Рис. 1. Биологическая и потенциальная урожайность мягкой пшеницы при использовании бактериальных штаммов *B. subtilis* и полифункциональных комплексов с 0,1 % салицилатом хитозана. 2022 г.

Во всех вариантах опыта с использованием микробиологических препаратов и полифункциональных комплексов отмечено существенное снижение интенсивности развития желтой ржавчины на посевах пшеницы. Наибольшей биологической эффективностью в отношении болезни отличался полифункциональный комплекс «*B. subtilis* ВКМ В–2604D + ВКМ В–2605D + 0.1 % СХ», а также бактериальные штаммы *B. subtilis* ВКМ В–2604D, *B. subtilis* ВКМ В–2605D, биопрепарат «Витаплан, СП» (рис. 2). В указанных вариантах опыта по сравнению с контролем развитие желтой ржавчины снизилось на 21–22 % (БЭ=72–73 %). При использовании полифункционального комплекса «*B. subtilis* И–5 + 0.1 % СХ» развитие болезни снизилось на 18,5 % относительно контроля (БЭ=62,7 %), а в варианте опыта с *B. subtilis* И–5 – на 18,8 % (БЭ=63,7 %).

Биологическая эффективность полифункциональных комплексов «*B. subtilis* ВКМ В–2604D + ВКМ В–2605D + 0.1 % СХ» и «*B. subtilis* И–5 + 0.1 % СХ» в отношении поражаемости пшеницы возбудителем мучнистой росы составило 92,8 %, а развитие болезни снизилось на 12,8 %. Выявлена тенденция снижения интенсивности развития корневой гнили пшеницы в вариантах опыта: «Витаплан, КЖ» – на 5,9 %; «*B. subtilis* И–5 + 0.1 % СХ» – на 7,7 %; «*B. subtilis* ВКМ В–2604D + ВКМ В–2605D + 0.1 % СХ» – на 10,8 %; *B. subtilis* И–5 – на 11,3 %.

Согласно полученным результатам, полифункциональные комплексы на основе селективированных штаммов *B. subtilis* и салицилата хитозана существенно влияли на увеличение урожайности пшеницы, рост большинства морфометрических показателей продуктивности, снижали интенсивность развития болезней. Результаты работы могут быть

использованы для разработки ресурсосберегающей технологии возделывания пшеницы и оптимизации фитосанитарного состояния агроэкосистем.

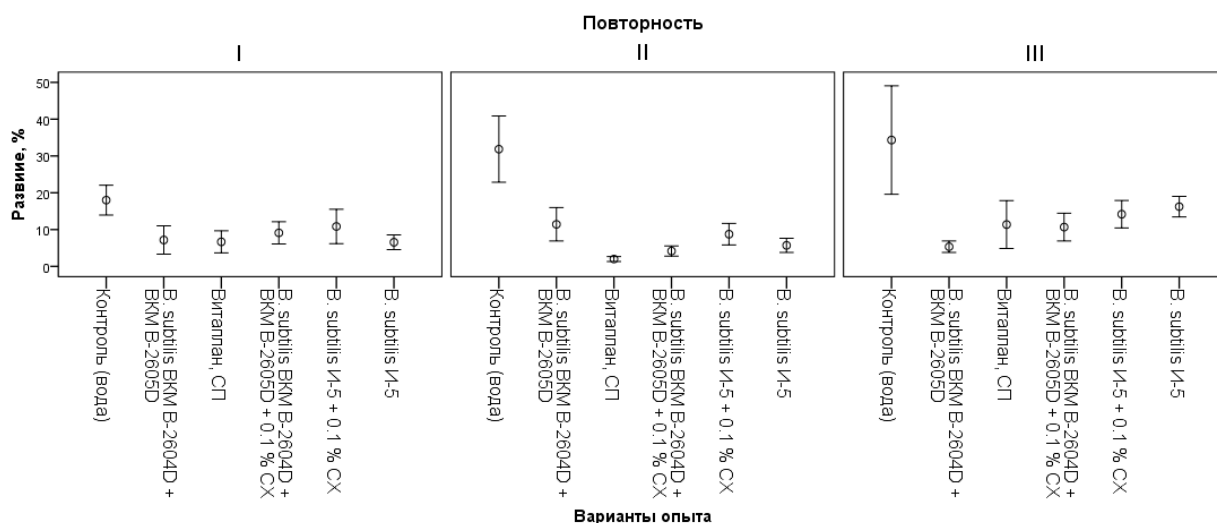


Рис. 2. Интенсивность развития желтой ржавчины пшеницы при использовании бактериальных штаммов *B. subtilis* и полифункциональных комплексов с 0,1% салицилатом хитозана. 2022 г.

### Список литературы

1. Зиятдинова Э.Ф. Тенденция производства зерна в Российской Федерации // Вестник Казанского государственного аграрного университета. 2012. Т. 7, № 3 (25). С. 16–19.
2. Узиков Г.О. Влияние технологий возделывания на элементы урожайности зерновых культур // Инновационная наука. 2020. № 4. С. 81–83.
3. Павлюшин В.А., Новикова И.И., Бойкова И.В. Перспективы и возможности микробиологической защиты растений для повышения уровня экологической безопасности в агроценозах (обзор) // Защита и карантин растений. 2022. № 4. С. 10–18.
4. Полевая оценка эффекта обработки семян яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) биологическими препаратами / А.А. Мартынов, Н.А. Боме, В.А. Юркова, Д.А. Базюк // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2023. № 1. С. 44–56.
5. Илларионов А.И., Деркач А.А. Иммунологический метод защиты растений: современное состояние и перспективы его практического использования // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. 2022. Т. 15, № 3 (74). С. 65–78.
6. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects / A. Basu, P. Prasad, S. Das, S. Kalam, R. Sayyed, M. Reddy, H.El. Enshasy. // Sustainability. 2021. № 13. P. 1–20.
7. Пашкевич Е.Б. Биологическое обоснование создания и особенности применения биопрепаратов, содержащих *Bacillus subtilis* для защиты растений от фитопатогенов // Проблемы агрохимии и экологии. 2009. № 2. С.41–47.
8. Биологическое обоснование использования индукторов устойчивости на основе хитозана для повышения эффективности биофунгицидов / И.И. Новикова, Э.В. Попова, И.Л. Краснобаева, Н.М. Коваленко // Сельскохозяйственная биология. 2021. Т. 56, № 3. С. 511–522.
9. Инновационные гибридные иммуномодуляторы растений на основе хитозана и биоактивных антиоксидантов и прооксидантов / Э.В. Попова, Н.С. Домнина, С.В. Сокорнова, Н.М. Коваленко, С.Л. Тютюрев // Сельскохозяйственная биология. 2021. Т. 56, № 1. С. 158–170.

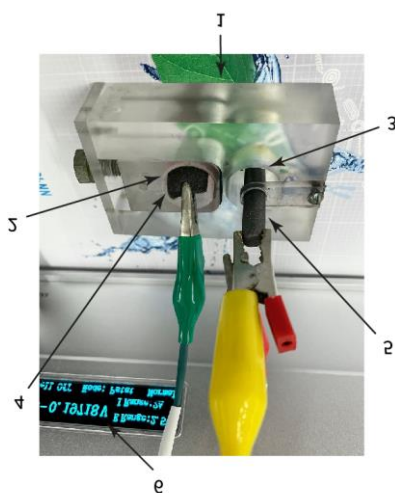
10. A. Uthairatanakij, J. Teixeira da Silva, K. Obsuwan chitosan for improving orchid production and quality // *Orchid Science and Biotechnology*. 2007. N 1. P. 1–5.
11. W. Abbott W. Method of computing the effectiveness of an insecticide // *Econ. Entomol.* 1968. Vol. 8. P. 265–267.
12. L.E. Kolesnikov, I.E. Razumova, D.Y. Radishevskiy, N.S. Priyatkin, M.V. Arkhipov, Y.R. Kolesnikova Influence of the structural and functional characteristics of the seeding material on the yield structure elements and resistance to leaf diseases of spring soft wheat // *Agronomy Research*. 2021. Vol. 19, N 4. P. 1791–1812.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАТРИЦ ГИДРОГЕЛЯ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА ДЛЯ АНОДНОГО И КАТОДНОГО ПРОСТРАНСТВ В БИОТОПЛИВНОМ ЭЛЕМЕНТЕ

**В.В. Федина, С.В. Алферов**

*ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, НИЦ «БиоХимТех», лаборатория  
экологической и медицинской биотехнологии, улица Фридриха Энгельса, дом 157,  
Тула, 300012, Россия  
E-mail: agarovaweronica@yandex.ru*

Биотопливный элемент (БТЭ) – это устройство, способное производить электрическую энергию за счёт использования микроорганизмов или ферментов в качестве биокатализаторов, при этом окисляя некоторые органические или неорганические вещества. Система биотопливного элемента включает анодное и катодное пространства, где размещают электроды, выпаленные из графита или другого инертного электропроводящего материала (рис. 1).



*Рис. 1. Схема биотопливного элемента, где 1 – корпус биотопливной ячейки; 2 – анодное пространство; 3 – катодное пространство; 4 – анод (графитовый войлок); 5 – катод (графитовый стержень); 6 – потенциостат [1]*

В анодное пространство помещали электрод из графитового войлока, т.к. благодаря его структуре биокатализатор закрепляется на поверхности электрода и не вымывается с течением времени [2]. В качестве биоматериала для анода использовали мембранные фракции бактерий

*Gluconobacter oxydans*. Такие структуры содержат в себе PQQ-зависимые дегидрогеназы, благодаря которым возможно широкое окисление субстратов, что говорит об актуальности их использования.

Для лучшего закрепления биокатализатора используют токопроводящую матрицу, благодаря которой биоматериал закрепляется на электроде и не вымывается в течение длительного времени. В последние несколько лет такому полимеру, как хитозан, уделяется большое внимание [3], т.к. он является достаточно распространённым материалом для иммобилизации микроорганизмов, в том числе при разработке биоэлектрохимических систем [4]. В данной работе использовали матрицу гидрогеля на основе хитозана с многостенными углеродными нанотрубками. Хитозан – это полимер, который изначально не обладает электрической активностью, но способен образовывать биосовместимый гидрогель, а также с легкостью осуществлять различные модификации с использованием широкого спектра биологически активных компонентов, за счёт высокой химической активности [5]. Также стоит отметить, что благодаря этому природному полимеру питательные вещества и кислород поступают в биокатализатор без ограничений, при этом оказывая положительное влияние на долгосрочную стабильность БТЭ [6].

Для катодного пространства на электроде закрепляли лакказы бактерий *Streptomyces carpinensis* (His/Trp). Лакказы – это ферменты, относящиеся к классу оксидаз, благодаря которым на катоде происходит реакция восстановления кислорода, где в качестве конечного продукта образуется вода. Благодаря их использованию увеличивается скорость переноса электронов и повышаются мощностные характеристики БТЭ. Бактериальные лакказы закрепляли на графитовом стержне двумя способами: с помощью гидрогеля на основе хитозана и белковой плёнки бычьего сывороточного альбумина (БСА). С помощью БСА формируют природную, нетоксичную, биосовместимую и биоразлагаемую матрицу, сшивая его с бифункциональными агентами [7].

При формировании макета БТЭ, где на катоде закрепляли бактериальные лакказы матрицей на основе хитозана, получали следующие значения энергетических характеристик БТЭ: генерируемый потенциал в режиме замкнутой цепи составил  $150 \pm 4$  мВ, внутреннее сопротивление  $5,7$  кОм, удельная мощность была равна  $1,12 \cdot 10^{-4}$  Вт/м<sup>2</sup>. При использовании для закрепления лакказ белковой плёнки бычьего сывороточного альбумина, энергетические характеристики составили: генерируемый потенциал в режиме замкнутой цепи равен  $155 \pm 4$  мВ, внутреннее сопротивление  $4,0$  кОм, удельная мощность была равна  $0,55 \cdot 10^{-4}$  Вт/м<sup>2</sup> (рис. 2).

Таким образом, при использовании матрицы гидрогеля на основе хитозана на катоде повышаются мощностные характеристики БТЭ в 2 раза, по сравнению с белковой плёнкой БСА. Закрепляя биоматериал на электроде токопроводящей матрицей на основе хитозана, либо используя его как обычный полимер в качестве матрицы для иммобилизации, без вспомогательных компонентов, мощностные характеристики БТЭ повышаются. Белковая плёнка БСА является не стойкой и подвержена к деградации, т.е. в процессе измерения она быстро вымывается с электрода, что приводит к ухудшению энергетических параметров БТЭ. При закреплении биокатализаторов, в данном случае мембранных фракций бактерий *Gluconobacter oxydans* и лакказ бактерий *Streptomyces carpinensis* (His/Trp), матрицей на основе хитозана, энергетические характеристики БТЭ увеличиваются, за счёт того, что биоматериал равномерно распределяется в геле и не формирует конгломераты, т.е. не пытается минимизировать контакт с используемой матрицей [8].

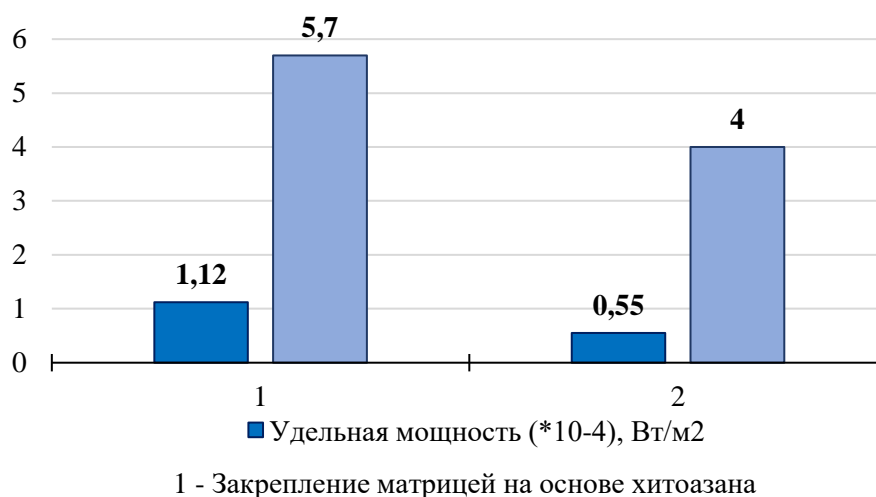


Рис. 2. Энергетические характеристики макетов БТЭ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания в области научной деятельности проект № FEWG-2021-0013 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).

#### Список литературы

1. V. Fedina et al. Polymer-based conductive nanocomposites for the development of bioanodes using membrane-bound enzyme systems of bacteria *Gluconobacter oxydans* in biofuel cells // *Polymers*. 2023. Vol. 15, N 5. # 1296.
2. L.F. Castañeda et al. Graphite felt as a versatile electrode material: properties, reaction environment, performance and applications // *Electrochimica Acta*. 2017. Vol. 258. P. 1115–1139.
3. S.D. Duttagupta, M.V. Jadhav, J.V. Kadam Chitosan: a propitious biopolymer for drug delivery // *Curr. Drug Deliv*. 2015. Vol. 12, N 4. P. 369–381.
4. Y. Plekhanova et al. Effects of polymer matrices and carbon nanotubes on the generation of electric energy in a microbial fuel cell // *Membranes*. 2018. Vol. 8, N 4. # 99.
5. J.P. Chen, S.H. Chen, G.J. Lai. Preparation and characterization of biomimetic silk fibroin/chitosan composite nanofibers by electrospinning for osteoblasts culture // *Nanoscale Research Letters*. 2012. Vol. 7. P. 1–11.
6. Y. Yuan et al. Nanostructured macroporous bioanode based on polyaniline-modified natural loofah sponge for high-performance microbial fuel cells // *Environ. Sci. Technol*. 2013. Vol. 47, N 24. P. 14525–14532.
7. Z. Yang et al. Engineered bovine serum albumin-based nanoparticles with pH-sensitivity for doxorubicin delivery and controlled release // *Drug Delivery*. 2020. Vol. 27, N 1. P. 1156–1164.
8. Y. Plekhanova et al. Effects of polymer matrices and carbon nanotubes on the generation of electric energy in a microbial fuel cell // *Membranes*. 2018. Vol. 8, N 4. #. 99.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИДРОЛИЗАТОВ ВТОРИЧНОГО ХИТИНСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ В АКВАКУЛЬТУРЕ

**О.Я. Мезенова, С.В. Агафонова, Н.Ю. Романенко, Н.Ю. Калинина, В.В. Волков**  
*ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет,  
Калининград, 236022, Россия  
E-mail: mezenova@klgtu.ru*

Россия является лидером по добыче камчатских крабов и северных креветок, мясо которых пользуется высоким спросом. Однако после разделки данного сырья остается до 50 % массы хитинсодержащих отходов, которые практически не используются. Одна из причин этого заключается в отсутствии современных технологий, учитывающих свойства данного сырья. Отходы от разделки крабов и креветок представляют собой ценный органический материал, содержащий белки, пептиды и аминокислоты, липиды с полиненасыщенными жирными кислотами, углеводы гликоген и хитин, минеральные вещества, каротиноиды [1–3]. Актуально проанализировать химический состав и свойств данного сырья, обосновать рациональные технологии переработки и направления использования.

В КГТУ разработана технология переработки хитинсодержащих отходов высокотемпературным способом с получением пептидно-протеиновых водорастворимых гидролизатов и белково-минеральных нерастворимых добавок, пригодных для использования в комбикормах для рыб в аквакультуре [4].

Полученные по данной технологии добавки из коллагенсодержащих копченых рыбных отходов (головы копченой кильки) успешно апробированы в биологических испытаниях по выращиванию лососевых в составе комбикормов [5–6]. Представляется перспективным использование данной технологии для переработки вторичного крабового сырья с получением протеиновых добавок для включения в состав кормов для аквакультуры.

В работе применяли лабораторные методы исследования по стандартным и общепринятым методикам. Отходы от разделки камчатских крабов были предоставлены ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет» (карапакс, абдомен, гепатопанкреас, панцирь). Отходы от разделки креветки белоногой *Penaeus vannamei* в виде головогруды предоставлены рыбоперерабатывающим предприятием ООО "Вичюнай-Русь" (Калининградская область)

Хитинсодержащие отходы перерабатывали двумя способами. Первый способ основан на высокотемпературном гидролитическом воздействии измельченного сырья при температуре 130°C под давлением 1,35 бар в течение 1–3 ч. В результате глубокой деструкции сырья в органической системе происходило образование сложной дисперсии. Центрифугированием смеси при 3 900 об./мин проводили разделение дисперсии с получением трех фракций – жировой (верхней), водорастворимой (средней) и водонерастворимой (осадочной). При радиусе ротора 12,0 см и скорости его вращения 3 900 об./мин относительное ускорение центрифуги составило 2 200 (в единицах g). Водорастворимую фракцию подвергали сублимационному высушиванию на установке Martin Christ Alpha1–2 LDplus при температуре –55°C до содержания воды 5–6 %. Водонерастворимую фракцию обезвоживали конвекционно при 70–75°C в сушильном шкафу ШС-80–02 до содержания воды 10–12 %.

Второй способ был ферментативный, который осуществляли в водной нейтральной среды с применением протеолитических ферментов Alcalase 2,5L и коллагеназы.

Таблица 1

**Химический состав вторичного крабового сырья  
и продуктов его термического гидролиза**

Объект исследования	Химический состав ХСС, % массы				
	Вода	Углеводы (в т.ч. хитин)	Жир	Минеральные вещества	Протеины
<b>Крабовые отходы</b>					
Крабовые отходы (карапакс, внутренности), мороженые	72,7–75,7	1,9–2,3	1,3–1,8	8,2–8,4	15,5–16,7
<b>Продукты термического гидролиза крабовых отходов</b>					
ППД <sup>1</sup> из крабовых отходов	7,7–8,2	3,2–4,7	0,1–0,2	5,8–6,3	76,9–82,7
БМД <sup>2</sup> из крабовых отходов	12,5–13,8	5,2–7,2	0,3–1,3	34,28–39,6	34,6–45,3

*Примечание:* <sup>1</sup>ППД – пептидно-протеиновая добавка; <sup>2</sup>БМД – белково-минеральная добавка

Общий химический состав креветочных отходов и полученных из них продуктов гидролиза приведен в табл. 2.

Таблица 2

**Химический состав креветочных отходов и продуктов его термического  
и ферментативного гидролиза**

Вид сырья	Химический состав, % массы				
	Вода	Углеводы (в т.ч. хитин)	Жир	Минеральные вещества	Протеины
Креветочные отходы (головогрудь), мороженые, невареные	75,3 ± 0,21	1,5 ± 0,12	1,2 ± 0,13	5,9 ± 0,21	18,7 ± 0,23
<b>Продукты термического гидролиза</b>					
Водорастворимая добавка	6,4 ± 0,11	2,1 ± 0,21	0,45 ± 0,11	19,2 ± 1,13	71,6 ± 1,03
Водонерастворимая добавка	11,1 ± 0,12	5,3 ± 0,32	1,5 ± 0,09	41,7 ± 1,68	30,4 ± 0,98
<b>Продукты ферментативного гидролиза с применением Alcalase 2,5L</b>					
Водорастворимая добавка	8,9 ± 0,14	6,2 ± 0,25	1,3 ± 0,11	14,3 ± 1,25	69,3 ± 1,27
Водонерастворимая добавка	12,0 ± 0,12	7,9 ± 0,17	2,4 ± 0,13	39,2 ± 1,12	38,5 ± 1,12
<b>Продукты ферментативного гидролиза с применением коллагеназы</b>					
Водорастворимая добавка	9,7 ± 0,15	6,5 ± 0,26	1,4 ± 0,16	15,8 ± 1,09	66,6 ± 1,76
Водонерастворимая добавка	12,9 ± 0,16	6,7 ± 0,18	2,4 ± 0,22	41,1 ± 1,22	36,9 ± 1,23

С учетом изученного биопотенциала вторичного крабового сырья и его гидролизатов [1–3] было рекомендовано использовать водорастворимую фракцию (высушенную пептидно-протеиновую фракцию) в составе комбикормов при выращивании радужной форели в



индустриальной аквакультуре в установках замкнутого водоснабжения (УЗВ) Испытания были проведены в ООО «Промкорма» (Калининградская область) в течение 56 суток (с 27.04.23 по 1.06.23), на молоди форели, предоставленной рыбоводной компанией ООО «Полекс-Аква» (средняя масса рыб 110 г). При этом в рецептуре стандартного корма (контрольная группа) 5 % рыбной муки было заменено на 5 % ППФ (экспериментальная группа). В сравнительных испытаниях по измерению масс рыб в конце экспериментов было установлено, что прирост массы в контрольной группе рыб составил 48,3 %, а в экспериментальной – 60 %, что свидетельствует о повышении коэффициента роста рыбы в последнем случае в 1,24 раза.

В биологических испытаниях по использованию крабовых гидролизатов в комбикормах форели, выращиваемой в индустриальной аквакультуре, была подтверждена эффективность и перспективность их получения и применения. Установлены повышенная усвояемость водорастворимых крабовых отходов вместо традиционной рыбной муки.

Анализ полученного аминокислотного состава водорастворимых гидролизатов показывает их близость, независимо от способа получения, по количественному и качественному составу аминокислот. Во всех образцах присутствуют практически все незаменимые аминокислоты, в том числе ценный лизин (4,5–6,1 г/100 г) при незначительном содержании триптофана (0,4–0,9 г/100 г). Преобладают аминокислоты аланин, аргинин, глицин, изолейцин, лизин, аспарагиновая кислота, тирозин, валин, причем их содержание установлено примерно на одинаковом уровне (3,3–6,4 г/100 г белка). Повышенное количество глицина (4,1–5,7 г/100 г) и пролина (1,8–2,7 г/100 г) свидетельствует о присутствии в сырье коллагеновых тканей, в составе которых преобладают данные аминокислоты. Установлено минимальное содержание гидроксипролина (0,1 г/100 г и менее), характерного для рыбного коллагена, что свидетельствует о разном строении коллагеновых белков рыб и креветочного сырья.

В результате проведенных исследований:

- показана рациональность переработки отходов от разделки крабов и креветки белоногой *Penaeus vannamei* методом глубокого гидролиза с применением высокотемпературного и ферментативного способов и получением водорастворимой и водонерастворимой фракций в форме высушенных добавок;

- установлен химический состав крабовых и креветочных отходов и продуктов их гидролиза. Показано высокое содержание белка в сырье. Высушенные водорастворимые продукты гидролиза содержат более 50 % протеинов. Более эффективно ферментативный гидролиз проходит при использовании фермента Alcalase 2,5L, чем коллагеназы;

- определен общий химический состав водонерастворимых продуктов гидролиза креветочных отходов; показано высокое содержание в нем белка и хитина;

- с учетом содержания в гидролизатах ценных биологически активных компонентов рекомендовано их применение в качестве пищевых и кормовых добавок;

- установлена биологическая эффективность применения водорастворимых крабовых гидролизатов в составе комбикормов при выращивании радужной форели; в сравнительных экспериментах доказана интенсификация роста мальков в 1,24 раза.

### Список литературы

1. Потенциал вторичных ресурсов камчатского краба как технологически ценного сырья / С.Н. Максимова, Д.В. Полещук, Е.В. Суровцева, К.К. Верещагина, А.В. Милованов // Пищевая промышленность. 2019. Т. 4, № 4. С. 30–36.

2. Подкорытова А.В., Строгова Н.Г., Семикова Н.В. Комплексная переработка камчатского краба при производстве пищевой продукции и биологически активных веществ // Труды ВНИРО. Серия «Технология переработки водных биоресурсов». 2018. Т. 172. С. 198–212.
3. Мезенова О.Я. Биопотенциал вторичного хитинсодержащего сырья и рациональные направления его использования // Известия КГТУ. 2023. № 69. С.74–88.
4. Способ получения пищевых добавок из вторичного рыбного сырья с применением гидролиза / Патент РФ № 2681352. Рос. Федерация. № 2018103795/10 / Мезенова О.Я., Агафонова С.В., Байдалинова Л.С., Городниченко Л.В., Волков В.В., Мезенова Н.Ю., Гримм Т., Хелинг А., заявл. 31.01.2018, опубл. 06.03.2019. Бюл. № 12. 18 с.
5. Проектирование сбалансированных кормов для индустриальной аквакультуры с применением протеиновых гидролизатов побочного рыбного сырья / О.Я. Мезенова, Д.С. Пьянов, С.В. Агафонова, Н.Ю. Мезенова, В.В. Волков // Рыбное хозяйство. 2021. № 4. С. 81–88.
6. Применение продуктов гидролиза шпротных отходов при кормлении европейского сига *Coregonus lavaretus* в аквакультуре / О.Я. Мезенова, Д.С. Пьянов, С.В. Агафонова, Н.Ю. Романенко, В.В. Волков, Н.С. Калинина // Рыбное хозяйство. 2022. № 3. С. 54–61.

## **ВЛИЯНИЕ N-(2-СУЛЬФОЭТИЛ)- И N-(2-КАРБОКСИЭТИЛ)ХИТОЗАНА НА ПРОРАСТАНИЕ И ПЕРВОНАЧАЛЬНЫЙ РОСТ РАСТЕНИЙ**

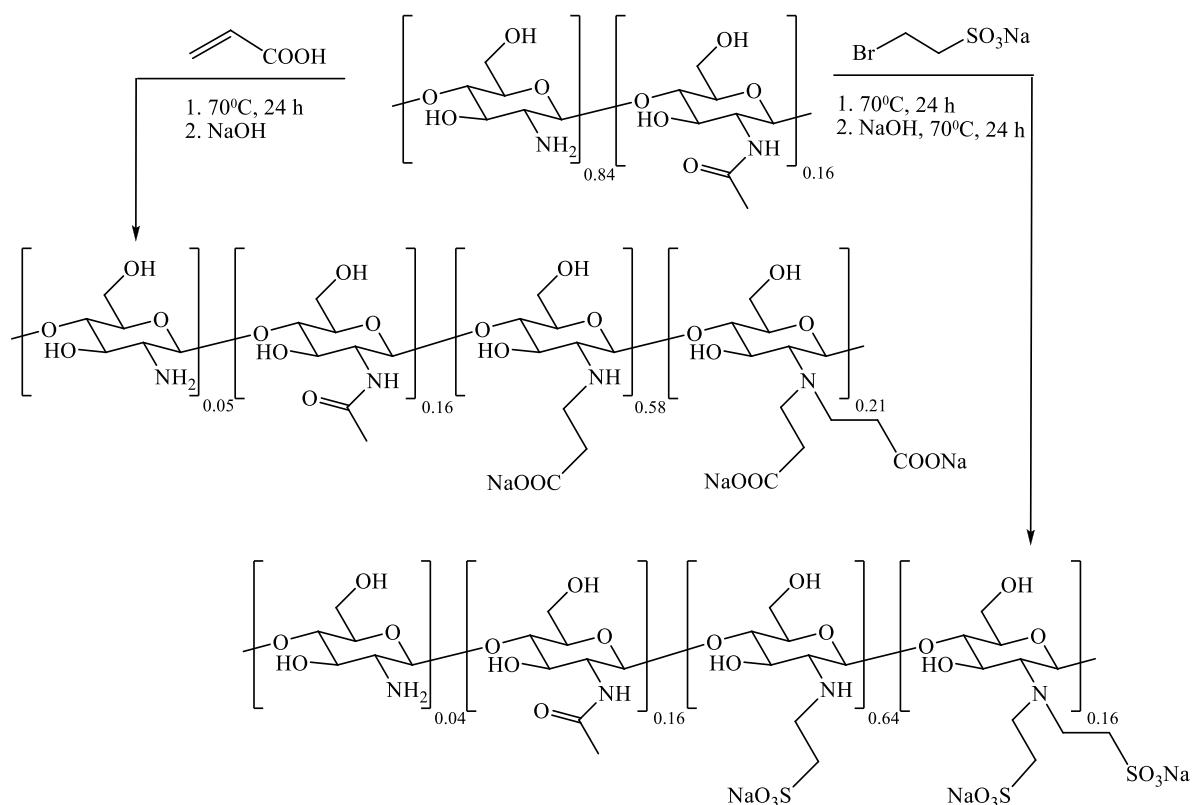
**Е.О. Землякова, А.В. Пестов**

*Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, ул. С. Ковалевской/Академическая, дом 20/22, Екатеринбург, 620108, Россия*  
*E-mail: kottazem@mail.ru*

Хитозан применяется в качестве компонента удобрений для овощных и плодовых культур, для домашних растений при корневом опрыскивании, внесении в почву, а также для покрытия семян и плодов. Аминополисахарид повышает устойчивость растений по отношению к биогенным и абиогенным факторам среды [1], а благодаря своей способности биodeградировать в окружающей среде выгодно отличается от большинства ростостимулирующих и антипатогенных препаратов, применяемых в агротехнологиях [2]. Хитозансодержащие препараты являются эффективными и востребованными ростостимуляторами, а также противомикробными, противовирусными и противогрибковыми средствами защиты сельскохозяйственных растений открытого грунта и тепличного выращивания. Кроме того, существует возможность утилизации отработанных сорбционных материалов на основе хитозана в качестве удобрения для растений [3].

Данная работа направлена на получение аминокислотных N-производных хитозана и оценку их влияния на прорастание семян и стимуляцию роста растений.

Синтез N-(2-сульфоэтил)хитозана (СЭХ) осуществляли путем обработки хитозана 2-бромэтансульфонатом натрия [4], а N-(2-карбоксиэтил)хитозан (КЭХ) – акриловой кислотой [5]. Состав и строение полученных полимеров охарактеризован данными элементного анализа, ИК- и ЯМР <sup>1</sup>H спектроскопии.



Исследования биологической активности N-(2-сульфоэтил)хитозана и N-(2-карбоксиэтил)хитозана проводились на семенах капусты краснокочанной *Brassica oleracea var. capitata f. rubra*, кабачка белоплодного *Cucurbita pepo var. giromontina* «Beloplodniy», кабачка «Аэронавт» *Cucurbita pepo var. giromontina* «Aeronavt» и тыквы крупноплодной «Россиянка» *Cucurbita maxima Duchesne*. В таблице представлены результаты оценки влияния КЭХ и СЭХ (концентрация в среде 1 мг/мл) на прорастания семян в течение 18 дней при 25°C.

Таблица

**Влияние КЭХ и СЭХ на прорастание семян**

Полимер	Количество проросших семян, %			
	Капуста краснокочанная	Кабачок белоплодный	Кабачок «Аэронавт»	Тыква
Контроль	90	95	45	95
КЭХ	97	95	75	95
СЭХ	77	80	95	90

Как следует из полученных данных, КЭХ оказывает активирующее влияние на прорастание семян капусты краснокочанной и кабачка «Аэронавт» по сравнению с контролем, а СЭХ активирует только прорастание семян кабачка «Аэронавт». Результаты прорастания семян капусты краснокочанной представлены на Рисунке.

В случае капусты краснокочанной КЭХ увеличивает прорастание семян на 7% по сравнению с контролем, однако СЭХ способствует росту растений, поскольку они обладают большей длиной на 17% и большей средней массой на 3% относительно контроля.

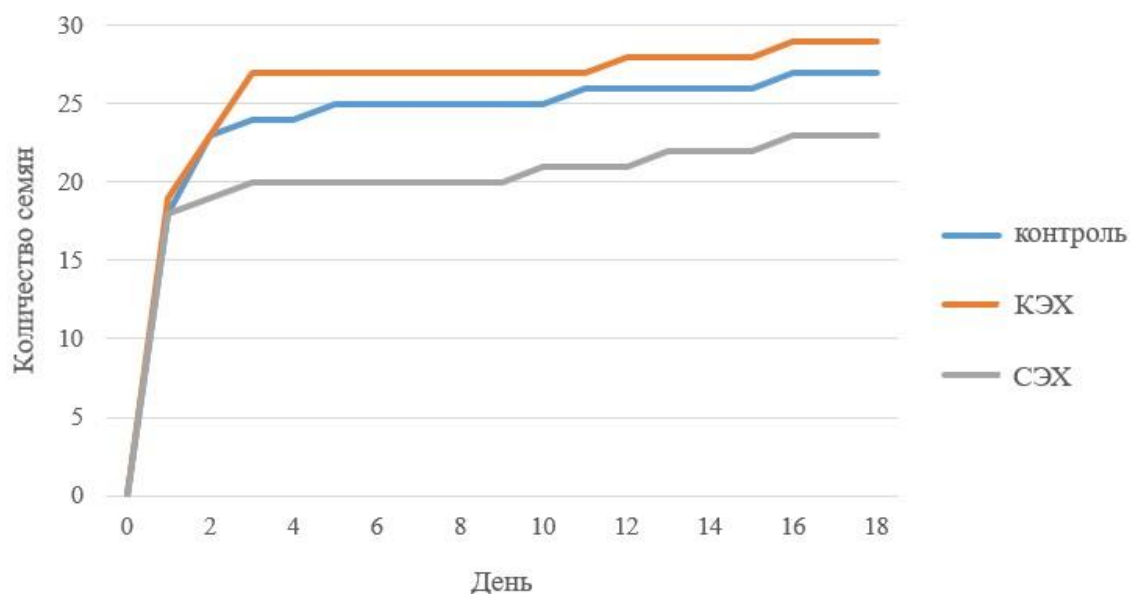


Рис. Изменение количества проросших семян капусты краснокочанной в зависимости от времени

Несмотря на то, что КЭХ и СЭХ не проявляют выраженного активирующего действия на прорастание семян кабачка белоплодного и тыквы, стоит отметить влияние полимеров на рост растений. Растения кабачков в присутствии СЭХ раньше сформировали корни и листики, а также набирали растительную массу быстрее. КЭХ оказывает аналогичное влияние на прорастание и рост кабачка «Аэронавт» и тыквы.

Таким образом, N-(2-карбоксиил)хитозан оказывает активирующее влияние на прорастание семян капусты краснокочанной *Brassica oleracea var. capitata f. rubra* и рост кабачка белоплодного *Cucurbita pepo var. giromontina «Beloplodniy»* и тыквы крупноплодной «Россиянка» *Cucurbita maxima Duchesne*. N-(2-сульфоэтил)хитозан способствует прорастанию кабачка «Аэронавт» *Cucurbita pepo var. giromontina «Aeronavt»* и росту капусты краснокочанной *Brassica oleracea var. capitata f. rubra* и кабачка белоплодного *Cucurbita pepo var. giromontina «Beloplodniy»*. При этом растения в присутствии КЭХ и СЭХ из-за более раннего формирования корневой системы начали образовывать первые цветы и плоды раньше, чем растения контрольных опытов. В результате следует заключить, что влияние аминокислотных N-производных хитозана на рост и развитие растений очень высокоспецифично не только в рамках систематики растений, но и в рамках видового разнообразия.

### Список литературы

1. Зими́на Ю.А., Срослова Г.А., Постнова М.В. Применение биопрепаратов на основе хитозана в сельском хозяйстве // Природные системы и ресурсы. 2018. Т. 8, № 3. С. 22–28.
2. Применение товарных форм хитозансодержащих препаратов в растениеводстве / В.П. Варламов, А.И. Албулов, М.А. Фролова, А.В. Гринь, И.С. Мысякина // Экобиотех. 2019. Т. 2, № 4. С. 529–532.
3. Политаева Н.А., Шайхиев И.Г. Утилизация отработанных сорбционных материалов на основе хитозана в качестве удобрения // Вестник технологического университета. 2016. Т. 19, № 16. С. 25–27.
4. Simple synthesis and chelation capacity of N-(2-sulfoethyl) chitosan, a taurine derivative / Yu.S. Petrova, L.K. Neudachina, A.V. Mekhaev, A.V. Pestov // Carbohydrate Polymers. 2014. Vol. 112. P. 462–468.

5. А.В. Пестов, Н.А. Журавлев, Ю.Г. Ятлук. Синтез в геле – новый метод получения карбоксиэтилхитозана // Журнал прикладной химии. 2007. Т. 80, № 7. С. 1184–1189.

## **ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА – СОРБЕНТЫ ДЛЯ ОЧИСТКИ ЖИДКИХ РАДИОАКТИВНЫХ ОТХОДОВ**

**Л.А. Земскова, Э.А. Токарь, А.И. Мацкевич, И.Д. Приймак, А.М. Егорин**

*Институт химии Дальневосточного отделения Российской академии наук,  
проспект 100-летия Владивостока, 159, Владивосток, 690022, Россия  
E-mail: zemskova@ich.dvo.ru*

Природный биополимер хитозан (ХТЗ), в числе других матриц (минеральных, полимерных, углеродных), широко применяется для иммобилизации наночастиц (НЧ) металлов и их оксидов. Это способствует крупномасштабному использованию наночастиц в водоподготовке, где неизбежно приходится сталкиваться с проблемами, связанными с применением НЧ, такими как агрегация, трудностью отделения НЧ от очищаемых растворов, попадания в экосистемы и неизбежное воздействие на здоровье человека [1, 2]. Полученные композиты являются перспективными кандидатами для развития следующих новых поколений технологий водоподготовки и очистки природных и сточных вод [2–7], а также новых сенсорных материалов [8, 9].

Кроме легкости модификации, как физической, так и химической, хитозан обладает рядом преимуществ для создания сорбентов: сырье для него доступно, является биоразлагаемым, нетоксичным по отношению к окружающей среде. ХТЗ является малозольным, что позволяет при сжигании существенно сократить объем отходов. Это преимущество играет роль особенно при утилизации отработанных сорбентов при переработке радиоактивных отходов. Кроме того, хитозан и композиты на его основе могут быть кондиционированы в различных формах: порошка, наночастиц, гранул геля, мембран, губок, волокон и полых волокон. Это открывает возможности получения сорбентов с широким набором физико-химических свойств и устройств для их применения [3, 7].

Синтез гибридных материалов может быть осуществлен двумя путями: диспергирование предварительно полученных или коммерческих НЧ оксидов металлов в хитозан в процессе осаждения полимера, или синтез наночастиц непосредственно в матрице полимера. Второй способ представляет больший интерес в связи с возможностью регулирования состава получаемых композитов, размера частиц, однородности, повышения устойчивости сорбционно активной составляющей [2].

В связи с выросшим значением ХТЗ в охране окружающей среды, сохраняется интерес к использованию биополимера в решении задач, связанных с проблемами переработки жидких радиоактивных отходов (ЖРО), содержащих радионуклиды, которые представляют потенциальную опасность для человека и окружающей среды [10, 11]. Среди радионуклидов наибольшую опасность для экосистем представляют  $^{134, 137}\text{Cs}$ ,  $^{90}\text{Sr}$ ,  $^{60}\text{Co}$ , U, Mn, Se, Am и другие трансурановые продукты деления урана [12]. Известно, что извлечение U упоминается как одно из биотехнологических применений ХТЗ [13], вместе с тем, хитозан не сорбирует ни цезий, ни стронций [3, 13]. Это требует применения селективных к этим

радионуклидам сорбентов, либо создания полифункциональных материалов, особенно для низкоактивных ЖРО при извлечении из растворов сложного химического состава [12].

Для создания гибридных сорбентов на основе ХТЗ в полимерную или другую матрицу иммобилизируют смешанные гексацианоферраты переходных металлов (Cu, Ni, Zn, Co), молибдаты, либо вносят оксиды/гидроксиды металлов (Fe, Ti, Ni) [14, 15]. Для удаления Cs стабильный интерес вызывают соединения смешанных гексацианоферратов щелочных и переходных металлов [16–19]. На извлечение Sr испытаны магнитные хитозан содержащие сорбенты [20–23]. Для извлечения Cs(I), Sr(II), Co(II), Eu(III) испытывали хитозан, содержащий оксид титана. Экспериментальные данные свидетельствуют, что модификация биополимера наночастицами оксида титана улучшает адсорбционные свойства исходного полимера [15]. Иммобилизация в хитозан Ni(OH)<sub>2</sub> не ухудшает емкостные характеристики ХТЗ по U(VI) [24].

*Целью данной работы* является разработка полифункционального сорбента на U и продукты его деления Cs и Sr путем осаждения гидроксида никеля в матрице ХТЗ, иммобилизации в сорбент смешанного K-Ni[Fe(CN)<sub>6</sub>] и исследование его сорбционных свойств.

Среди природных полисахаридов, таких как пектин, декстрин, агар, агароза, каррагенаны и целлюлоза, имеющих кислую природу, хитозан является высокоосновным полисахаридом [9]. Свойства ХТЗ в растворах зависят от молекулярной массы, степени деацетилирования, pH и ионной силы. Практически, для полностью нейтрализованных аминогрупп со степенью ацетилирования не более 50 % значение pK<sub>a</sub> всегда находится в диапазоне от 6,3 до 6,7 [9]. При pH 6,5 аминогруппы ХТЗ становятся депротонированными, в результате уменьшения заряда с возрастанием pH растворенный ХТЗ флокулирует при величинах pH около 6.

Это свойство используется для получения гибридных магнитных сорбентов на основе хитозановой матрицы [6, 7], или синтеза НЧ оксида никеля NiO, в котором хитозан используется в качестве темплата [25]. Синтез осуществляется путем внесения солей металлов (Fe, Ni) в раствор полимера с последующей нейтрализацией щелочью/или в щелочном растворе с формированием гранул.

Хитозан и Ni(OH)<sub>2</sub> могут служить платформой для создания полифункциональных сорбционных материалов. Благодаря близости pH осаждения хитозана (6,3...6,7) и Ni(OH)<sub>2</sub> (в интервале 6,7...7,7 в зависимости от концентрации) для получения сорбента может быть использован метод гомогенного осаждения в присутствии мочевины.

Известно, что мочевина при комнатной температуре в реакцию с солями металлов, находящимися в растворе, не вступает. Достаточно быстрое разложение мочевины начинается при температуре выше 60°C (333K) в соответствии с уравнением (1):



и приводит к постепенному высвобождению гидроксид-ионов с равномерным увеличением pH по всему объему раствора. Таким образом, мочевина, с одной стороны, действует как «отсроченное» основание, а с другой выступает в роли мягкого осадителя и комплексообразующего агента, обеспечивая осаждение без локальных пересыщений и суперпересыщений, и создает условия для гомогенного образования геля Ni(OH)<sub>2</sub> в присутствии геля ХТЗ.

Обработка полученной композиции гексацианоферратом калия K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> в присутствии в растворе не прореагировавшей соли никеля приводит как к замещению гексацианоферрат-

ионом присутствующих в межслоевом пространстве анионов, так и к формированию в системе «геля в геле» смешанного  $K-Ni[Fe(CN)_6]$  с образованием осадка. Коагулированный осадок промывают водой, сушат на воздухе и подвергают термообработке при  $100-105^\circ C$  с получением композитного сорбента  $XT3-Ni(OH)_2-K-Ni[Fe(CN)_6]$  [26].

Совокупность компонентов, входящих в состав сорбента, указывает на возможность извлечения с его помощью из растворов урана, цезия и стронция. Результаты испытаний сорбента по отношению к перечисленным элементам в  $0.1M$  растворе  $NaNO_3$  приведены на рисунке 1.

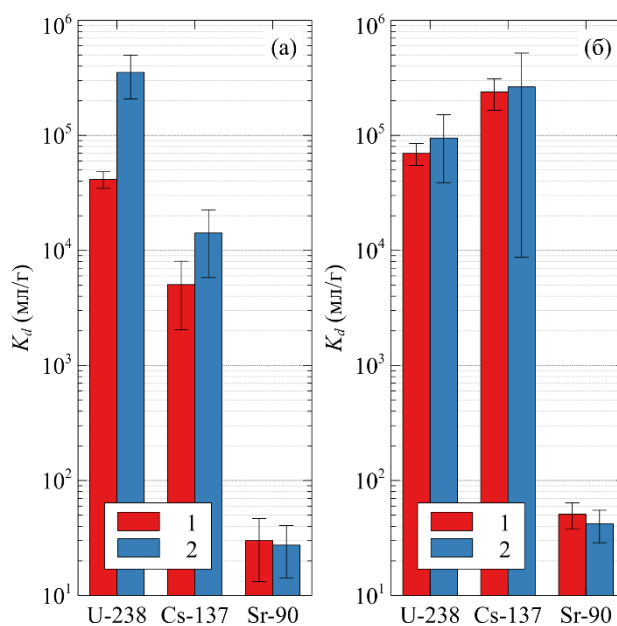


Рис.1. Сорбционно-селективные характеристики сорбентов по отношению к U-238, Cs-137 и Sr-90 в  $0.1M$  растворе  $NaNO_3$ ; а —  $XT3-Ni(OH)_2$ , б —  $XT3-Ni(OH)_2-K-Ni[Fe(CN)_6]$ , 1 — сушка на воздухе, 2 — сушка  $105^\circ C$ . Начальная концентрация U-238 —  $25$  мг/л, начальная активность Sr-90 и Cs-137 —  $1000$  Бк/мл, время адсорбции  $24$  часа, соотношение  $V/m$  —  $1000$  мл/г

Как можно отметить,  $XT3-Ni(OH)_2$  характеризуются высоким сродством к U-238 и Cs-137, значения коэффициента распределения превышают  $10^3$  мл/г. Сушка при  $105^\circ C$  в течение одного часа приводит к некоторому росту эффективности извлечения U-238 и Cs-137, повышению механической прочности и снижению гигроскопичности материалов, что, предположительно, связано с частичной сшивкой хитозана. Имобилизация в сорбент смешанного  $K-Ni[Fe(CN)_6]$  калия практически не сказывается на эффективности извлечения U-238, однако, приводит к увеличению величины коэффициента распределения Cs-137 более чем на один порядок.

Показано, что на основе хитозана может быть создан полифункциональный сорбент с включением слоистого гидроксида никеля (и, возможно, слоистых двойных гидроксидов) с последующей модификацией слоев селективными сорбционно-активными компонентами. Материалы, как показано, являются эффективными сорбентами для очистки (и доочистки) низкоактивных отходов от урана и цезия. Объем вторичных отходов может быть значительно уменьшен с использованием термических методов, приводящих к выгоранию хитозана.

*Работа выполнена в рамках государственного задания Института химии ДВО РАН (проект FWFN(0205)-2022-0002).*

### Список литературы

1. S. Sarkar, E. Guibal, F. Quignard, A.K. SenGupta. Polymer-supported metals and metal oxide nanoparticles: synthesis, characterization, and applications // *J. Nanopart. Res.* 2012. Vol. 14, N 2, # 715.
2. Y. Zhang, B. Wu, H. Xu, H. Liu, M. Wang, Y. He, B. Pan. Nanomaterials-enabled water and wastewater treatment // *NanoImpact*. 2016. Vol. 3–4. P. 22–39.
3. K.Z. Elwakeel. Environmental application of chitosan resins for the treatment of water and wastewater: a review // *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2010. Vol. 31, N 3. P. 273–288.
4. W.S. Wan Ngah, L.C. Teong, M.A.K.M Hanafiah. Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: A review // *Carbohydrate Polymers*. 2011. Vol. 83, N 4. P. 1446–1456.
5. L. Zhang, Y. Zeng, Z. Cheng. Removal of heavy metal ions using chitosan and modified chitosan: A review // *Journal of Molecular Liquids*. 2016, Vol. 214. P. 175–191.
6. D.H.K. Reddy, S. Lee. Application of magnetic chitosan composites for the removal of toxic metal and dyes from aqueous solutions // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2013. Vol. 201–202. P. 68–93.
7. J. Gomez-Pastora, E. Bringas, I. Ortiz. Recent progress and future challenges on the use of high performance magnetic nano-adsorbents in environmental applications // *Chemical Engineering Journal*. 2014. Vol. 256. P. 187–204.
8. D. Sunil. Recent advances on chitosan-metal oxide nanoparticles and their biological application // *Materials Science Forum*. 2013. Vol. 754. P. 99–108.
9. S.K. Shukla, A.K. Mishra, O.A. Arotiba, B.B. Mamba. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013. Vol. 59. P. 46–58.
10. J. Wang, C. Chen. Chitosan-based biosorbents: Modification and application for biosorption of heavy metals and radionuclides // *Bioresource Technology*. 2014. Vol.160. P. 129–141.
11. И.Е. Велешко. Перспективы применения хитозана для выделения и концентрирования радионуклидов в растворах. // *Рыбпром*. 2010. № 2. С. 53–57.
12. Л.Н. Пузырная. Полифункциональные материалы – эффективные сорбенты для очистки жидких радиоактивных отходов // *Хімія і технологія води*. 2019 Т. 41, № 4. С. 445–455.
13. R.A.A. Muzzarelli. Potential of chitin/chitosan-bearing materials for uranium recovery: An interdisciplinary review // *Carbohydrate Polymers*. 2011. Vol. 84, N 1. P. 54–63.
14. X. Liu, G.-R. Chen, D.-J. Lee, T. Kawamoto, H. Tanaka, M.-L. Chen, Y.-K. Luo. Adsorption removal of cesium from drinking waters: A mini review on use of biosorbents and other adsorbents // *Bioresource Technology*. 2014. Vol.160. P. 142–149.
15. J. Pospěchová, V. Brynych, V. Štengl, J. Tolasz, J. H. Langecker, M. Bubeníková, L. Szatmáry. Polysaccharide biopolymers modified with titanium or nickel nanoparticles for removal of radionuclides from aqueous solutions // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2016. Vol. 307, N 2. P. 1303–1314.
16. Патент РФ № 2618705 Российская Федерация «Способ получения композитных сорбентов, селективных к радионуклидам цезия» // Земскова Л.А., Егорин А.М., Сергиенко В.И., опубликован 11.05.2017, бюл.17.
17. A. Egorin, E. Tokar, L. Zemskova. Chitosan-ferrocyanide sorbent for Cs-137 removal from mineralized alkaline media // *Radiochimica Acta*. 2016. Vol. 104, N 9. P. 657–661.



18. L. Zemskova, A. Egorin, E. Tokar, V. Ivanov. Chitosan-based biosorbents: immobilization of metal hexacyanoferrates and application for removal of cesium radionuclide from aqueous solutions // *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 2019. Vol. 92, N 2. P. 459–466.
19. E. Tokar<sup>1</sup>, L. Zemskova, M. Tutov, I. Tananaev, I. Dovhyi, A. Egorin. Development and practical evaluation of the scheme for <sup>137</sup>Cs concentrating from seawater using chitosan and mixed ferrocyanides of Zn-K and Ni-K // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry.* 2020. Vol. 325. P. 567–575.
20. Y. Chen, J. Wang. Removal of radionuclide Sr<sup>2+</sup> ions from aqueous solution using synthesized magnetic chitosan beads // *Nucl. Eng. Design.* 2012. Vol. 242. P. 445–451.
21. L. Zemskova, A. Egorin, E. Tokar, V. Ivanov, S. Bratskaya. New chitosan/iron oxide composites: Fabrication and application for removal of Sr<sup>2+</sup> radionuclide from aqueous solutions // *Biomimetics.* 2018. Vol. 3, N 4. P. 39–49.
22. A. Egorin, E. Tokar, A. Matskevich, N. Ivanov, I. Tkachenko, T. Sokolnitskaya, L. Zemskova. Composite magnetic sorbents based on iron oxides in different polymer matrices: Comparison and application for removal of strontium // *Biomimetics.* 2020. Vol. 5, N 2. P. 22–34.
23. A. Egorin, E. Tokar, A. Kalashnikova, T. Sokolnitskaya, I. Tkachenko, A. Matskevich, E. Filatov, L. Zemskova. Synthesis and sorption properties towards Sr-90 of composite sorbents based on magnetite and hematite // *Materials.* 2020. Vol. 13, N 5. P. 1189–1203.
24. L. Zhou, Z. Li, K. Zeng, O. Chen, Y. Wang, Z. Liu, A.A. Adesina. Immobilization of in-situ formed Ni(OH)<sub>2</sub> nanoparticles in chitosan beads for efficient removal of U(VI) from aqueous solutions // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2017. Vol. 314. P. 467–476.
25. C.K. Choo, T.L. Goh, L. Shahcheraghi, G.C. Ngoh, A.Z. Abdullah, B.A. Horri, B. Salamatinia. Synthesis and characterization of NiO nano-Spheres by templating on chitosan as a green precursor // *J. Am. Ceram. Soc.* 2016. Vol. 12, N 99. P. 1–9.
26. L. Zemskova, E. Tokar, D. Shlyk, A. Egorin. Sorbents based on Ni(OH)<sub>2</sub>/chitosan, immobilization of metal hexacyanoferrates, and application for removal of radionuclide Cs from aqueous solutions // *Journal of Sol-Gel Science and Technology.* 2022. DOI: 10.1007/s10971-022-05861-6.

## **FUNDAMENTAL BASES FOR OBTAINING AN EFFECTIVE SOIL STRUCTURE-FORMER BASED ON BOMBYX MORI CHITOSAN**

**N.R. Vokhidova<sup>1</sup>, I.G. Panova<sup>2</sup>, A.A. Yaroslavov<sup>2</sup>, S.Sh. Rashidova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Chemistry and Physics of Polymers of Scientific Academy of Uzbekistan,  
Tashkent, 100128, Uzbekistan*

<sup>2</sup> *Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation  
E-mail: noira\_vokhidova@yahoo.de*

Complex formation is one of the most effective methods for modifying the properties of polymers, where binary, layered colloidal dispersions and/or films with new, effective ones are formed by the interaction of lyophilizing and blocking agents. In recent years, there has been an increase in demand for new materials based on interpolyelectrolyte complexes (IPECs), which

represent a special class of polymers formed as a result of cooperative reversible interaction reactions of oppositely charged macroions [1–2].

The soil macrostructure, along with other factors, determines the water, nutrient, air and thermal regime of soils, as well as the resistance of soils to erosion and crust formation. In terms of production, soil structure is important in that it stabilizes the soil in a state of high porosity and relatively low density [1]. In accordance, we have studied the fundamental principles for obtaining stoichiometric and non-stoichiometric IPECs based on *Bombyx mori* chitosan.

The optimal ratios of polyions, the effect of the ionic strength of solutions, the hydrodynamic size of the complexes, the effect of polyanion concentrations on the electrophoretic mobility of solutions were revealed, and the stability of the resulting complexes was also studied. It was found that stoichiometric complexes of chitosan with the sodium salt of carboxymethyl cellulose were most effective against water and wind erosion of the soil.

Experiments in the laboratory have shown that IPECs significantly improve the agrochemical and agrophysical parameters of the soil, e.g., its structure, density and water resistance of soil aggregates, increase the marginal field moisture capacity and productive water reserves. The mechanism of soil structuring is discussed and the possibilities of using IPEC in soil erosion with the aim of rational use of water resources are considered.

#### References

1. Mikheykin S., Laguzin E., Pronina L., Smirnov A., Simonov V., Zezin A., Bolysheva T., Fless A. Interpolyelectrolyte complexes for stabilizing and reducing migration of contamination in erodible soil horizons // Proceedings of the International Conference on Radioactive Waste Management and Environmental Remediation. 2001. ICEM. Vol. 1, P. 487–491.
2. Vokhidova N.R., Khudoyberdiyev Sh.Sh., Panova I.G., Yaroslavov A.A., Rashidova S.Sh. On the preparation of interpolyelectrolyte complexes of chitosan *Bombyx mori* // Uzbek Chemical Journal – Tashkent. 2019. N 3. P. 62–67.

## КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА, МОДИФИЦИРОВАННОГО НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫМ ДИОКСИДОМ ТИТАНА

**Е.В. Саломатина, П.Н. Шелудько, О.Н. Смирнова, Л.А. Смирнова**

*Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет  
им. Н.И. Лобачевского, пр. Гагарина, дом 23, корп. 5, Нижний Новгород, 603022, Россия  
E-mail: smirnova\_la@mail.ru*

В свете современных тенденций по снижению экологической нагрузки на окружающую среду большое внимание уделяется материалам на основе биополимеров – от разработки препаратов биомедицинского назначения, мембран для очистки воды и воздуха, сенсоров и особенно упаковочным материалам [1–3]. Масштабные исследования в этом направлении проводятся с использованием хитозана (ХТЗ) благодаря его биосовместимости, биоразлагаемости, хелатным и антимикробным свойствам, пленкообразующей способности. Пленки ХТЗ могут снижать парциальное давление кислорода в упаковке, задерживать

ферментативное потемнение фруктов, контролировать дыхание и предотвращать обезвоживание. При всех его положительных характеристиках сдерживающим фактором являются низкие физико-механические характеристики материалов на его основе. В связи с этим актуальной задачей является модификация ХТЗ путем его совмещения с материалами, которые также являются биосовместимыми и нетоксичными. В этом отношении одним из перспективных соединений является диоксид титана, применение которого может приводить к образованию поперечных связей между макромолекулами полисахарида и ОН-групп поверхностного слоя оксида [4].  $TiO_2$  обладает выраженной противомикробной и фотокаталитической активностью, что полезно при подавлении развития бактерий [5, 6]. При этом усиления полезных свойств композиционного материала следует ожидать при наноструктурировании неорганического компонента.

Целью работы является получение композиционных материалов на основе ХТЗ, модифицированного диоксидом титана в наноструктурированной форме; исследование их физико-механических и теплофизических свойств. В работе использовался ХТЗ с молекулярной массой  $2 \times 10^5$  и степенью деацетилирования 80 %. Наноструктурированный диоксид титана получали на основе тетраизопророксида титана по золь-гель технологии в среде изопропилового спирта. Средний размер наночастиц (НЧ)  $TiO_2$  варьировался от 20 до 920 нм. НЧ диоксида титана вводили в растворы 3 масс. % ХТЗ в уксусной кислоте. Концентрацию  $TiO_2$  изменяли от 0,5 до 2 масс. % (относительно массы сухого ХТЗ), уксусной кислоты – от 1,2 до 6 масс. %. Были получены прозрачные однородные материалы и установлено, что модификация хитозана с помощью  $TiO_2$  приводит к существенному возрастанию его физико-механических свойств (таблица 1). Выявлено, что наибольшей прочностью и деформацией при разрыве – до 90 МПа и 20 %, соответственно, обладают пленки, содержащие частицы  $TiO_2$  размером не более 50 нм. При увеличении размера частиц оксида эффект снижается. Пленки являются контролируемо биodeградируемыми и обладают способностью подавлять развитие грамм-положительных и грамм-отрицательных бактерий.

Таблица 1

**Физико-механические свойства пленок хитозана, содержащих наночастицы диоксида титана со средним размером 40 нм**

Содержание $TiO_2$ в пленке %	Прочность при разрыве, МПа	Деформация при разрыве, %
0,0	20,1	4,3
0,5	66,2	18,1
1,0	68,4	20,4
1,5	62,0	19,2
2,0	55,9	13,7

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 23-74-10069).

**Список литературы**

1. X. Zhang, G. Xiao, Y. Wang, Y. Zhao, H. Su, T. Tan. Preparation of chitosan- $TiO_2$  composite film with efficient antimicrobial activities under visible light for food packaging applications // Carbohydrate Polymers. 2017. Vol. 169. P. 101–107
2. X. Chang, Y. Hou, Q. Liu, Z. Hu, Q. Xie, Y. Shan, G. Li, S. Ding. Physicochemical and antimicrobial properties of chitosan composite films incorporated with glycerol monolaurate and nano- $TiO_2$  // Food Hydrocolloids. 2021. Vol. 119. # 106846.

3. K.Y. Perera, S. Sharma, B. Duffy, S. Pathania, A.K. Jaiswal, S. Jaiswal. An active biodegradable layer-by-layer film based on chitosan-alginate-TiO<sub>2</sub> for the enhanced shelf life of tomatoes // Food Packaging and Shelf Life. 2022. Vol. 34. # 100971.
4. F.L. Gomes de Menezes, R.H. de Lima Leite, F.K. Gomes dos Santos, A.I. Aria, E.M.M. Aroucha. TiO<sub>2</sub>-enhanced chitosan/cassava starch biofilms for sustainable food packaging // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2021. Vol. 630. # 127661.
5. M.S. Waghmode, A.B. Gunjal, J.A. Mulla et. al. Studies on the titanium dioxide nanoparticles: biosynthesis, applications and remediation // SN Appl. Sci. 2019. Vol. 1, N 4. # 310.
6. L.M. Anaya-Esparza, J.M. Ruvalcaba-Gómez, C.I. Maytorena-Verdugo et al. Chitosan-TiO<sub>2</sub>: A versatile hybrid composite // Materials. 2020. Vol. 13, N 4. # 811.

## **ОПЫТ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ УЧЕНЫМИ ФГБОУ ВО «ДАЛЬРЫБВТУЗ» ХИТОЗАНА В ТЕХНОЛОГИИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ ВОДНЫХ БИОРЕСУРСОВ**

**С.Н. Максимова, Т.М. Сафронова, Д.В. Полещук**

*ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет» («Дальрыбвтуз»), ул. Луговая, дом 52б, Владивосток, 690087, Россия  
E-mail: maxsvet28@mail.ru*

История исследований хитина и хитозана в нашей стране начиналась в первой половине XX века, в дальнейшем получила бурное развитие в связи с промыслом и переработкой антарктического криля, приведших к сосредоточению на судах крупномасштабного количества панцирьсодержащих отходов, которые имея высокую энергетическую и биологическую ценность не отвечали требованиям к кормовым продуктам из-за механического повреждающего действия на сельскохозяйственных животных и объектов звероводства. Необходимость комплексного исследования панцирьсодержащих крилевых отходов и одновременно ценность данного сырья как промышленного источника полиаминосахаридов хитина и хитозана привели к возникновению научного направления – Хитинологии и образованию Российского хитинового общества, которое объединяет ученых, привлекает молодое поколение исследователей хитиновых материалов, и с 80-ых годов XX века регулярно организует научно-практические конференции, география которых представлена на рисунке 1.

Первая Всесоюзная научно-техническая конференция по производству и использованию в народном хозяйстве хитина и хитозана из панциря криля и других ракообразных проходила в 1983 году во Владивостоке, организаторами выступили Министерство рыбного хозяйства СССР, Всесоюзный научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО), Дальневосточный технический институт рыбной промышленности и хозяйства (Дальрыбвтуз) и НТО пищевой промышленности Приморского края (место проведения – Дальрыбвтуз). С тех пор сотрудники Дальрыбвтуза принимали регулярное участие в работе хитиновых конференций.

Развитию хитинологии способствовал факт возрастающего интереса ученых разных стран к изучению и получению хитина и хитозана, о чем свидетельствовали международные конференции по хитиновым материалам, прошедшие в 1977 г. в США и в 1982 г. в Японии.



Рис. 1. География Международных конференции, посвященных исследованиям хитина и хитозана

Первой хитиновой конференции в России предшествовало создание на государственном уровне отраслевой программы «Криль» (1980–1999 гг., руководитель – д.т.н., профессор ВНИРО В.П. Быков). Дальрыбвтуз участвовал в подготовке названной программы и выполнении научно-технической задачи по комплексному использованию антарктического криля, в том числе получению из вторичного крилевого сырья полиаминосахаридов хитина и хитозана.

Исследованиям по программе «Криль» в Дальрыбвтузе способствовали разработки по моноаминосахаридам водных биоресурсов. За период с 1964 по 1980 годы в тканях и органах морских обитателей установлено наличие гексозаминов, представленных глюкоз- и галактозаминами, сходных по свойствам и количественно определяемых совместно. В зависимости от вида исследуемого объекта количество гексозаминов колеблется в значительных пределах, более высокое их содержание свойственно съедобным тканям беспозвоночных, в том числе и антарктическому крилю. Учеными Дальрыбвтуза было экспериментально доказано участие гексозаминов в сахаро-аминной реакции, широко распространенной в технологии пищевых продуктов, установлены способы ингибирования меланоидинообразования, а также технологические процессы и режимы, позволяющие расширить перечень водных биоресурсов, используемых в консервном производстве. Результаты данных исследований отражены в трех кандидатских диссертациях сотрудников Дальрыбвтуза (Сафроновой Т.М. в 1969 г., Мамедов Т.Д. в 1979 г., Шнейдерман С.И. в 1985 г.), а методический, аналитический и научно-практический опыт научных кадров был использован ими при участии в разработке технологии хитина и его использовании.

Результаты научных исследований Дальрыбвтуза согласно отраслевой Программе «Криль», а после ее окончания по научным планам университета представлены в материалах последующих публикаций, в том числе хитиновых конференций. Ученые Дальрыбвтуза в то время получили ряд основных научно-практических результатов:

- технологические и функциональные свойства панцирных отходов криля;
- технология сбора, консервирования и транспортирования панцирных отходов на дальние расстояния для переработки в береговых условиях;
- технология сухого панциря криля, отвечающего требованиям к сырью для получения хитина и хитозана;
- технология хитина и хитозана из панциря криля, отвечающих заданным свойствам;
- технология рыбных пищевых продуктов с регулируемым хитозаном структурно-механическими свойствами.

С начала XI века до сегодняшнего дня учеными Дальрыбвтуза показаны пути перспективного использования хитиновых материалов в технологии пищевых продуктов из водных биоресурсов. Изучены сенсорные, структурно-механические, адгезивные, сферообразующие, барьерные (антимикробные и антиокислительные), функционально-физиологические (липотропный эффект) свойства хитозана, его водорастворимых производных и полиэлектролитных комплексов с участием морских биополиеров, а также пищевых систем, их содержащих. По результатам научных исследований за эти годы учеными университета защищено 5 докторских (Сафронова Т.М., Богданов В.Д., Дацун В.М., Ким Г.Н., Максимова С.Н.), и 9 кандидатских диссертаций (таблица 1).

Таблица 1

**Диссертации сотрудников ФГБОУ ВО «Дальрыбвтуз», посвященные хитозану**

ФИО	Наименование диссертации	Год защиты диссертации
Диссертации на соискание ученой степени доктора технических наук		
Сафронова Т.М.	Научное обоснование и разработка технологических процессов, обеспечивающих рациональное использование сырья водного происхождения, содержащего аминасахара и их полимеры	1981
Богданов В.Д.	Обоснование технологии продуктов с регулируемой структурой при комплексной переработке гидробионтов	1995
Дацун В.М.	Хитин (монография)	1999
Ким Г.Н.	Обоснование и разработка барьерной технологии продуктов из гидробионтов	2002
Максимова С.Н.	Научное обоснование и разработка технологии хитозансодержащих функциональных продуктов из водных биоресурсов	2012
Диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук		
Максимова С.Н.	Совершенствование технологии пищевого хитозана	1998
Семенова Н.К.	Разработка технологии консервирования хитинсодержащих отходов переработки ракообразных	1999
Кращенко В.В.	Разработка технологии продуктов из гидробионтов в термостойких желирующих заливках	2002
Третениченко Е.М.	Исследование состава и использование обрастателей установок марикультуры в технологии кормовых и технических продуктов	2006
Быканова Д.Н.	Разработка технологии консервов из рыбы и нерыбных объектов с использованием пищевых добавок морского происхождения	2010
Суровцева Е.В.	Разработка технологии малосоленой продукции из лососевых рыб с хитозаном	2010
Полещук Д.В.	Разработка технологий пищевых функциональных продуктов на основе биомодификации молока лососевых с использованием хитозана	2015
Пономаренко С.Ю.	Научное обоснование и совершенствование холодильной технологии водных биологических ресурсов с использованием морских полисахаридов	2021
Полещук В.И.	Научное обоснование и разработка технологии пищевой продукции из сардины тихоокеанской с использованием биорегуляторов	2022

Сложившаяся под руководством д.т.н., профессора Т.М. Сафроновой в 80-ые годы прошлого столетия научная школа действует и в настоящее время, традиционно привлекая аспирантов и студентов. Публикации сотрудников и студентов Дальрыбвтуза, посвященные

хитозансодержащим продуктам, общим числом около 250 наименований представлены монографиями, учебниками, учебными пособиями, справочниками, статьями в различных научных изданиях и патентами, приведенными в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

**Публикации сотрудников ФГБОУ ВО «Дальрыбвтуз», посвященные хитозану, его производным и их пищевому применению**

Вид публикации	Количество публикаций
Монографии	8
Учебники, учебные пособия, справочники, практикумы	14
Статьи в изданиях, рецензируемых ВАК РФ	70
Публикации в периодических изданиях, сборниках докладов конференций, учитываемых в РИНЦ	155

Таблица 3

**Патенты сотрудников ФГБОУ ВО «Дальрыбвтуз», посвященные хитозану и его пищевому применению**

Номер	Название	Год опубликования
1692012	Способ получения хитина из панциря крабов	1989
1821471	Способ получения хитозана	1993
2147590	Способ получения хитозана	2000
2264133	Способ получения аналога пищевой икры	2005
2266019	Способ получения пищевой эмульсии	2005
2264133	Способ получения пищевой зернистой икры	2005
2320193	Пищевая эмульсия	2008
2340226	Способ изготовления аналога крабовых палочек	2008
2370042	Способ приготовления малосоленой рыбы	2009
2404690	Паштет из крабов	2012
119643	Устройство для гидролиза	2012
2483110	Способ получения хитозан-нуклеинового гидролизата	2013
2578477	Способ получения пресервов из молкок лососевых рыб	2016
260532	Способ охлаждения и консервирования рыбы и морепродуктов	2018
2691571	Способ производства пресервов из сардины	2019

Разработано 13 нормативных и технических документов (НД и ТД) (таблица 4). Осуществлена промышленная апробация технологий. В 202-2022 годах два разработанных Дальрыбвтузом продукта (консервы в виде паштета из мяса краба с хитозаном и рыбное масло с хитозаном) участвовали в акселерационной программе для студентов «AGAMA.RUN», по итогам которой указанные продукты продемонстрировали свою конкурентоспособность и высокий уровень продаж в сравнении с продуктами ГК «AGAMA» (таблицы 2, 3 и 4).

Следует отметить, что литературные источники по применению хитозана в технологии пищевых продуктов в большинстве случаев дифференцированно отражают его полезные свойства: сорбционные, структурообразующие, барьерные, функционально-физиологические.

В публикациях сотрудников ФГБОУ ВО «Дальрыбвтуз» представлены результаты единовременного исследования комплекса функций хитозана (функционально-технологических и функционально-физиологических), что восполняет отсутствие данных о его влиянии в целом на качество, безопасность, биологическую ценность, физиологическую эффективность и хранимоспособность пищевых продуктов. В представленных выше работах

рассматриваются продукты из водных биологических ресурсов, что обусловлено следующими двумя аспектами. Во-первых, многие водные обитатели, в том числе ракообразные, представляют собой мощный, постоянно воспроизводимый в природе источник сырья для получения хитиновых материалов. Использование хитинсодержащего сырья позволяет одновременно решать экологическую и экономическую задачи по снижению нагрузки на окружающую среду, уменьшению количества отходов производства, привлечению в оборот вторичного сырья. Во-вторых, за счет использования хитиновых материалов может быть решен ряд задач, стоящих перед рыбной отраслью: расширение ассортимента продукции из водных биоресурсов, повышение ее безопасности, качества, хранимоспособности и физиологической активности для потребителя.

Таблица 4

**Разработанные НД и ТД на хитозан и хитозансодержащие пищевые продукты из водных биоресурсов**

Вид и номер документа	Название
ТУ 9262-068-00471515-2010	Продукция из лососевых рыб малосоленая с хитозаном
ТУ 9263-081-00471515-2012	Палочки лососевые сушеные с хитозаном
ТУ 9284-082-00471515-2012	Сушеные формованные листы из ламинарии с хитозаном
ТУ 9264-084-00471515-2012	Аналог икры осетровых Морская аптека
ТУ 9273-065-00471515-08	Паштет крабовый с хитозаном «Здоровье»
ТУ (проект)	Хитозан – нуклеиновый гидролизат
ТУ (проект)	Пудинг «Морской»
ТУ(проект)	Рулет «Нептун»
ТУ 9271-083-00471515-2012	Консервы «Роллы морские с хитозаном»
СТО 00471515-056-2017	Хитозан-альгинатный лед
СТО 00471515-055-2017	Соленая продукция из сардины тихоокеанской
СТО 00471515-066-2018	Сардина тихоокеанская (иваси) охлажденная хитозан-альгинатным льдом
СТО 00471515-070-2019	Корюшка охлажденная хитозан-альгинатным льдом
СТО 00471515-2020	Сардина (иваси) мороженая
СТО 00471515-055-2017	Соленая продукция из сардины тихоокеанской
СТО 00471515- 068-2018	Кулинарная формованная продукция из сардины тихоокеанской «Хлебы рыбные»

С учетом медико-биологической эффективности хитиновых материалов можно говорить о решении и социальной задачи. Полученные сотрудниками Дальрыбвтуза результаты научных исследований позволяют отнести хитозан и его водорастворимые производные, использованные в производстве пищевых продуктов из водных биоресурсов в качестве функционально-технологической добавки, к биологически активным компонентам пищи, а готовую продукцию позиционировать как функциональную.

Следует подчеркнуть, что главенствующими направлениями изучения и использования хитозана в России и других странах являются фундаментальные исследования и работы в области медицины, микробиологии, а также ветеринарии и агробиологии. Публикации по названным направлениям, в том числе и в регулярно проходящих хитиновых конференциях, преобладают. Помимо хитина и хитозана изучаются их многочисленные производные, полиэлектролитные комплексы на их основе, представляющие в совокупности обширную группу хитиновых материалов многофункционального применения. И в большей степени это – фундаментальные исследования структуры и свойств хитиновых материалов.



Количество работ по технологии применения хитозана и его производных в пищевых продуктах (рыбных, мясных, молочных, хлебобулочных изделиях), как и число их авторов, составляют порядка 10 % от общего числа тематических публикаций. При этом фундаментальные исследования хитозана в области медицины, оставаясь основными, способствуют прикладному, а именно пищевому применению биополимера, научному обоснованию и разработке новых технологий пищевых хитозансодержащих продуктов.

В прикладных научных исследованиях решаются задачи по изучению состава хитинсодержащего сырья, условий его хранения, переработки в хитиновые материалы, использованию их свойств в пищевой технологии. Потенциал хитозана и его производных как функциональной добавки в технологии пищевых продуктов значителен (рисунок 2). Совокупность технологических функций и физиологической активности хитозана и его производных, наряду с их биологической совместимостью, биodeградируемостью, обеспечивает конкурентоспособность биополимеру среди родственных по целевому назначению технологических добавок.

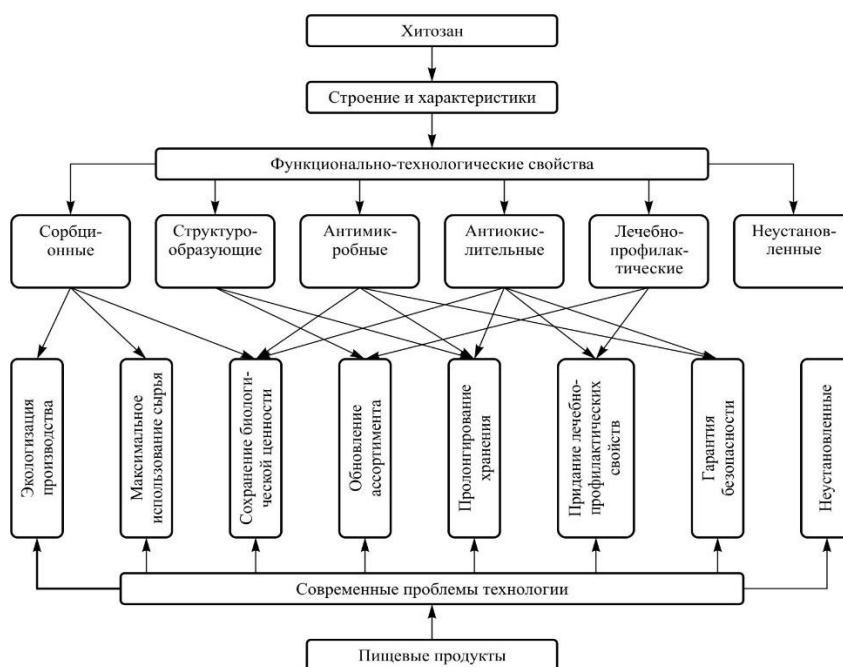


Рис. 2. Направления использования хитозана и его производных в технологии пищевых продуктов

В связи с этим в настоящее время с учетом функциональной роли хитозана в пищевой продукции обозначились два направления: оценка физиологической эффективности полимера, включенного первоначально как технологического агента, и целевое введение хитозана в количестве, обеспечивающем пищевому продукту заданную функционально-физиологическую направленность. Также к перспективным направлениям в области технологии пищевых продуктов с использованием полифункциональных свойств хитозана относятся дальнейшая разработка теоретических основ его барьерной активности и физиологической эффективности, расширение сырьевых источников и ассортимента функциональной продукции с целевым добавлением полимера и его олигомеров. В связи с чем допустимо предположение о целенаправленном синтезе хитозана и его производных с заданными свойствами для пищевых продуктов, как это осуществляется в медицине.

Важно отметить, что для обеспечения экономической целесообразности промышленного производства хитозана источники хитина должны быть сосредоточены в местах, доступных

для его заготовки и транспортирования. Учитывая, что основным сырьем для получения хитиновых материалов являются панцирьсодержащие отходы краба, встает проблема сбора и хранения данного вторичного сырья на всем пути в технологическом процессе. При этом следует учитывать, что сбор вторичного сырья на крабодобывающих и перерабатывающих организациях, а также предприятиях общественного питания, способствует охране окружающей среды.

В настоящее время в технологии применения хитозана в пищевых продуктах существует ряд фактов, нуждающихся в теоретическом пояснении, например, установленная немонотонность изменения уровня контаминации хитозансодержащей продукции в хранении, разнонаправленность изменения ее относительной биологической ценности в зависимости от характеристик биополимера. Наличие квалифицированных кадров ФГБОУ «Дальрыбвтуз», сформированных за прошедшие годы, и накопленный опыт позволяет рассчитывать на успешное решение поставленных научно-практических задач в данной области.

## **МЕХАНИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ ХИТИНА И ХИТОЗАНА И ЕЁ ПРИМЕНЕНИЕ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ МАТЕРИАЛОВ**

**Т.А. Аكوпова**

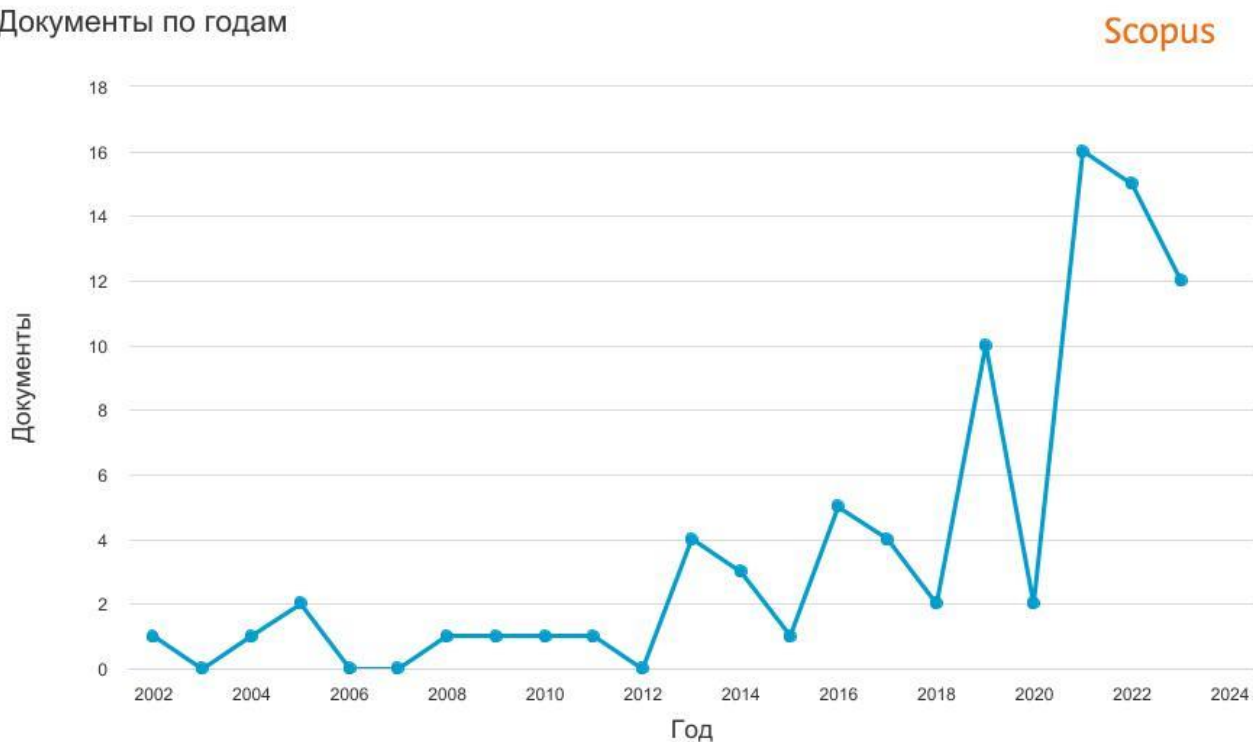
*Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова  
Российской академии наук, улица Профсоюзная, дом 70, Москва, 117393, Россия  
E-mail: akopova@ispm.ru*

Реакционная способность полисахаридов в реакциях, протекающих в гетерогенных условиях, определяется в значительной степени особенностями надмолекулярной структуры полимеров. Для получения производных с высокими степенями превращения реагентов требуется их предварительная активация. Механическая активация реагентов позволяет избежать необходимости их расплавления и отказаться от использования катализаторов и инициаторов процессов, что также повышает экологическую чистоту процессов и является важным фактором при создании безопасных материалов биомедицинского назначения, для разработки которых хитин и продукт его дезацетилирования – хитозан – представляют большой интерес. В настоящее время интерес к исследованиям процессов, происходящих при механохимическом воздействии на полисахариды, значительно возрастает [1]. На рисунках 1 и 2 представлены результаты поиска работ в базе данных Scopus по состоянию на 22 августа 2023 года, выполненного с использованием «chitin or chitosan and mechanochemistry» в качестве ключевых слов.

Чаще всего полисахариды рассматривают как компоненты композиционных материалов, обеспечивающие способность к биодegradации, или как матрицы для активации биологически активных веществ в условиях механического воздействия. Химическое взаимодействие в этом случае незначительно и не играет существенной роли в достижении требуемых свойств материалов, однако возникает возможность создания на основе полисахаридов новых полимерных материалов с ценными прикладными свойствами. В то же время твердофазный синтез производных полисахаридов, в частности, прививка на полисахариды фрагментов синтетических полимеров в условиях механохимического воздействия, представляется наиболее приемлемым методом для решения проблемы термодинамической несовместимости

природных и синтетических компонентов реакционных систем [2]. На рисунке 3 представлена диаграмма распределения найденных документов по отраслям знаний.

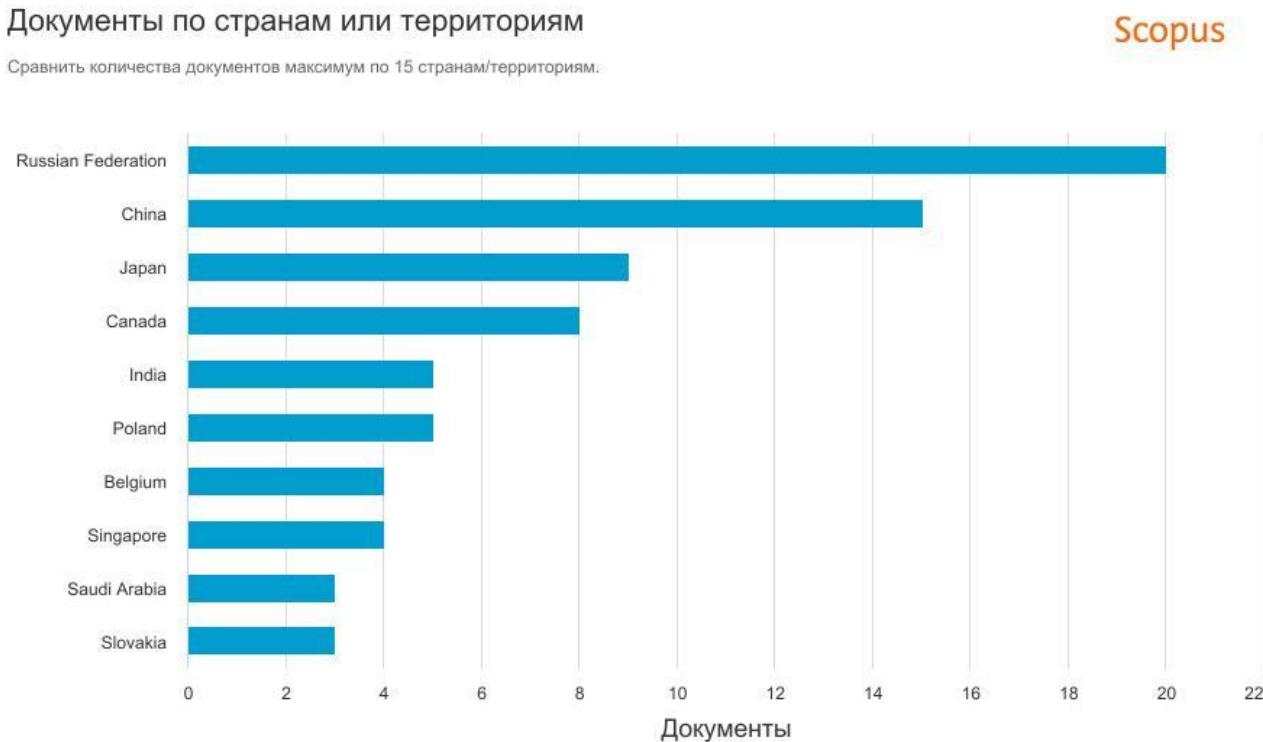
### Документы по годам



Авторские права © 2023 Elsevier B.V. Все права защищены. Scopus® является зарегистрированным товарным знаком Elsevier B.V.

Рис. 1. График распределения по годам документов, найденных с использованием «chitin or chitosan and mechanochemistry» в качестве ключевых слов

### Документы по странам или территориям



Авторские права © 2023 Elsevier B.V. Все права защищены. Scopus® является зарегистрированным товарным знаком Elsevier B.V.

Рис. 2. Диаграмма распределения найденных документов по странам

В настоящее время четко сформулированы принципиальные отличия механохимических превращений от классических химических процессов, а в действующей номенклатуре ЮПАК механохимические реакции терминологически определены как «химические реакции, инициируемые поглощаемой механической энергией». Ключевым фактором, определяющим протекание реакции, является не продолжительность деформирования, а энергия, необходимая для преодоления предела упругости твердого тела, т.е. для перевода системы в состояние пластического течения. Именно в этом состоянии наблюдается интенсивное накопление энергии с образованием точечных и линейных дефектов, которые позволяют снизить эффективную энергию активации последующего химического превращения вещества. При изучении твердофазных химических реакций обнаружены необычно высокие значения коэффициента диффузии атомов или ионов компонентов. Для объяснения массопереноса в твердых смесях реагентов предложен даже специальный термин – деформационное перемешивание, обеспечивающее необходимую для осуществления реакций подвижность [3].

### Документы по отрасли знаний

Scopus

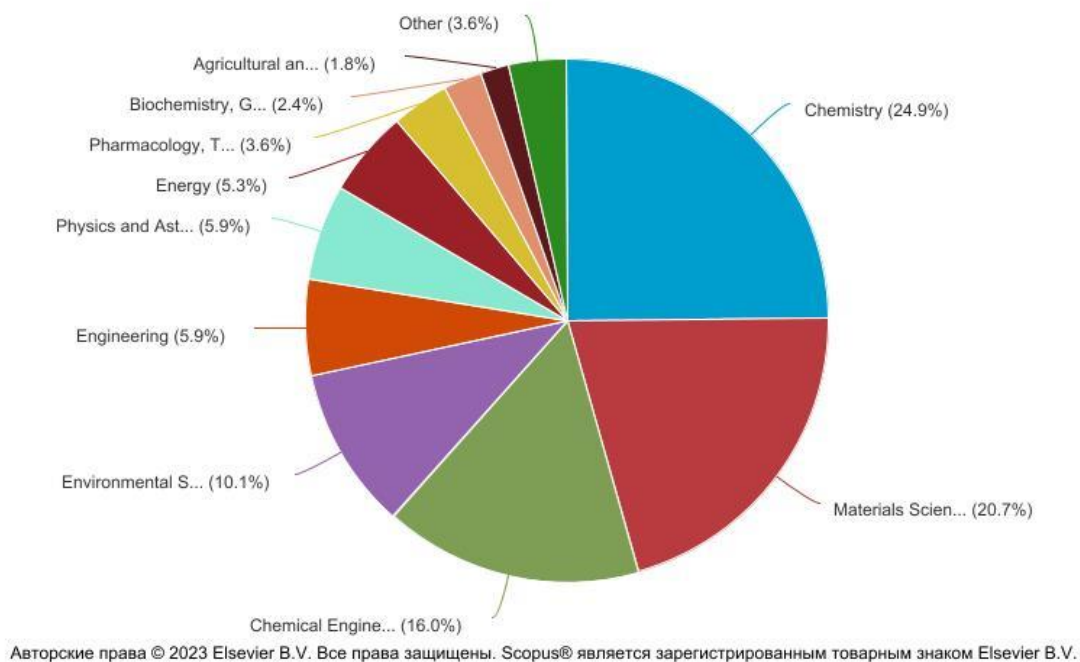


Рис. 3. Диаграмма распределения найденных документов по отраслям знаний

Наибольшее число работ, посвященных изучению изменений физико-химических свойств твердых тел при механическом воздействии, выполнено для неорганических реакционных систем с использованием шаровых, планетарных, вибрационных или других мельниц – аппаратов импульсного воздействия. Механизмы активации твердых органических и неорганических веществ к химическим превращениям в условиях механического воздействия имеют общие закономерности. Однако практика механосинтеза, широко распространенная в промышленном масштабе на многие неорганические вещества и смеси металлов, наталкивается на жесткие ограничения в органическом синтезе, связанные с низкой термостойкостью органических соединений и длительностью релаксационных процессов. Как следствие, наибольший прогресс в изучении органических механохимических реакций достигнут на устройствах, осуществляющих медленное деформирование и более точное

регулирование температурного режима по сравнению с мельничными аппаратами: на наковальнях Бриджмена и в двухшнековых экструдерах.

Наиболее интересным объектом в ряду полисахаридов для проведения химического модифицирования в твердом состоянии несомненно является хитозан – единственный катионный полисахарид, имеющий практически в каждом элементарном звене реакционноспособную первичную аминогруппу, что также определяет его биологическую активность. В результате разработки оригинальных твердофазных методов синтеза нами получены новые производные и привитые сополимеры хитозана с синтетическими полимерами и олигомерами, синтез которых осложнен или невозможен с помощью жидкофазных растворных или расплавных технологий. Показана высокая эффективность твердофазных экструзионных процессов: высокие степени превращения и селективность при значительном сокращении их продолжительности и расхода реагентов [1]. При исследовании влияния температуры обработки в интервале  $25 \div 180^\circ\text{C}$  было обнаружено, что наибольшие структурные изменения протекают при низких температурах. Так, степень кристалличности образца, размолотого при  $25^\circ\text{C}$ , снижается с 72 до 25%, а для образца, размолотого при  $180^\circ\text{C}$  – до 50 % [4]. Этим объясняется, в частности, что реакции комплексообразования хитозана с органическими соединениями наиболее эффективно протекают в экструдере при комнатной температуре. Таким образом, механохимическое воздействие на реакционные системы предполагает возможность разработки экологически чистых безрастворных и низкотемпературных технологий получения новых материалов на основе хитозана.

*Работы выполнены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № FFEZ-2019-0007).*

### Список литературы

1. Akopova T.A., Popyrina T.N., Demina T.S. Mechanochemical transformations of polysaccharides: A Systematic Review // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol. 23, N 18. # 10458. DOI: 10.3390/ijms231810458.
2. Патент РФ №2292354 «Метод получения привитых сополимеров хитина и хитозана с синтетическими полимерами» / Озерин А.Н., Зеленецкий А.Н., Аكوпова Т.А., Зеленецкий С.Н., Владимиров Л.В., Жорин В.А., Могилевская Е.Л., Чернышенко А.О., Вихорева Г.А., опубликован 27.01.2007, бюл. 3.
3. П.Ю. Бутягин. Принудительные реакции в неорганической и органической химии // Коллоидный журнал. 1999. Т. 61, № 5. С. 581–589.
4. О кристаллической структуре хитина и хитозана / Е.Л. Могилевская, Т.А. Аكوпова, А.Н. Зеленецкий, А.Н. Озерин // Высокомолек. соед. А. 2006. Т. 48, № 2. С. 216–226.

# ПОИСК ОПТИМАЛЬНЫХ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ N-(2-КАРБОКСИЭТИЛ)ХИТОЗАНА ДЛЯ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ РОСТОРЕГУЛЯТОРА РАСТЕНИЙ

П.Д. Тобышева<sup>1,2</sup>, Л.А. Хамидуллина<sup>1,2</sup>, Г.Л. Бурыгин<sup>3,4</sup>, И.С. Пузырев<sup>1</sup>, А.В. Пестов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт органического синтеза имени И.Я. Постовского УрО РАН,  
улица Софьи Ковалевской, дом 22/20, Екатеринбург, 620137, Россия

<sup>2</sup> Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина,  
улица Мира, дом 19, Екатеринбург, 620002, Россия

<sup>3</sup> Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени  
Н.И. Вавилова, проспект им. Петра Столыпина, дом 4, стр. 3, Саратов, 410012, Россия

<sup>4</sup> Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, проспект  
Энтузиастов, дом 13, Саратов, 410049, Россия

E-mail: tobysheva@list.ru

Широкий спектр разнообразия производных хитозана и их очевидная повышенная биологическая активность по сравнению с исходным биополимером диктуют необходимость поиска и создания производных с оптимальными структурно-функциональными свойствами для их применения в качестве росторегуляторов растительных организмов.

Так, важным этапом исследования ростостимулирующих свойств является правильный выбор молекулярной массы, а также солевой формы карбоксиалкилпроизводного хитозана, поскольку данные факторы непосредственно влияют на характер оказываемых ими биологических свойств. В ходе исследований нами было установлено, что низкомолекулярный, высокогидрофильный и низкоацетилованный карбоксиалкилхитозан в аммонийной солевой форме угнетает процессы прорастания семян, а его высокомолекулярный аналог позволяет повысить всхожесть семян до 15 % по сравнению с контрольной линией и натриевой солевой формой карбоксиалкилхитозана.

Так же неотъемлемым поисковым шагом остается вопрос о выборе используемой для исследования ростостимулирующих эффектов концентрации карбоксиалкилхитозана. При этом данная характеристика производного оказалась видоспецифичной для растений, а итоги эксперимента показали отсутствие необходимости применения высоких концентраций.

Целью данной работы является поиск оптимальных структурно-функциональных свойств N-(2-карбоксиэтил)хитозана, таких как молекулярная масса, солевая форма и концентрация, для его использования в качестве росторегулятора растений.

Исследование проводили в отношении таких важных в сельском хозяйстве и фармацевтической промышленности растений, как *S. lycopersicum*, *T. aestivum*, *H. annuus*, *E. purpurea* и *C. officinalis* в различных условиях проращивания семян и развития растений. Оценивали влияние N-(2-карбоксиэтил)производных, синтезированных из хитозана с молекулярными массами 50, 100, 300 и 500 кДа, в натриевой и аммонийной солевых формах. В качестве испытываемых доз N-(2-карбоксиэтил)хитозана использовали концентрации 0,5 мг/мл, 1,0 мг/мл и 2,0 мг/мл. Ростостимулирующую активность исследовали с помощью индексов прорастания, морфологических и физиологических параметров, а также оценки биохимического профиля растений.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22 26-20068.

## ПОВЕДЕНИЕ МЕТАЛЛСОДЕРЖАЩИХ ПЛЁНОК НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА В ВОДНЫХ РАСТВОРА

**А.А. Годзишевская, Е.П. Лопашина, А.А. Снегирёва, М.Н. Курасова**

*Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы,  
улица Миклухо-Маклая, дом 6, Москва, 117198, Россия*

*E-mail: kovalevskaya2804@mail.ru*

Поведение биологически активных покрывных материалов в водных растворах является важной характеристикой для определения области применения, а также возможностей использования в качестве лекарственных средств. Динамика изменения этих показателей во времени при стандартных условиях хранения материалов определяет один из параметров срока годности получаемых плёнок [1]

Методом отливания из раствора были получены иридий- и родийсодержащие плёнки трех типов: на основе хитозана, хитозан-желатиновой и хитозан-агаровой смеси. Степень и константу набухания определяли в водном растворе, а также в соляном буферном растворе с  $pH=7,2$ , соответствующим по набору ионов и кислотности биологическим средам организма.

Добавление катионов металла в плёнки изменяет характер набухания. Матрицы, не содержащие соль, неограниченно набухают как в водном, так и в буферном растворе. При увеличении концентрации металла в плёнках степень набухания уменьшается. константа скорости набухания растёт.

Способность впитывать влагу при хранении в стандартных условиях падает в течение двух месяцев, что говорит об увеличении прочности материалов. Также состав растворителя напрямую влияет на изучаемые показатели. В буферном соляном растворе степень набухания меньше, чем у соответствующих образцов в дистиллированной воде.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ № 23-23-00022.*

### Список литературы

1. Su JinLee. Multifunctional chitosan/tannic acid composite films with improved anti-UV, antioxidant, and antimicrobial properties for active food packaging // Food Hydrocolloids Vol. 136, A, March 2023. #108249.

## ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА

**Н.А. Шарикова<sup>1</sup>, А.Ю. Вдовиченко<sup>1</sup>, Р.В. Шариков<sup>1</sup>, Т.Е. Григорьев<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,  
пл. Академика Курчатова, Москва, 123098, Россия*

<sup>2</sup> *Московский физико-технический институт, Институтский пер. 9,  
Долгопрудный, 141700, Россия*

*E-mail: nata\_glushkova@bk.ru*

Создание электрохимических устройств, работающих на субстрате биологического происхождения, то есть биотопливных элементов (БТЭ), является популярным направлением

во многих исследовательских лабораториях. Принцип действия БТЭ основан на превращении химической энергии в электрическую за счет метаболической активности ферментов или бактериальных клеток. Модель БТЭ представляет собой ячейку, которая состоит из двух электродов – анода и катода, погруженных в буферный раствор. В анодном отделении происходит анаэробное окисление органического вещества ферментами, при этом выделяются электроны и протоны, мигрирующие в катодное отделение через мембрану. Одним из применений этих устройств является очистка сточным вод с сопутствующим получением электроэнергии, при этом важной задачей является выбор материала электродов. Материал должен обладать высокой электропроводностью, развитой удельной поверхностью, хорошими адгезивными свойствами, а также быть не токсичным [1, 2]. Композиционные материалы на основе природных полимеров (например, хитозана) с добавлением проводящих компонентов (углеродные нанотрубки, графен, графит, технический углерод) могут удовлетворить перечисленным выше требованиям [3].

В данной работе разработан метод получения высокопористых электропроводящих композиционных материалов на основе хитозана с добавлением частиц технического углерода, а также исследованы структурные, проводящие и механические характеристики композитов.

Композиционные материалы получали методом лиофилизации из 2 % раствора хитозана с различным процентным соотношением технического углерода (ТУ): от 0 до 100% от массы полимера. Структуру полученных композитов исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (рисунок 1).

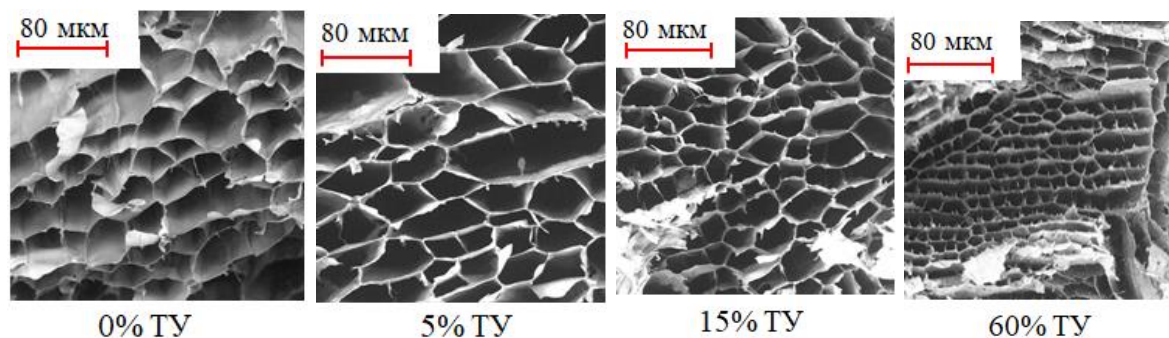


Рис. 1. Изображения структуры композитов

По изображениям определяли средний размер пор и строили гистограммы распределения для каждого образца. Также исследовано влияние количества наполнителя на удельную площадь поверхности и проведены исследования зависимости скорости заморозки композиционных суспензий от содержания ТУ.

Электропроводящие свойства изучали методом диэлектрической спектроскопии. В результате определили концентрацию ТУ, при которой происходит образование перколяционной сетки наполнителя. По результатам механических испытаний построены графики зависимости модуля Юнга и прочности от концентрации ТУ и определено оптимальное количество наполнителя.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-13-00321).*



### Список литературы

1. Биоэнергетика для автономных роботов. Перспективные решения и современное состояние / П.М. Готовцев [и др.] // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. 2015. Т. 11, № 2. С. 49–58.
2. Тарасов С.Е. Свойства биосенсоров и микробных топливных элементов при исследовании методом импедансной спектроскопии. 2018. 150 р.
3. Биотопливные элементы на основе наноуглеродных материалов / В.А. Алферов [и др.] // Радиоэлектроника. Наносистемы. Информационные технологии. 2014. Т. 6, № 2. С. 187–208.

## ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ *BACILLUS SUBTILIS* И КОМПОЗИТАМИ ХИТОЗАНА С ОКСИКОРИЧНЫМИ КИСЛОТАМИ НА АКТИВНОСТЬ PR-ГЕНОВ И УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ К ФИТОФТОРОЗУ

Л.Г. Яруллина<sup>1,2</sup>, Е.А. Черепанова<sup>1</sup>, Г.Ф. Бурханова<sup>1</sup>, А.В. Сорокань<sup>1</sup>,  
Е.А. Заикина<sup>1</sup>, В.О. Цветков<sup>2</sup>, И.С. Марданшин<sup>3</sup>, И.Я. Фаткуллин<sup>1</sup>,  
И.В. Максимов<sup>1</sup>, Ж.Н. Калацкая<sup>4</sup>, Н.А. Еловская<sup>4</sup>, В.В. Николайчук<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, проспект Октября, дом 71, Уфа, 450054, Россия

<sup>2</sup> Уфимский университет науки и технологий, ул. Заки Валиди, дом 32, Уфа, 450076, Россия

<sup>3</sup> Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, ул. Рихарда Зорге, дом 19, Уфа, 450054, Россия

<sup>4</sup> Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси, ул. Академическая, дом 27, Минск, 220072, Беларусь

<sup>5</sup> Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси, ул. Франциска Скорины, дом 36, Минск, 220141, Беларусь  
E-mail: yarullina@bk.ru

Известна роль бактерий рода *Bacillus* в повышении устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды посредством широкого спектра механизмов, включая синтез фитогормонов и увеличение доступности минералов для растений. К недостаткам биопестицидов относятся относительно низкая скорость уничтожения патогенов и высокая чувствительность к неблагоприятным факторам окружающей среды [1]. Актуальной представляется задача повышения стабильности и разнообразия спектра действия микробиологических препаратов путем дополнения биологически активными веществами. В связи с этим, предметом нашей работы было влияние конъюгатов хитозана с кофейной (Хит–КК) и феруловой (Хит–ФК) кислотами и их комбинированных препаратов с эндофитными бактериями *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11ВМ на экспрессию генов патоген-индуцируемых белков и степень пораженности растений картофеля, инфицированных возбудителем фитофтороза.

Степень пораженности определяли как процент поврежденной патогеном площади листьев. Хит–КК не оказывал влияния на этот параметр, а обработка растений Хит–ФК, штаммами *B. subtilis* и комбинациями *B. subtilis* + Хит–КК или Хит–ФК приводила к повышению устойчивости к *P. infestans* с уменьшением степени пораженности. Индивидуальная обработка растений Хит–ФК и *B. subtilis* 11 ВМ приводила к уменьшению площади поражения на 30% и 40% соответственно. Обработка *B. subtilis* 26Д в наибольшей степени снижала степень пораженности, а добавление гидроксидинаматов хитина, в частности Хит–ФК, значительно повышало эффективность *B. subtilis* 26Д. Обработка Хит–КК и Хит–ФК в сочетании с инокуляцией *B. subtilis* 11ВМ снижала восприимчивость к *P. infestans* по сравнению с контрольными растениями и индивидуальной обработкой Хит–ФК.

Исследовали влияние *Bacillus* и конъюгатов хитина с гидроксидинаматами на уровень транскриптов генов, кодирующих белки PR–1 (маркер салицилат-зависимого сигнального пути), PR–3 (хитиназа), PR–5 (тауматиноподобный ингибитор), PR–6 (ингибитор протеиназы, маркер жасмонат-зависимого сигнального пути), PR–9 (пероксидаза), PR–10 (рибонуклеаза), метилтрансферазу и пролинсинтазу в интактных и инфицированных *P. infestans* растениях. Обработка картофеля клетками *Bacillus* spp. не влияла на уровень транскрипции исследуемых генов у незараженных растений. Уровень транскриптов генов StPR3, StPR9 и StPR10, в отличие от StPR1 и StPR6, был повышен при инокуляции *P. infestans*. Обработка растений картофеля конъюгатами хитина с гидроксидинаматами повышала уровень транскрипции генов StPR1, StPR3, StPR6 и StPR9 и не изменяла транскрипцию гена StPR5 в листьях растений, инфицированных *P. infestans*.

*Bacillus* sp. стимулировали увеличение уровня транскрипции StPR1, StPR6 и метилтрансферазы в два раза, а StPR9 – в четыре раза у инфицированных растений. Уровень транскрипции StPR5 повышался у зараженных растений, обработанных *B. subtilis* 26Д, но не на растениях, обработанных *B. subtilis* 11ВМ. Обработка растений штаммами бактерий *B. subtilis* 26Д и 11ВМ совместно с конъюгатами хитина с гидроксидинаматами дифференциально повышала уровень транскрипции StPR1, StPR3, StPR5, StPR6 и StPR9.

Обработка растений исследуемыми штаммами способствует развитию индуцированной системной устойчивости, опосредованной действием жасмоновой кислоты, о чем можно было судить по высокой скорости экспрессии гена PR-6, который считается маркером ИСУ у растений [2]. Известно, что развитие системной приобретенной устойчивости происходит, когда растение распознает биотрофный патоген или его возбудителей, и это способствует синтезу салицилатзависимых PR-белков [3], включая экспрессию гена PR–1 (маркера СПУ) [4].

Следует отметить, что у инфицированных растений, предварительно обработанных *B. subtilis* 26Д и 11ВМ совместно с композициями Хит–КК и Хит–ФК, наблюдался высокий уровень транскрипционной активности генов основного антимикробного белка PR–1 и ингибитора протеазы PR–6. Вполне возможно, что у этих растений салицилат- и жасмонат-зависимые пути были задействованы одновременно. У инфицированных растений, обработанных *B. subtilis* 26Д в комбинации с Хит–ФК, транскрипционная активность генов тауматиноподобного белка (PR–5) и пероксидазы (PR–9) значительно повышалась. Считается, что активность белков семейства PR-5 связана с повышением проницаемости мембран [5]. Зараженные растения, обработанные обоими исследуемыми штаммами *B. subtilis* в сочетании с Хит–ФК, проявляли значительное увеличение экспрессии гена PR–9, что коррелировало с их устойчивостью.

Таким образом, индукция устойчивости растений, опосредуемая рассматриваемыми штаммами бактерий в сочетании с композитами хитозана и оксикоричных кислот, может характеризоваться многогранным процессом прайминга, включающим экспрессию PR-генов и тонкую настройку регуляции окислительно-восстановительного статуса растений.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 23-16-00139).*

### Список литературы

1. Chandler D., Bailey A.S., Tatchell G.M., Davidson G., Greaves J., Grant W.P. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2011. Vol. 366, N 1573. P. 1987–1998.
2. Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Role of jasmonic acid in interaction of plants with plant growth promoting *Rhizobacteria* during fungal pathogenesis / In: *Jasmonic Acid: Biosynthesis, Functions and Role in Plant Development, Series Plant Science Research and Practices*. Morrison L., Ed. Nova Sci. Publishers: USA, 2015. P. 33–66.
3. Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens // *Annual Rev. Phytopathol.* 2005. Vol. 43. P. 205.
4. Gimenez-Ibanez S., Solano R. Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens // *Frontiers in Plant Science.* 2013. Vol. 4. P. 72.
5. Vasyukova N.I., Ozeretskoykaya O.L. Jasmonate-dependent defense signaling in plant tissues // *Russian Journal of Plant Physiology.* 2009. Vol. 56, N 5. P. 581–590.

## Секция 5. БИОМЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ХИТИНА, ХИТОЗАНА И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

### СИНТЕЗ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЭФФЕКТИВНЫХ ГЕМОСТАТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

А.П. Луньков<sup>1</sup>, Н.Н. Дрозд<sup>2</sup>, А.В. Ильина<sup>1</sup>, В.П. Варламов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН,  
Ленинский проспект, дом 33, стр. 2, Москва, 119071, Россия*

<sup>2</sup> *ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Новый Зыковский пр-д, дом 4,  
Москва, 125167, Россия  
E-mail: fwnf1994@gmail.com*

Неконтролируемые кровотечения, возникающие при хирургических вмешательствах, травмах, а также полученные в условиях боевых действий [1] являются критическими состояниями и требуют незамедлительных действий [2]. Кровотечения из-за травм могут быть причиной потенциально предотвратимых смертей, в том числе, среди раненых в ходе боевых действий [3–5]. Около 50 % летальных случаев при повреждении магистральных сосудов связаны с неправильной тактикой/невозможностью своевременной остановки кровотечений. Простым и эффективным способом остановки кровотечений является использование местных гемостатических средств (МГС). В последнее время всё большую популярность набирают МГС на основе природного полисахарида хитозана и его производных [6].

Хитозан обладает множеством полезных свойств, определяющих его как перспективный материал для создания МГС. Важным свойством хитозана является наличие антимикробной активности. Антимикробные свойства полисахарида важны для материалов экстренной медицины, когда действовать нужно в полевых, нестерильных условиях. Биоразлагаемость хитозана избавляет от необходимости тщательного извлечения остатков материала. Биосовместимость снижает вероятность развития различных осложнений, связанных с применением гемостатика, например не вызывает термических ожогов, как минеральные гемостатики на основе каолина и цеолита. Считается, что механизм гемостатической активности хитозана обусловлен, прежде всего, электростатическими взаимодействиями с отрицательно заряженными молекулами, экспонированными на поверхности клеток крови (тромбоцитов, эритроцитов). Известно, что хитозан может индуцировать адгезию и агрегацию тромбоцитов, стимулировать адгезию эритроцитов [7, 8].

Тем не менее, вопрос эффективности МГС на основе хитозана в различных моделях и формах применения является дискуссионным. Так, МГС были эффективнее стандартной давящей повязки в контрольной группе в модельном эксперименте [9]. Марля, покрытая хитозаном обеспечивала гемостаз у пациентов с проникающей травмой конечности быстрее, чем обычная давящая повязка [10]. В тех случаях, когда традиционные методы гемостаза оказались неэффективными, хитозан показал более высокую эффективность [11]. В клинических исследованиях МГС на основе хитозана значительно сокращали время гемостаза {Formatting Citation}. Тогда как некоторые исследователи показали менее успешное применение кровоостанавливающих средств на основе хитозана [14]. В исследованиях

эффективности контроля кровотечения в модельном эксперименте ни один коммерческий гемостатик не превосходил стандартную марлю [15]. Эффективность МГС на модели с использованием свиней с закрытым летальным повреждением печени заметно не отличалась от марлевой тампонады [16]. В связи с этим клинические исследования по определению границ применимости, особенностей и эффективности коммерческих МГС продуктов продолжаются.

Хитозан состоит из звеньев глюкозамина и N-ацетилглюкозамина, положение которого в макромолекуле определяется особенностями процесса дезацетилирования исходного хитина. В последнее время многими исследователями активно изучается последовательность ацетилирования звеньев полимера [17]. Поскольку полимер получают главным образом из природных источников с использованием методов промышленной химии, подход с использованием химической модификации является более перспективным. Введение новых функциональных групп позволяет в значительной мере изменять свойства полимера. Тип и степень функционализации полимера оказывают лидирующее значение. Результаты исследований уверенно свидетельствуют о том, что производные хитозана обладают улучшенными гемостатическими свойствами [18]. Среди производных хитозана полифенольные и гидрофобные производные рассматриваются как наиболее перспективная основа МГС. Гидрофобные производные являются наиболее изученными с точки зрения механизма взаимодействия с кровью [19]. Тем не менее исследования влияния СЗ на гемостатический потенциал и возможный синергизм новых активных функциональных групп практически отсутствуют.

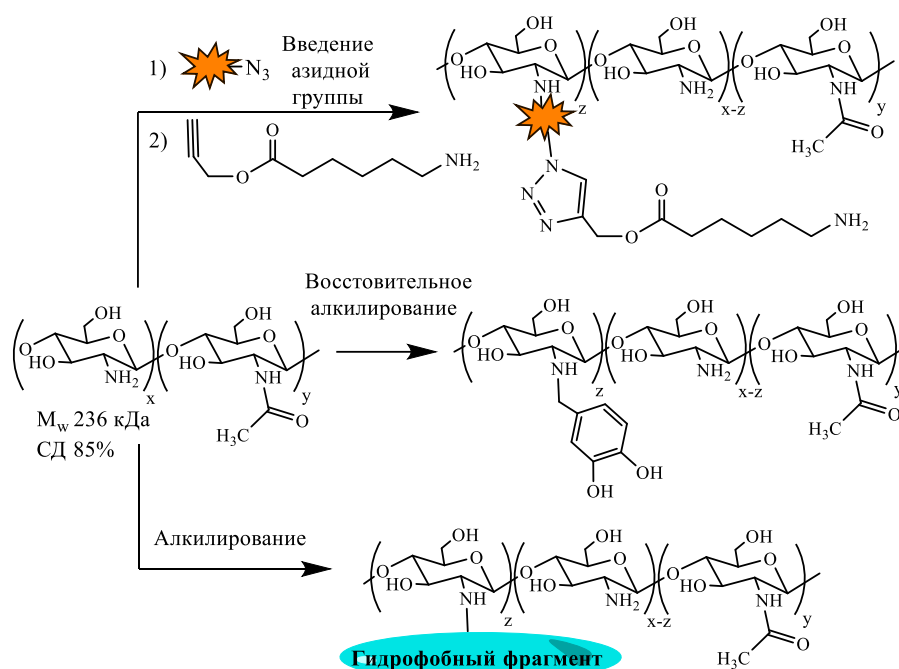


Рис. 1. Общая схема направлений химической модификации хитозана

Цель работы – синтез различных перспективных производных хитозана и исследование влияния на компоненты крови в экспериментах *in vitro*. В результате кислотного гидролиза был получен хитозан со следующими характеристиками:  $M_w$  236 кДа (ГПХ), СД 85 % (ПМР). На его основе был синтезирован и охарактеризован ряд различных производных хитозана. В

частности, производные, содержащие аминокaproную кислоту и 3,4-дигидроксibenзильный фрагмент, а также ряд гидрофобных производных хитозана. Ранее исследователями [20] было показано, что раствор производного хитозана со структурно схожей дигидрокофейной кислотой формирует плёнку при контакте с кровью. Согласно литературным данным схожими свойствами обладают и гидрофобные производные [21]. Два новых фрагмента в структуре полимера являются аналогами природных мотивов лизин-L-ДОФА адгезионных белков мидий. Общая схема химических превращений представлена на рисунке 1.

Для введения аминокaproновой кислоты в структуру производных хитозана был рассмотрен подход с использованием клик химии. Новые активные группы обеспечат усиление гемостатической активности хитозана за счёт улучшенной адгезии и антифибринолитической активности аминокaproновой кислоты.

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.*

### Список литературы

1. B.L. Bennett, L. Littlejohn. Review of new topical hemostatic dressings for combat casualty care // *Mil. Med.* 2014. Vol. 179. P. 497–514. DOI: 10.7205/MILMED-D-13-00199.
2. J. Granville-Chapman, N. Jacobs, M.J. Midwinter. Pre-hospital haemostatic dressings: A systematic review // *Injury.* 2011. Vol. 42. P. 447–459. DOI: 10.1016/J.INJURY.2010.09.037.
3. J.T. Howard, R.S. Kotwal, C.A. Stern, J.C. Janak, E.L. Mazuchowski, F.K. Butler, Z.T. Stockinger, B.R. Holcomb, R.C. Bono, D.J. Smith, Use of combat casualty care data to assess the US military trauma system during the Afghanistan and Iraq conflicts, 2001-2017 // *JAMA Surg.* 2019. Vol. 154. P. 600–608. DOI: 10.1001/jamasurg.2019.0151.
4. C.C. Clifford. Treating traumatic bleeding in a combat setting // *Mil. Med.* 2004. Vol. 169. P. 8–10.
5. M.A. Khan, M. Mujahid. A review on recent advances in chitosan based composite for hemostatic dressings // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. Vol. 124. P. 138–147. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.045.
6. M.N. Sundaram, A. Pradeep, P.K. Varma, R. Jayakumar. Different forms of chitosan and its derivatives as hemostatic agent and tissue sealants / in: *Adv. Polym. Sci., Springer Science and Business Media Deutschland GmbH*, 2021. P. 1–28. DOI: 10.1007/12\_2021\_98.
7. Q. He, K. Gong, Q. Ao, T. Ma, Y. Yan, Y. Gong, X. Zhang. Positive charge of chitosan retards blood coagulation on chitosan films // *J. Biomater. Appl.* 2011. Vol. 27. P. 1032–1045. DOI: 10.1177/0885328211432487.
8. T.C. Chou, E. Fu, C.J. Wu, J.H. Yeh, Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. Vol. 302. P. 480–483. DOI: 10.1016/S0006-291X(03)00173-6.
9. B. Gegel, J. Burgert, B. Cooley, J. MacGregor, J. Myers, S. Calder, R. Luellen, M. Loughren, D. Johnson. The effects of bleed arrest, celox, and traumadex on hemorrhage control in a porcine model // *J. Surg. Res.* 2010. Vol. 164. P. e125–e129. DOI: 10.1016/J.JSS.2010.07.060.
10. H.R. Hatamabadi, F.A. Zarchi, H. Kariman, A.A. Dolatabadi, A. Tabatabaey, A. Amini, Celox-coated gauze for the treatment of civilian penetrating trauma: A randomized clinical trial // *Trauma Mon.* 2015. Vol. 20. P. 42–46. DOI: 10.5812/traumamon.23862.
11. S.S.C. Goh, P. Nand, P. Alison, Successful use of celox (chitosan) as a haemostatic agent in cardiothoracic surgery // *Hear. Lung Circ.* 2019. Vol. 28. # S113. DOI: 10.1016/j.hlc.2019.02.135.

12. J.S. Roberts, J. Niu, J.A. Pastor-Cervantes. Comparison of hemostasis times with a chitosan-based hemostatic pad (Clo-SurPlus Radial™) vs mechanical compression (TR Band®) following transradial access: A pilot study // *Cardiovasc. Revasc. Med.* 2019. Vol. 20. P. 871–874. DOI: 10.1016/J.CARREV.2018.11.026.
13. M. Welch, J. Barratt, A. Peters, C. Wright. Use of topical hemostatic dressings in an extended field care model // *J. Spec. Oper. Med.* 2021. Vol. 21. P. 63–65. DOI: 10.55460/WTUP-GEE0.
14. L.F. Littlejohn, J.J. Devlin, S.S. Kircher, R. Lueken, M.R. Melia, A.S. Johnson. Comparison of 4 hemostatic agents, CELOX-A, ChitoFlex, WoundStat, and Combat Gauze, versus standard gauze dressing in control of extremity hemorrhage in a limited access swine model of penetrating combat trauma // *Wilderness Environ. Med.* 2010. Vol. 21. # 69. DOI: 10.1016/j.wem.2009.12.038.
15. J.J. Devlin, S. Kircher, B.G. Kozen, L.F. Littlejohn, A.S. Johnson, Comparison of ChitoFlex®, CELOX™, and QuikClot® in control of hemorrhage // *J. Emerg. Med.* 2011. Vol. 41. P. 237–245. DOI: 10.1016/j.jemermed.2009.02.017.
16. H. Qin, L. Yang, D. Liu, S. Chen, M. Lyu, Q. Bao, X. Lai, H. Liu, Q. Chen, Z. Zong. Efficacy of a temporary hemostatic device in a swine model of closed, lethal liver injury // *Mil. Med.* 2020. Vol. 185. P. E742–E747. DOI: 10.1093/MILMED/USZ372.
17. M. Aghbashlo, H. Amiri, S.M. Moosavi Basri, H. Rastegari, S.S. Lam, J. Pan, V.K. Gupta, M. Tabatabaei. Tuning chitosan's chemical structure for enhanced biological functions // *Trends Biotechnol.* 2022. P. 1–13. DOI: 10.1016/j.tibtech.2022.11.009.
18. H. Jin, Z. Wang. Advances in alkylated chitosan and its applications for hemostasis // *Macromol.* 2022. Vol. 2. P. 346–360. DOI: 10.3390/macromol2030022.
19. I.C. Macintire, M.B. Dowling, S.R. Raghavan. How do amphiphilic biopolymers gel blood? An investigation using optical microscopy // *Langmuir.* 2020. Vol. 36. P. 8357–8366. DOI: 10.1021/acs.langmuir.0c00409.
20. K. Kim, J.H. Ryu, M.Y. Koh, S.P. Yun, S. Kim, J.P. Park, C.W. Jung, M.S. Lee, H. Il Seo, J.H. Kim, H. Lee. Coagulopathy-independent, bioinspired hemostatic materials: A full research story from preclinical models to a human clinical trial // *Sci. Adv.* 2021. Vol. 7. P. 1–13. DOI: 10.1126/sciadv.abc9992.
21. M.B. Dowling, R. Kumar, M.A. Keibler, J.R. Hess, G. V. Bochicchio, S.R. Raghavan, A self-assembling hydrophobically modified chitosan capable of reversible hemostatic action // *Biomaterials.* 2011. Vol. 32. P. 3351–3357. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.033.

## **ИННОВАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ СШИТЫХ И ТЕРМООБРАТИМЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ ДЛЯ НОВЫХ МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ**

**Н.Р. Кильдеева, В.А. Захарова, О.В. Баранов**

*Российский государственный университет имени А.Н. Косыгина, Москва, 119071, Россия  
Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова, Москва, 119334, Россия  
E-mail: kildeeva@mail.ru*

Разработка биомиметических гидрогелевых каркасов для направленного восстановления поврежденных или утраченных тканей и органов, с применением клеточных технологий и

новых биоматериалов, является ключевым направлением в тканевой инженерии. Использование гидрогелевых материалов на основе полисахаридов, демонстрирующих структурную и биомеханическую совместимость с тканями живого организма, в настоящее время рассматривается как один из наиболее перспективных подходов к созданию искусственного матрикса для тканевой инженерии и имплантатов для реконструктивной хирургии. В последнее время значительный интерес для создания тканеинженерных конструкций вызывает аддитивная технология 3D-печати благодаря способности формировать трехмерные сложные конструкции практически любой формы из цифровой модели, с высокой скоростью и разрешением [1]. Фундаментальное понимание закономерностей гелеобразования в растворах полисахаридов и композициях на их основе и поиск методов управления их структурой и свойствами приобретает особое значение в связи необходимостью решения технологических задач в инновационных областях технологии создания материалов для регенеративной медицины. Данные решения непосредственно повлияют на улучшение качества жизни пациентов, имеющих показания к операциям по реконструкции поврежденных тканей и органов с использованием тканеинженерных биополимерных конструкций.

Перспектива использования хитозана в качестве основы биосовместимых и биodeградируемых матриц для тканевой инженерии обусловлена его уникальными физическими, химическими и биологическими свойствами, отсутствием токсического воздействия на живой организм. Композиционные гидрогели на его основе, обеспечивают структурную целостность формируемых конструкций, контролируют доставку лекарств и ферментов, поддерживают адгезию и функциональную активность клеточных культур. На сегодняшний день, актуальной проблемой является конструирование манипулятивной индивидуальной высокопроизводительной печатной установки и создание гидрогелевых чернил на основе экологически чистых биополимеров природного происхождения, предназначенных для технологий 3D-печати. Одним из аспектов решения этой проблемы является разработка хитозансодержащих композиций, пригодных для использования в качестве печатных гидрогелевых чернил, и изучение условий их отверждения.

В основе процесса гелеобразования в растворах полисахаридов лежат механизмы, вызывающие формирование стабильной или термообратимой трехмерной сетки, причем характер и число узлов сетки зацеплений определяет реологические и механические свойства геля. Для технологии 3D-печати важным является определить условия, при которых раствор полимера проявляет способность к течению, но обладает значительной вязкостью и может использоваться в качестве печатных «чернил», и параметры перехода к упругому телу матрикса [2]. Печатные «чернила» должны послойно накладываться друг на друга без слияния, а гелеобразование должно моментально происходить после экструзии, во избежание блокировки сопла, путем его закупоривания. В докладе рассмотрены основные задачи в области управления процессом гелеобразования в термообратимых полимерных системах на основе растворов нейтральных и ионогенных полисахаридов. Решение этих задач требует комплексного подхода как в отношении целенаправленного выбора состава высокогидратированных композитных и гибридных полимер-матричных материалов и дополнительного воздействия на формирование системы взаимодействий в гидрогелевой матрице, так и получения заданного уровня упругих свойств и адгезии клеточного материала.

Изучение кинетики и механизма гелеобразования в растворах хитозана с разной ММ и степенью протонирования аминогрупп показало ограничения метода ковалентной сшивки в



растворах хитозана: использование в качестве печатных «чернил» гелеобразующих систем, содержащих дженипин и глутаровый альдегид, не обеспечивает быстрое отверждение. Кроме того, использования полифункциональных реагентов ковалентного типа, приводит к необратимой сшивке и невозможности повторной эксплуатации элементов оборудования 3D-принтера. С целью определения возможностей воздействия на процесс гелеобразования исследована кинетика изменения вязко-упругих свойств и механизм гелеобразования в растворах каррагинана, агара и некоторых других термообратимых полисахаридов и установлены температурно-концентрационные диапазоны, определяющие формирование устойчивой системы водородных связей, ответственных за упругие свойства гидрогелей. Разработаны оптимальные условия перехода от текучих полимерных систем к упругому телу матрикса, форма которого задана и адаптирована для считывания 3D-биопринтером.

Предложенный подход к адаптации гидрогелей полисахаридов к возможностям аддитивных технологий позволил реализовать метод инъекционной поршневой экструзии для 3D-печати термообратимыми и структурированными высокогидратированными системами на основе полисахаридов [3], что открывает новые перспективы для проектирования и производства трехмерных искусственных матриксов с топографической, биологической и биомеханической совместимостью с живыми тканями.

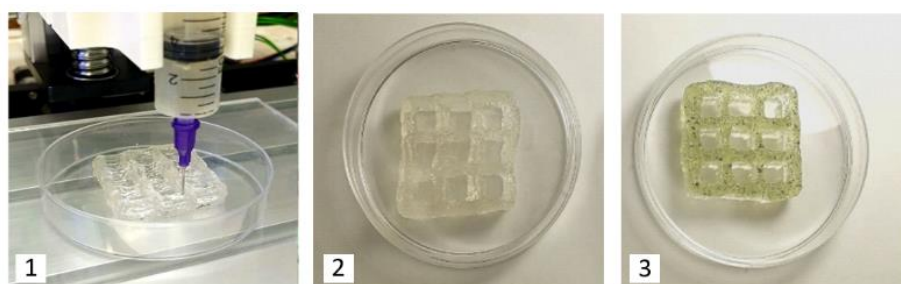


Рис. 1. Процесс печати 10-ти слойного каркаса горячими «чернилами» (1); охлажденный 10-слойный каркас (2); 10-слойный гидрогелевый каркас с инкорпорированными растительными клетками *C.vulgaris* (3) [3].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 22-13-00261).

### Список литературы

1. Champeau M. 4D printing of hydrogels: a review // *Advanced Functional Materials*. 2020. Vol. 30, N 31. # 1910606.
2. Kirchmayer D.M., Gorkin III R. An overview of the suitability of hydrogel-forming polymers for extrusion-based 3D printing // *Journal of Materials Chemistry B*. 2015. Vol. 3, N 20. P. 4105–4117.
3. 3D printing using iota-carrageenan-based hydrogel with immobilized *Chlorella vulgaris* microalgae / V.A. Zakharova, P.M. Gotovtsev, P.A. Poletaeva, A.G. Rogov, N.R. Kildeeva // *Nanobiotechnology Reports*. 2023. Vol. 18, N 1. P. 91–97.

# ОСОБЕННОСТИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КОВАЛЕНТНО СШИТЫХ СУПЕРМАКРОПОРИСТЫХ КРИОГЕЛЕЙ ХИТОЗАНА И КАРБОКСИМЕТИЛХИТОЗАНА

Ю.О. Привар<sup>1</sup>, А.В. Скатова<sup>1</sup>, А.В. Борода<sup>2</sup>, С.Ю. Братская<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт химии Дальневосточного отделения Российской академии наук,  
проспект 100-летия Владивостока, дом 159, Владивосток, 690022, Россия

<sup>2</sup> Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного  
отделения Российской академии наук, ул. Пальчевского, дом 17, Владивосток, 690041, Россия  
E-mail: privar.juliya@gmail.com

Разработаны способы получения супермакропористых биорезорбируемых материалов на основе хитозана и карбоксиметилхитозана (КМХ) для трехмерного культивирования опухолевых и нормальных клеток человека и тестирования *in vitro* эффективности противоопухолевых препаратов и комбинированных методов лечения опухолевых заболеваний.

Проанализировано влияние условий получения на состав (степень модификации сшивающим агентом), морфологию (размер пор и толщина полимерных стенок), степень набухания, реологические и фильтрующие характеристики криогелей, сшитых диглицидиловыми эфирами 1, 4-бутандиола (ДГЭ 1,4-БД), этиленгликоля (ДГЭ ЭГ), полиэтиленгликоля с  $M \sim 500$  (ДГЭ ПЭГ). Установлено, что время гелеобразования в растворе низкомолекулярного хитозана (30 кДа) при комнатной температуре увеличивается в ряду сшивающих агентов ДГЭ ПЭГ < ДГЭ 1,4-БД < ДГЭ ЭГ, сшивка КМХ реализуется только в частично замороженных растворах за счет эффекта криоконцентрирования.

Все материалы характеризовались широкопористой структурой, размер пор увеличивался в ряду сшивающих агентов ДГЭ ПЭГ < ДГЭ 1,4-БД < ДГЭ ЭГ, минимальный размер пор криогелей, которые в дальнейшем использовались для культивирования клеток, составлял  $89 \pm 16$  мкм, максимальный –  $300 \pm 100$  мкм. С учетом размера опухолевых клеток (10–20 мкм), во всех системах сохранялась возможность миграции клеток в объеме криогеля. В зависимости от условий сшивки степень набухания варьировала в диапазоне 2000–8000 %, при одинаковом мольном отношении ДГЭ : полимер набухание и вклад свободной воды были выше для криогелей КМХ. Максимальный вклад в набухание полимерная фаза вносила при сшивке ДГЭ ПЭГ. Несмотря на низкую степень модификации ДГЭ гликолей КМХ по сравнению с хитозаном, криогели КМХ имели подходящие для культивирования клеток механические характеристики и отличались высокой проницаемостью. Модуль Юнга полученных криогелей КМХ варьировал от 3 до 20 кПа, хитозана – от 20 до 55 кПа (при сжатии на 15 %). В циклах приложения и снятия нагрузки было показано, что, в отличие от хрупких криогелей, сшитых глутаровым альдегидом, полученные материалы выдерживают несколько циклов деформации со сжатием на 75 % и полностью восстанавливают форму при снятии нагрузки. Использование в качестве сшивающего агента ДГЭ ПЭГ значительно повысило эластичность криогелей хитозана по сравнению со сшивкой ДГЭ 1,4-БД.

Проведена оценка эффективности ферментативной деградации полимеров-прекурсоров и полученных криогелей хитозана и КМХ под действием коммерчески доступных ферментов (амилаза, бета-глюканаза, целлюлаза, лизоцим). Наблюдали выраженную зависимость

эффективности гидролиза от выбранного сшивающего реагента и мольного отношения при сшивке. Показано, что скорость и полнота гидролиза криогелей хитозана в зависимости от сшивающего реагента снижаются в ряду ДГЭ ПЭГ > ДГЭ ЭГ > ДГЭ 1,4-БД. Максимальная скорость и полнота гидролиза бета-глюканазой отмечена для криогелей, сшитых ДГЭ ПЭГ. При низкой степени сшивки (менее 0.1) в среде для культивирования клеток DMEM при температуре 37°C полнота гидролиза составила более 90 %. Для сравнения, полнота гидролиза трехмерной матрицы хитозана, полученной традиционным методом лиофилизации с переводом в основную форму без использования сшивающих агентов, при той же концентрации бета-глюканазы через 13 суток составляла менее 35 %.

Таким образом, была разработана серия материалов с широким диапазоном параметров структуры и химии поверхности для оценки влияния микроокружения на рост клеток в 3D условиях в стационарных и проточных режимах. Основные отличия криогелей КМХ и хитозана заключаются в: 1) разном заряде поверхности при физиологическом значении pH (низкий положительный заряд в случае хитозана, отрицательный заряд в случае КМХ); 2) более низкой степени модификации сшивающим реагентом криогелей КМХ из-за меньшего количества реакционноспособных первичных аминогрупп и гидроксильных групп в С6 положении; 3) более высокой степени набухания криогелей КМХ с большим вкладом свободной воды; 4) более низком значении модуля Юнга у криогелей КМХ при меньшей хрупкости (легче деформируются без разрушения структуры по сравнению с криогелями хитозана); 5) более высокой устойчивости криогелей КМХ к ферментативной деструкции.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-13-00399).*

## **СТИМУЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ ИМИНОВ ХИТОЗАНА И ЕГО КАРБОКСИАЛКИЛИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ**

**А.В. Скатова<sup>1</sup>, А.В. Пестов<sup>2</sup>, Ю.О. Привар<sup>1</sup>, А.В. Борода<sup>3</sup>, С.Ю. Братская<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Институт химии Дальневосточного отделения Российской академии наук,  
проспект 100-летия Владивостока, дом 159, Владивосток, 690022, Россия*

<sup>2</sup> *Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской  
академии наук, ул. Софьи Ковалевской, дом 20/22, Екатеринбург, 620108, Россия*

<sup>3</sup> *"Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского"  
Дальневосточного отделения Российской академии наук, ул. Пальчевского, дом 17,  
Владивосток, 690041, Россия*

*E-mail: militca2@mail.ru*

Разработаны стимул-чувствительные гидрогели на основе оснований Шиффа карбоксиалкилированных хитозанов. Исследовано формирование оснований Шиффа хитозана и карбоксиалкилхитозанов с преобладающим О-замещением (КМХ) и региоселективным N-замещением (КЭХ) с ароматическими альдегидами (салициловым (СА), метилбензисалициловым (МБСА) альдегидами и ванилином). Показано, что стабильность супрамолекулярных структур в растворах КЭХ по сравнению с хитозаном определяется более

высокой стабильностью динамической иминной связи в щелочной среде, а также образованием дополнительных внутри- и межмолекулярных водородных связей, для образования которых важно наличие свободных первичных аминогрупп и гидроксильных групп в С6 положении.

Установлено, что, помимо рН-стимула, на растворимость гидрогелей оснований Шиффа влияет присутствие аминокислот (химический стимул), что связано с протеканием реакции трансиминирования и высвобождением полимера из гидрогеля в раствор уже при физиологическом значении рН. Эффективность растворения гидрогелей в растворах аминокислот снижалась в ряду лизин > аргинин ≥ серин в соответствии с нуклеофильностью аминокислот. В зависимости от степени сшивки, время полного растворения полученных гидрогелей в среде для культивирования клеток DMEM варьировало от нескольких часов до 11 дней. Существенно меньшую цитотоксичность гидрогелей КЭХ с ванилином и МБСА по сравнению с гидрогелями салицилиминов КЭХ наблюдали при культивировании опухолевых клеток НСТ 116 и первичной культуры фибробластов человека (HDF 227).

Быстрое гелеобразование, низкая цитотоксичность и настраиваемая скорость растворения в физиологических условиях позволяют рассматривать полученные гидрогели оснований Шиффа карбоксиалкилхитозанов в качестве перспективных для инкапсулирования и высвобождения лекарственных средств, 3D-печати, культивирования клеток и других биомедицинских приложений.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-13-00399).*

## **ПЕРЕВОД НАНОЧАСТИЦ ЖЕЛЕЗА ИЗ МИЦЕЛЛЯРНОГО РАСТВОРА В ВОДНЫЙ РАСТВОР ПОЛИМЕРА КАРБОКСИМЕТИЛХИТИНА**

**Л.Н. Широкова, В.А. Александрова**

*Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН,*

*Ленинский проспект, дом 29, Москва, 119991, ГСП-1, Россия*

*E-mail: shirokova@ips.ac.ru*

Целью настоящей работы являлась разработка одностадийного процесса для перевода наночастиц железа из их мицеллярного раствора в изооктане в водный раствор 6-О-карбоксиметилхитина (КМХ), исключая промежуточную стадию получения водной дисперсии наночастиц железа. Для достижения этой цели использовали УЗ-обработку гетерофазной системы изооктан–вода, содержащей наночастицы железа и полимер соответственно. В задачу работы также входило детальное изучение морфологии наночастиц железа в матрице КМХ с использованием атомно-силовой микроскопии (АСМ).

### **Материалы**

В работе использовали хитин ((1 → 4)-2-ацетиамидо-2-деокси-β-D-глюкан), получаемый из панцирей и клешней краба с  $M = (40-45) \times 10^4$  (“Биопрогресс”, Россия). Гидроксид натрия (х. ч.), 2-изопропанол (о.с.ч.) и монохлоруксусную кислоту (х.ч.) применяли без предварительной очистки. Мицеллярный раствор наночастиц железа в изооктане (“Ланаком”, Россия) использовали в качестве источника наночастиц. Наноразмерные частицы железа

получали радиационно-химическим восстановлением ионов железа  $\text{Fe}^{2+}$  активными восстановительными частицами радиолиза (сольватированными электронами, атомарным водородом или другими радикалами), генерируемыми излучением  $\gamma$ - $^{60}\text{Co}$  в обратно-мицеллярной системе  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - \text{H}_2\text{O} - \text{AOT} - \text{изооктан}$ . Для получения водно-органического мицеллярного раствора наночастиц железа использовали 0.15 М АОТ (“Acros Organics”), 0.3 М  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (ч. д. а.) и изооктан (ч. д. а.). Приготовленные растворы для удаления кислорода предварительно продували аргоном или гелием. Доза облучения составляла 10 кГр, степень гидратации  $\omega = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}] = 4.0$ .

## Методы

### *Синтез КМХ*

Водорастворимый КМХ с молекулярной массой  $8 \times 10^4$  и степенью карбоксилирования 1.0 получали из хитина согласно известной методике.

### *Синтез наночастиц железа, включенных в матрицу КМХ с использованием ультразвука.*

В сосуд для проведения озвучивания вводили водный раствор КМХ (0.5–2.0 мас. %), а затем добавляли порциями без перемешивания требуемое количество мицеллярного раствора наночастиц железа в изооктане в различном соотношении с учетом величины оптической плотности наночастиц. Ультразвуковую обработку полученных гетерофазных систем выполняли на установке УЗО-СТ (“Рэлтек”, Россия) с частотой 44 кГц. Время озвучивания варьировали в интервале 5–20 мин. Для того, чтобы избежать повышения температуры исследуемых растворов выше 20°C под действием ультразвука их охлаждали льдом.

### *Метод анализа*

Количественное определение содержания наночастиц железа при переходе наночастиц из органической фазы в водную, а также оценку их устойчивости в системах с КМХ проводили путем измерения интенсивности поглощения наночастиц железа при 290 нм на УФ-ВИД спектрофотометре “SPECORD M40” (“Carl Zeiss”, Германия) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 мм при 20°C. Для измерения использовали растворы сравнения – 0.15 М АОТ/изооктан и бидистиллированная вода.

### *Морфологический анализ наночастиц железа в матрице КМХ.*

Для измерения размеров наночастиц также использовали атомно-силовой микроскоп VerMad 2000 (“Nanotec Electronica”, Испания). Кантеливер NSG10 фирмы “NT-MDT” (Россия), длина 100 мкм, сечение  $35 \times 2$  мкм, материал – кремний, константа упругости 11.5 Н/м, резонансная чистота 255 кГц, радиус закругления острия не более 10 нм. Для атомно-силовой микроскопии важным вопросом является подбор подложки и условий нанесения на нее образцов наноразмерных частиц. Поскольку при использовании в качестве подложки стекла с напыленным слоем оксида индия–олова (ИТО) на поверхности ИТО формируются агрегаты наночастиц железа, то в настоящей работе было принято решение использовать в качестве подложки “атомарно-гладкую” слюду. Поверхность слюды имеет такую шероховатость, которая позволяет получить разрешение по высоте не менее 0.4 нм.

На поверхности наночастиц железа, полученных в обращенных мицеллах, находятся молекулы ПАВ (АОТ), которые существенно препятствуют определению истинного размера наночастиц. В связи с этим был использован специальный метод осаждения наночастиц из

мицеллярного раствора на поверхность слюды (спин-коатинг). На поверхность слюды, закрепленную на вращающейся подложке, наносился слой раствора, далее подложка раскручивалась, излишки раствора удалялись и образец высушивался при температуре воздуха 30°C. Затем полученная пленка обрабатывалась дистиллированной водой с целью визуализации отдельных наночастиц металла на поверхности слюды.

### Результаты и их обсуждение

На рис. 1 приведен электронный спектр мицеллярного раствора наночастиц железа в изооктане. Полоса поглощения в области 290 нм характерна для наночастиц железа и обусловлена поверхностным (локализованным) плазмонным резонансом металлических наночастиц. Коллоидные частицы со степенью гидратации  $\omega = 4$  были выбраны для дальнейших исследований, поскольку при такой величине  $\omega$  в электронных спектрах наблюдаются наиболее интенсивные и стабильные во времени полосы поглощения наночастиц.

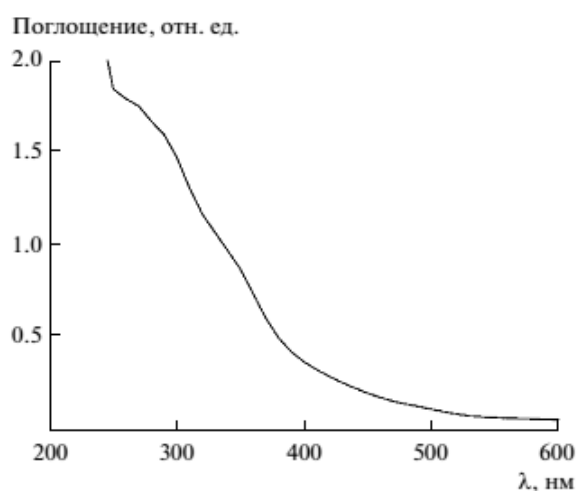


Рис. 1. Электронный спектр мицеллярного раствора наночастиц железа в изооктане, степень гидратации  $\omega = 4.0$

Из данных, приведенных на рис. 1 и таблицы 1, видно, что УЗ-обработка гетерофазной системы изооктан–вода приводит к значительному уменьшению оптической плотности наночастиц железа в верхнем слое – мицеллярном растворе наночастиц железа в изооктане. При этом увеличение времени сонирования способствует уменьшению концентрации наночастиц в верхнем слое и увеличению их концентрации в нижнем слое – водном растворе КМХ. Уменьшение концентрации наночастиц железа в верхнем органическом слое и увеличение их содержания в нижнем водном слое оценивали по соотношению оптической плотности наночастиц железа после УЗ-обработки и оптической плотности этих частиц в исходном мицеллярном растворе в изооктане (таблица 1). Из данных, приведенных в таблице видно, что уменьшение концентрации наночастиц железа в изооктане в результате УЗ-обработки гетерофазной системы приводит к симбатному увеличению интенсивности полос поглощения наночастиц железа в водном растворе полимера. Увеличение продолжительности УЗ-обработки способствует более полному переходу наночастиц железа в водный раствор КМХ.

С использованием метода ИК-Фурье-спектроскопии установлено, что за счет образования системы водородных связей между связью  $-N-H$  в амидной группе КМХ и связью  $-C=O$  в сложноэфирной группе ПАВ-стабилизатора наночастиц железа образуются устойчивые в воде трехкомпонентные системы, состоящие из ядра – металлических частиц

железа, стабилизированных гидрофобным ПАВ и гидрофильным КМХ [1]. Отметим, что величина оптической плотности наночастиц железа в композитных пленках не менялась в течение 6 месяцев.

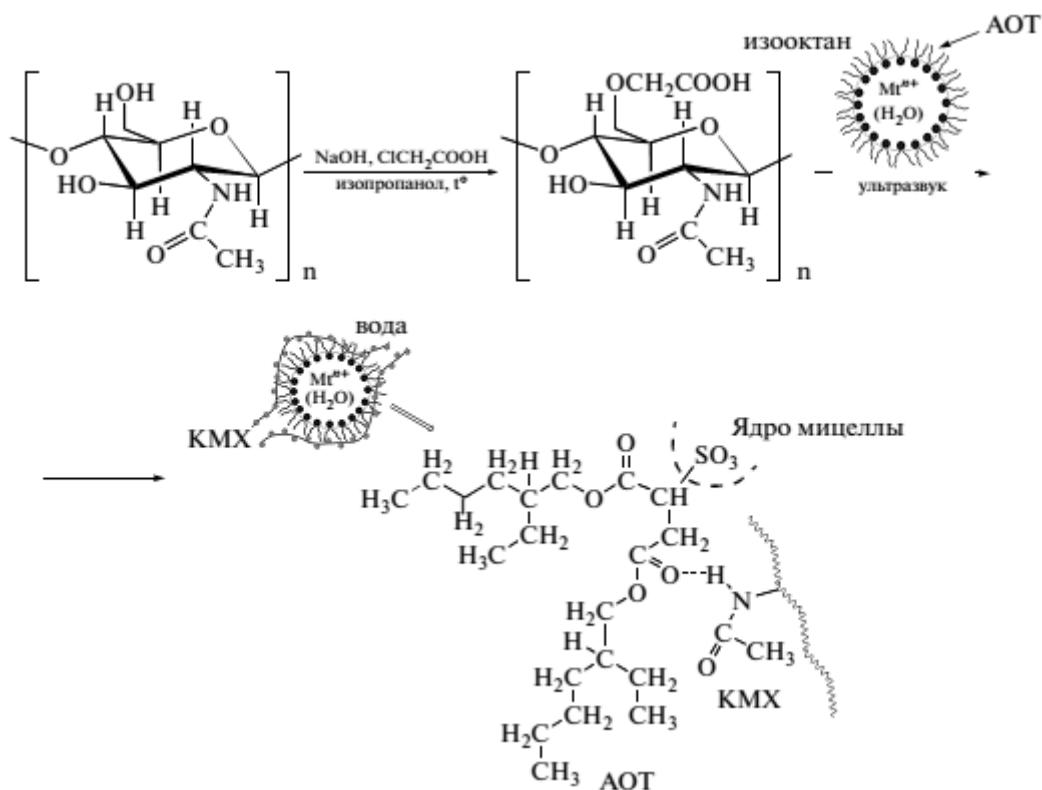
Таблица 1

**Влияние условий обработки гетерофазной системы КМХ–наночастицы железа ультразвуком, а также времени выдержки этой системы на содержание наночастиц железа в мицеллярном растворе и в растворе КМХ (0.5 мас. %) в области поглощения наночастиц железа 290 нм, рН 7.5**

Время выдержки системы после сонирования, сут	Содержание наночастиц железа, %					
	продолжительность сонирования, мин					
	5	10	20	5	10	20
	органический слой			водный слой		
1	72.46	50.72	43.48	22.18	38.10	52.08
7	38.99	23.19	21.74	52.08	65.63	77.30
14	10.0	16.42	8.04	88.96	81.67	90.63

Схема синтеза КМХ, транспорта наночастиц железа из мицеллярного раствора наночастиц железа в изооктане в водный раствор КМХ под действием ультразвука и их связывания за счет образования системы водородных связей представлена ниже.

При этом полимер в такой системе выступает не только в качестве пленкообразующего материала, но и выполняет функции стабилизатора наночастиц железа и модификатора, изменяющего сродство поверхности гидрофобной наночастицы железа к молекулам воды [1].



Схема

Для исследования морфологии частиц методом АСМ использовался сканирующий зондовый микроскоп в режиме атомно-силового микроскопа. На рис. 2 представлены 2D АСМ-изображения, топографический профиль и 3D АСМ-изображения поверхности пленок, сформированных из водного раствора КМХ (а, г, ж), мицеллярного раствора наночастиц железа со степенью гидратации  $\omega = 4$  (б, д, з) и системы КМХ–наночастицы железа (в, е, и) соответственно.

Сканирование проводилось в полуконтактной моде. Определение латеральных размеров наночастиц железа менее 10 нм затруднено в связи с использованием кантеливера с радиусом 10 нм, и, возможно, с не полным удалением молекул стабилизатора АОТ. Поэтому в дальнейшем, говоря о размерах наночастиц железа, мы будем говорить только об их размерах по оси Z.

АСМ-изображение пленки из 0.5 мас. % КМХ (рис. 2а, г, ж), полученной методом спин-коатинга, указывает на образование слоя КМХ шероховатостью около 1 нм, которая зависит от приложенного напряжения, времени осаждения и концентрации полисахарида.

Как видно из данных рис. 2в, е, и наночастицы железа в системе КМХ–наночастицы железа равномерно распределены в пределах пленки КМХ и размер частиц находится в интервале 3–4 нм, в то время как размер наночастиц железа в мицеллярном растворе достигает 9 нм (рис. 2б, д, з). Увеличение размера наночастиц железа, скорее всего, связано с присутствием следовых количеств молекул ПАВ (АОТ), которые существенно препятствуют определению истинного размера наночастиц.

Поверхность пленки, полученной из КМХ–наночастицы железа грубее, чем поверхность пленок как из КМХ, так и из наночастиц железа. Причиной могут служить хелатирующие и пленкообразующие свойства гидрофильного КМХ, который обладает способностью обволакивать наночастицы и адсорбироваться на поверхности наночастиц железа, предотвращая их агрегацию. Таким образом, процесс перевода наночастиц железа из их мицеллярного раствора в изооктане в водный раствор КМХ, используя УЗ-обработку гетерофазной системы оказывает существенное влияние на морфологию наночастиц железа.

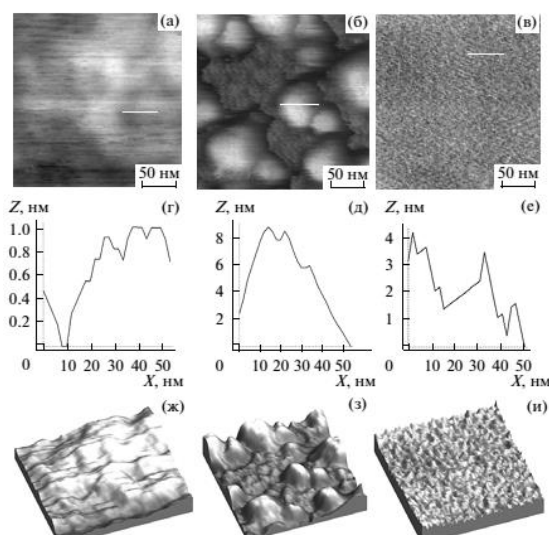


Рис. 2. АСМ-изображения, топографический профиль и 3D АСМ-изображения поверхности пленок, сформированных из водного раствора КМХ (а, г, ж), мицеллярного раствора наночастиц железа со степенью гидратации  $\omega = 4$  (б, д, з) и системы КМХ–наночастицы железа (в, е, и) соответственно



## Заключение

Таким образом, разработан одностадийный процесс перевода наночастиц железа из их мицеллярного раствора в изооктане в водный раствор 6-О-карбоксиметилхитина, исключая промежуточную стадию получения водной дисперсии наночастиц железа.

В свою очередь, наночастицы железа могут найти применение в области биомедицины (биосенсоры, магнитно-резонансная томография, маркеры биомолекул, управляемая локальная гипертермия опухолей, биосепарация и т.д.).

*Работа выполнена в рамках Госзадания Института нефтехимического синтеза РАН.*

## Список литературы

1. Alexandrova V.A., Shirokova L.N., Revina A.A. Carboxymethyl chitin as a matrix for composites with iron nanoparticles // Polym. Sci. B. 2010. Vol. 52, N 9–10. P. 621–627.

## ФОРМИРОВАНИЕ И СВОЙСТВА Si-ГЛЮКОМАННАН-ХИТОЗАНСОДЕРЖАЩИХ ГЛИЦЕРОГИДРОГЕЛЕЙ

**О.Н. Малинкина, Д.В. Приданкина, А.С. Астанкова, О.С. Ушакова, А.Б. Шиповская**

*Институт химии Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского, ул. Астраханская, дом 83,  
Саратов, 410012, Россия  
E-mail: Olga-Malinkina@yandex.ru*

При создании реконструктивно-терапевтических гидрогелевых материалов предпочтительным считается использование биосовместимого и биологически активного полимерного матрикса. Перспективными полимерами для формирования такого рода гидрогелевого матрикса являются природные полисахариды и их производные, в частности, нейтральный полисахарид разветвленного строения глюкоманнан (ГМ) и катионогенный линейный аминополисахарид хитозан (ХТЗ). В качестве модифицирующих добавок для получения на основе смесей данных полисахаридов гидрогелей с заданными свойствами в настоящей работе предлагается использовать тетраглицеролат кремния ( $\text{Si}(\text{OGly})_4$ ) – фармакологически активный золь-гель прекурсор, обладающий транскутанной способностью, коллагенстимулирующими и ангиогенными свойствами [1], аминокaproную кислоту (АМК) – кровоостанавливающий агент и регулятор pH, тетраборат натрия ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) – антисептик и структурообразователь, глицерин ( $\text{GlyOH}$ ) – влагоудерживающий агент, поддерживающий оптимальный гидробаланс дермальной ткани. Совместное использование приведенных компонентов в сочетании с ГМ и ХТЗ должно способствовать формированию биологически активных гидрогелей, значимо повышающих скорость эпителизации ран.

Цель работы – разработка и исследование физико-химических свойств Si-глюкоманнан-хитозансодержащих глицерогидрогелей, оценка *in vitro* антибактериальной активности, *in vivo* ранозаживляющего действия и *ex vivo* дермоадгезии наилучших образцов гидрогелей.

Использовали образец ГМ со средневязкостной молекулярной массой  $\bar{M}_\eta = 1400$  кДа (ГМ, ООО «Успех», РФ); два образца хитозана с  $\bar{M}_\eta = 38$  и 200 кДа в форме гидрохлорида (далее GX·XT3-38 и GX·XT3-200) с близкой степенью деацетилирования  $80 \pm 2$  мольн. % (ЗАО «Биопрогресс», г. Щелково, МО, РФ). Наилучшие образцы глицерогидрогелей получены смешением растворов 0.5 мас. % ГМ + 4 мас.% GX·XT3-38 в 4 % АмК + Si(OGly)<sub>4</sub> · 3 GlyOH + Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 20 GlyOH (далее ГМ + GX·XT3-38) и 0.2 мас. % ГМ + 4 мас.% GX·XT3-200 в 4% АмК + Si(OGly)<sub>4</sub> · 3 GlyOH + Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 20 GlyOH (далее ГМ + GX·XT3-200) в объемном соотношении 1 : 1 : 1 : 0.05. Значение pH многокомпонентных составов составило ~5.5.

Методом динамической реологии (Brookfield DV2T, США) изучена реокинетика гелеобразования многокомпонентной полисахаридсодержащей смеси. Время золь-гель перехода для систем на основе GX·XT3-38 составило  $4 \pm 1$  мин, GX·XT3-200 –  $2 \pm 1$  мин.

Динамическим зондовым методом (Surface Potential Sensor, NIMA KSV, Финляндия) измерен дзета-потенциал поверхности глицерогидрогелей, который для систем на основе ГМ + GX·XT3-38 и ГМ + GX·XT3-200 составил 0.148 и –0.233 мВ, соответственно.

Иммерсионным методом исследованы сорбционные свойства глицерогидрогелей в модельной жидкой среде Лас-SBF (pH=7.4,  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , имитация плазмы крови человека), дистиллированной воде (pH=6.0,  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) и в парах воды. Выявлена высокая сорбционная активность тестируемых образцов и их способность к биорезорбции в условиях, близким к физиологическим.

Методом диффузии в агар проведена оценка антибактериальной активности *in vitro* препаратов в отношении штаммов тест-культур шаровидных грамположительных *Staphylococcus aureus* и палочковидных грамотрицательных *Pseudomonas aeruginosa* относительно контроля (0.05%-ного раствора хлоргексидина биглюконата, ООО «Южфарм», РФ). Установлено, что в отношении *S. aureus* антибактериальная активность глицерогидрогелевой композиции на основе GX·XT3-38 и GX·XT3-200 составляет  $0.50 \pm 0.04$  и  $0.51 \pm 0.04$ , соответственно, в отношении *P. aeruginosa* –  $0.30 \pm 0.02$  и  $0.44 \pm 0.03$ , соответственно.

Методом отрыва (Tinius Olsen HIKS) в условиях преодоления сил адгезии гидрогелевого материала от дермальной поверхности кожи крыс оценены дермоадгезионные свойства *ex vivo* глицерогидрогелей в сравнении с фармацевтическим гидрогелевым препаратом «Метрогил Дента» (Unique Pharmaceutical Laboratories, Индия). Выявлено, что сила дермоадгезии гидрогелевого материала на основе ГМ + GX·XT3-38 равна  $11.7 \pm 0.6$  кПа, ГМ + GX·XT3-200 –  $16.2 \pm 0.8$  кПа, в то время как для контрольного препарата –  $13.2 \pm 0.7$  кПа.

На животной модели половозрелых нелинейных альбиносов крыс-самок определена гемостатическая и ранозаживляющая активность *in vivo* глицерогидрогелей в сравнении с контролем (ежедневная обработка препаратом «Левомеколь», АО НИЖФАРМ, РФ). При нанесении глицерогидрогелей на дно раны в течение 2-4 мин формируется монолитное формоустойчивое покрытие. Среднее время остановки кровотечения при закрытии резанной раны гидрогелевым материалом на основе ГМ + GX·XT3-38 составляет  $8.0 \pm 0.5$  мин, ГМ + GX·XT3-200 –  $6.0 \pm 0.4$  мин, препаратом «Левомеколь» –  $20.0 \pm 1.2$  мин. Показано, что разовая обработка резанной раны (наложение на дно раны глицерогидрогелевой композиции) снижает сроки заживления по сравнению с контролем. Средняя линейная скорость ранозаживления при использовании глицерогидрогелевой композиции на основе ГМ + GX·XT3-38 и ГМ + GX·XT3-200 составила  $9.9 \pm 0.5$  и  $7.6 \pm 0.4$  мм/сут, соответственно, а антибактериального коммерческого препарата «Левомеколь» в аналогичных условиях проведения эксперимента –  $2.4 \pm 0.1$  мм/сут. Установлено, что присутствие на резаной ране у

крыс Si-глюкоманнан-хитозансодержащих глицерогидрогелей не доставляло дискомфорта и не вызывало побочных эффектов у экспериментальных животных, а также не влияло на их двигательную активность и аппетит. За весь период наблюдения не было отмечено ни одного случая нагноения раны или осложненного течения раневого процесса.

Таким образом исследование биологических свойств глицерогидрогелей на основе ГМ + GX·ХТЗ-38 и ГМ + GX·ХТЗ-200 показало, что образующиеся *in vivo* на раневой поверхности монолитные формоустойчивые покрытия обладают высокой дермоадгезией и проявляют бактериостатические свойства, гемостатический эффект и высокое ранозаживляющее действие. Это, а также высокая сорбционная активность и способность к тестируемым образцам биорезорбции, показывает перспективность использования Si-глюкоманнан-хитозансодержащих глицерогидрогелей в качестве высокоэффективных раневых покрытий и фармацевтических биотрансплантатов.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям РФ (проект № 17313ГУ/2022).*

### Список литературы

1. Малинкина О.Н., Журавлева Ю.Ю., Шиповская А.Б. Ранозаживляющая активность *in vivo* глицерогидрогелевых пластин на основе аскорбата хитозана, *Алоэ Вера* и полиолата кремния // Прикладная биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. № 2. С. 179–184.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ КОСТНОГО ДЕФЕКТА КРИТИЧЕСКИХ РАЗМЕРОВ В ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДИФИЦИРОВАННОГО ХИТОЗАНА У ЖИВОТНЫХ С СУБКОМПЕНСИРОВАННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ I ТИПА

**И.Н. Большаков, А.А. Левенец**

*Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого,  
ул. Партизана Железняка, дом. 1, Красноярск, 660022, Россия  
E-mail: bol.bol@mail.ru E-mail: aalevenets@mail.ru*

### Введение

Известно, что добавление к высоко дезацетилованному гелю хитозана с высокой молекулярной массой растворов солей хондроитинсерной и гиалуроновой кислот, гепарина в определенных весовых соотношениях и температуре образует полиионные комплексы, способные при имплантации в костные дефекты критических размеров в челюстно-лицевой области восстанавливать целостность кости. В присутствии модифицированного хитозанового полиэлектролитного комплекса регистрируются ранние признаки ангиогенеза и образования новой кости, начиная с 7-х суток после экспериментального образования костного дефекта [1]. Заполнение обширной костной полости материалом chitosan ascorbate-alginate sodium-гидрохуаратит (CH-SA-НА), содержащим кватернизованный хитозан (CH), натриевую соль альгиновой кислоты (SA) и нано-структурированный гидроксипатит (НА)

показало, что к концу 4-й недели на томограмме регистрировалось 80% закрытие дефекта, а через 8 недель - 100%. через 10 недель после травмы признаков костного дефекта нет.

Недостаток инсулина, гипергликемия нарушает архитектуру и биомеханические свойства кости [2], [3], меняет соотношение основного минерального компонента гидроксиапатита и органического компонента – коллагена тип I [4]. Длительный воспалительный процесс при сахарном диабете сопровождается накоплением гликированных продуктов, которые перекрестно сшивают коллагеновые волокна как в трабекулярной, так и в кортикальной кости [5]. Это приводит к ухудшению механических свойств кости [6], значительно затрудняет регенерацию кости, особенно при наличии костной полости критического размера.

Перспективными материалами для закрытия костной полости критического размера сегодня рассматриваются природные полисахариды - хитозан и альгинат натрия. Эти материалы являются лучшими при использовании с целью регенерации кости [7], [8]. Схожесть молекулярной структуры хитозана, альгината натрия, хондроитинсерной и гиалуроновой кислот, гепарина сульфата, взаимное улучшение собственных биологических свойств в отношении регенерации тканей диктует необходимость создания сополимеров с высокой регенеративной способностью [9]. Такая реконструкция хитозана способна активизировать пролиферацию сосудистого эндотелия, эндотелизацию стенок костной полости и самой полисахаридной конструкции, запускать пролиферацию и дифференцировку остеобластов. Задача при использовании биоразлагаемого трехмерного каркаса состоит в поддержании функции и контроле деградации полимера в костной ткани до полноценного образования новой кости. Конечным результатом молекулярных преобразований является уменьшение индукции молекул остеокластогенеза со снижением зон лизиса кости и увеличение объема новообразованной кости, окружающей полисахаридные имплантаты.

### **Материалы и методы**

Гелевая масса «CS-SA-NA», содержащая 2 % раствор аскорбата хитозана (CS) с молекулярной массой 695 кДа и степенью деацетилирования 95 % (Восток-Бор-1, г. Дальнегорск, Россия; ТУ (№ 9289-067-004721224-97), в которой на 1 г сухого аскорбата хитозана приходится 100 мг хондроитинсульфата натрия, 100 мг гиалуроната натрия, 2,5-5 мг гепарина сульфата, 110 мкг\г сывороточного фактора роста крупного рогатого скота "адгелон", альгинат натрия (SA) 4%, содержащий 50% аморфного гидроксиапатита (НА) (5-20 нм), в соотношении аскорбата хитозана и альгината натрия 1:1 [10].

Для исследования использовали белых крыс-самок линии Вистар, масса 250 г, возраст на начало эксперимента 3 месяца. Исследования включали 5 групп животных по 10 крыс в каждой группе: 1 группа (контроль № 1, здоровые животные, регенерация костной полости под кровяным сгустком); 2 группа (контроль № 2, животные с моделью субкомпенсированного сахарного диабета, регенерация костной полости под кровяным тромбом); 3 группа (контроль № 3, животные с моделью субкомпенсированного сахарного диабета, регенерация костной полости при заполнении костного дефекта лиофилизированной коллагеновой губкой, полимер I типа, чистота продукта 99 %); 4 группа (контроль № 4, здоровые животные, регенерация костной полости при заполнении лиофилизированной массой CH-SA-NA); 5-я группа (опытная, животные с моделью субкомпенсированного сахарного диабета, заполнение костного дефекта лиофилизированной массой CH-SA-NA [1]. В каждой группе при морфологическом анализе определяли периферические зоны, удаленные

от костной полости, и проводили сравнительный анализ костной регенерации в центральной и периферической зонах.

Разрушение бета-клеток поджелудочной железы достигалось однократной подкожной инъекцией чистого аллоксангидрата в дозе 35 мг/крысу на фоне предварительного 48-часового голодания. Уровень сахара в периферической крови определяли с помощью глюкометра EasyTouch GCNб (Нидерланды). Срок наблюдения за животными после развития сахарного диабета I типа составил 30 дней. После устойчивого развития состояния гипергликемии в течение 10 дней при уровне сахара в периферической крови выше 10 ммоль/л было добавлено ежедневное подкожное введение инсулина в дозе 2 МЕ (Биосулин Р растворимый человеческий генно-инженерный; ОАО Компания Фармстандарт-УфаВИТА, Россия).

Под общей внутримышечной анестезией смесью Золетила 100 в дозе 3 мг/крысу и Рометара в дозе 0,5 мг/крысу в асептических условиях выполняли, разрез в области нижнеальвеолярного отростка длиной 1,5-2 см, тупым путем отделяли жевательную мышцу вместе с надкостницей, обнажали кость в области угла. На альвеолярном отростке с помощью шаровидного бора создавали округлый трехстенный дефект размером 4 x 5 x 4 мм. Полость костного дефекта дренировали и заполняли лиофильной массой CH-SA-NA, коллагеновой губкой или аутокровяным сгустком. Дефект закрывали надкостницей, кожу - отдельными швами мононитью 5,0.

Морфологическое исследование проводили на микроскопе Olympus BX45 с приставкой для фото-видеодокументации Olympus DP 25 и пакетом программ Cell<sup>^</sup>D, а также при сканировании гистологических препаратов на гистосканере FLASH 250 3D HISTECH (Венгрия). Гистоморфометрическую оценку проводили по цифровым микрофотографиям, полученным с помощью программ «Cell<sup>^</sup>D» и «NIS-Elements Document», а морфометрические измерения проводили в программе «JMicroVision 1.2.7». Цифровые гистологические срезы, полученные в результате сканирования микропрепаратов на гистосканере, оценивали с помощью программы CaseViewer Ver.2.3 Build 2.3.9.99276 3D HISTECH (Венгрия).

Для объективной гистологической оценки восстановления костной ткани использовали критерии со стандартизированной номенклатурой [11]: • BV – объемная плотность костной ткани, процентное отношение объема, занимаемого костными структурами, к общему объему гистологического среза; • BTT – толщина костных трабекул (мм); • ITS – межтрабекулярные промежутки (мм); • OBS – остеобластическая поверхность костных трабекул; • OS – остеоидная поверхность костных трабекул, процентное соотношение площади костных трабекул, занятой остеоидом, к общей поверхности кости; • EC – эродированная (остеокластическая) поверхность костных трабекул, процентное соотношение поверхности костных трабекул с образованием лакун к общей поверхности кости, включает площадь, занятую остеокластами; • FS – свободная поверхность костных трабекул, процент незерозированной поверхности костных трабекул и поверхности, не занятой остеобластами, остеокластами, к общей поверхности кости.

### **Результаты исследования**

Статистический анализ данных и создание графических иллюстраций осуществлялись с использованием свободной программной вычислительной среды «R, версия 4.2.1» и языка программирования «R». Оценка полученных переменных в отношении соответствия нормальному (гауссовскому) распределению проводилась на основе критерия Шапиро-Уилка, а также на основе графического метода (Quantile-Quantile plot), статистика полученных

результатов представлена в виде медианы, 25% и 75% квартилей (Me[Q<sub>1</sub>;Q<sub>3</sub>]). Морфологические критерии остеогенеза в контрольных и опытных группах представлены на рисунках-графиках 1 и 2.

Таким образом, предложенная модель индуцированного сахарного диабета I типа у крыс в контроле 2 приводит через 4 недели после создания костного дефекта критических размеров к активации остеокластической реакции и эрозии костных стенок, угнетению остеобластической реакции при формировании костных трабекул, увеличению свободных костных поверхностей, обедненной клеточной массой различной функциональной направленности. Имплантация полиэлектролитного полисахаридного комплекса на основе модифицированного хитозана CH-SA-HA в область костного дефекта критического размера у здоровых крыс и крыс с индуцированным сахарным диабетом I типа способствует значительно более быстрым темпам восстановления костной ткани уже через 4 недели после оперативного вмешательства. Применение лиофилизированной коллагеновой губки на основе коллагена I типа достоверно свидетельствует об активации остеогенеза, несмотря на более низкие показатели по сравнению с результатами применения комплекса CH-SA-HA, и может быть использовано в комбинации с модифицированным хитозаном.

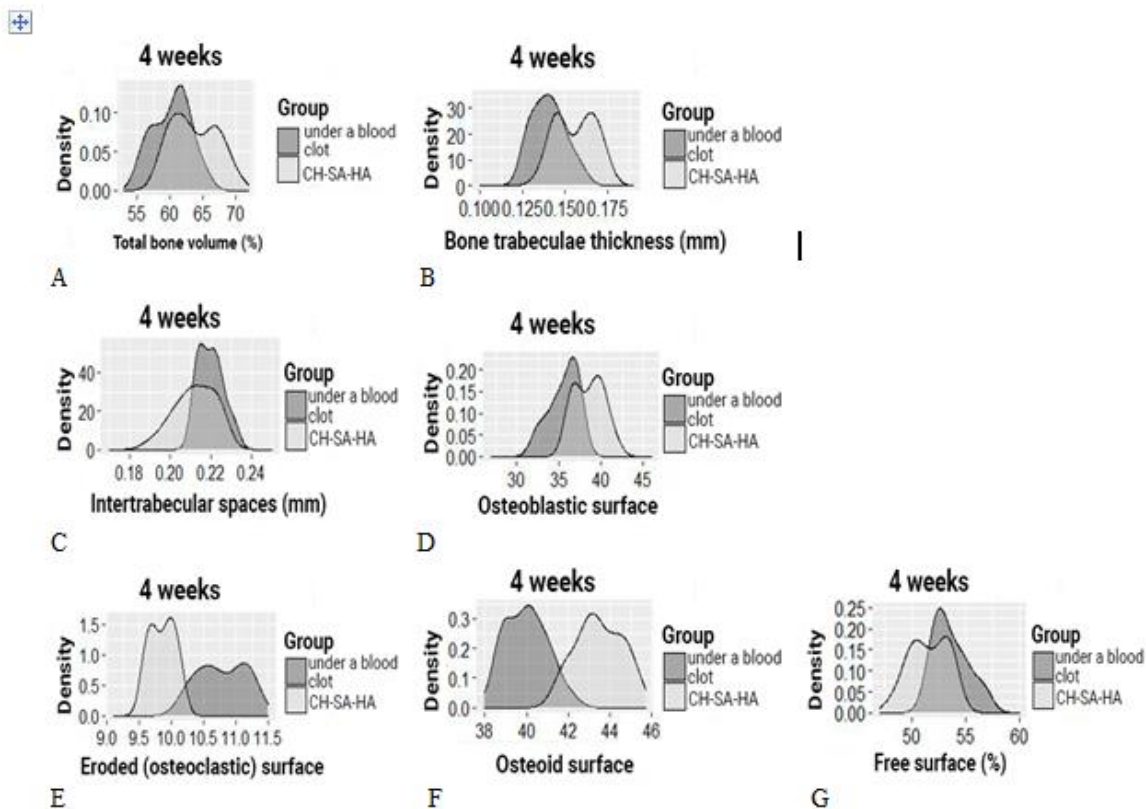


Рис.1. Гистоморфометрические критерии в костной полости критического размера у здоровых крыс через 4 недели после имплантации композиции CH-SA-HA

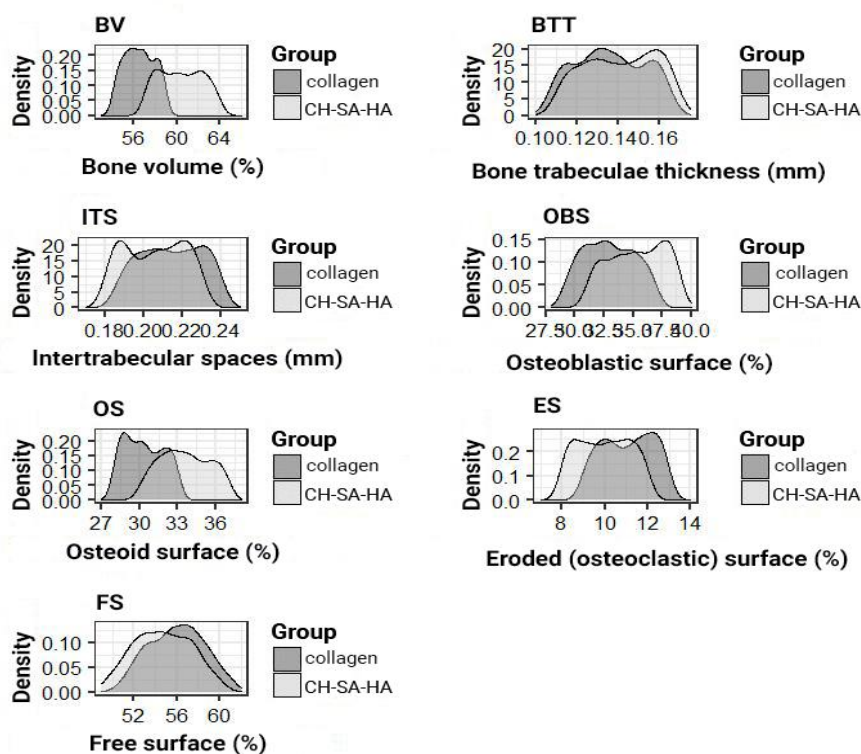


Рис. 2. Плотность распределения гистоморфометрических показателей в области дефекта костной ткани у крыс с субкомпенсированным сахарным диабетом в контроле (коллаген) и опыте (CH-SA-HA)

Работа выполнена при финансовой поддержке Красноярского регионального инновационно-технологического бизнес-инкубатора, ООО «Биоимплант», г.Красноярск, договор № 2/т от 13.09.2017). Комплексная научная тема проекта № 01201362513 (01.01.2013 – 01.01.2021)

### Список литературы

1. I.N. Bolshakov, A.A. Levenets, N.N. Patlataya, M.M. Nikolaenko, A.E. Dmitrienko, E.I. Ryaboshapko, N.D. Matveeva, I.G. Ibragimov, A.R. Kotikov, T.V. Furtsev. The Role of Modified Chitosan in Bone Engineering in Diabetes Mellitus: Analytical Review // Int. J. Dent. Oral. Health. 2021. Vol. 7, N 3. P. 1–13.
2. N. Napoli, M. Chandran, D.D. Pierroz, B. Abrahamsen, A.V. Schwartz, S.L. Ferrari. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility // Nat. Rev. Endocrinol. 2017. Vol. 13. P. 208–219.
3. N. Napoli, R. Strollo, A. Paladini, S.I. Briganti, P. Pozzilli, S. Epstein. The alliance of mesenchymal stem cells, bone, and diabetes // Int. J. Endocrinol. 2014. Vol. 2014, # 690783.
4. W.J. Landis. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. Bone. 1995. Vol. 16, P. 533–544.
5. W.D. Leslie, M.R. Rubin, A.V. Schwartz, J.A. Kanis. Type 2 diabetes and bone // J. Bone Miner. Res. 2012. Vol. 27, P. 2231–2237.
6. M. Saito, K. Marumo. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: A possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus // Osteoporos. Int. 2010. Vol. 21. P. 195–214.
7. S.D. Kozusko, C. Riccio, M. Goulart, J. Bumgardner, X.L. Jing, P. Konofaos. Chitosan as a bone scaffold biomaterial // J. Craniofacial Surg. 2018. Vol. 29, N 7. P. 1788–1793.

8. A.R. Costa-Pinto, R.L. Reis, N.M. Neves. Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan. Review // Tissue Eng. Part B Rev. 2011. Vol. 17, N 5. P. 331–347.
9. R. Spin-Neto, F.L. Coletti, R.M. de Freitas, C. Pavone, S.P. Campana-Filholo, R.A.C. Marcantonio. Chitosan-based biomaterials used in critical-size bone defects: radiographic study in rat's calvaria // Rev. Odontol. UNESP. 2012. Vol. 41, N 5. P. 312317.
10. Патент РФ № 2309748 «Способ лечения пародонтита при инсулинозависимом сахарном диабете препаратом «ХАГ-БОЛ» / Тумшевиц О.Н., Большаков И.Н., Зыкова Л.Д., Белоусова Ю.Б., Тумшевиц В.О., опубликован 10.01.2006, бюл.31.
11. D.W. Dempster, J.E. Compston, M.K. Drezner, F.H. Glorieux, J.A. Kanis, H. Malluche, P.J. Meunier, S.M. Ott, R.R. Recker, A.M. Parfitt. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee // J. Bone Miner. Res. 2013. Vol. 28, N 1. P. 2–17.

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ХИТОЗАНА ДЛЯ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ**

**П.А. Красочко<sup>1</sup>, А.И. Албулов<sup>2</sup>, М.А. Фролова<sup>2</sup>, И.А.Красочко<sup>1</sup>,  
В.И.Еремец<sup>2</sup>, Э.И. Зелинская<sup>2</sup>, В.П. Варламов<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Учреждение образования «Витебская государственная академия ветеринарной  
медицины», Витебск, Республика Беларусь

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт  
биологической промышленности, Щелково, Московской области, Российская Федерация  
E-mail: info@bioprogress.ru

**Аннотация.** Цель исследования – отработать способ концентрирования культуральной массы бацилл после реакторного культивирования с использованием хитозана для изготовления пробиотиков. Использование высокомолекулярного хитозана ММ 500 при концентрации 0,25% отмечается концентрирование в 1000 раз (с  $10^9$  до  $10^{12}$  КОЕ/мл, при использовании 0,5% раствора хитозана установлена концентрирование бактерий в 100 раз с  $10^9$  до  $10^{11}$  КОЕ/мл. Таким образом установлено, что с помощью высокомолекулярного хитозана возможно провести концентрирование бацилл в 100–1000 раз, что имеет перспективу для получения и использования бациллярных препаратов как в ветеринарии (в качестве ветеринарных препаратов), так и в животноводстве (в качестве кормовых добавок).

**Ключевые слова:** хитозан, бациллы, концентрирование, пробиотики.

### **Введение**

Вопрос концентрирования и очистки бактерий после культивирования реакторным способом является проблемой в биотехнологическом производстве. Особенно это касается жидких пробиотиков на основе бацилл. Бациллярные пробиотики имеют одно важное свойство – при переходе вегетативной формы микроорганизма в спорую сохраняется длительность его хранения в жидком виде. Но при реакторном культивировании концентрация микроорганизмов часто не достигает желаемой концентрации – реально можно получить 2–3 млрд микробных тел в мл. При такой концентрации для транспортировки и хранения



препаратов следует увеличить их концентрацию до 8–10 млрд. микробных тел в мл. Для этого необходимо провести концентрирование бактериальной массы.

Имеется ряд технологических приемов концентрирования

– центрифугирование в обычных центрифугах с использованием стаканов различного объема;

– центрифугирование с использованием сепараторных центрифуг;

– тепловая коагуляция белков;

– флокуляция;

– сорбция с использованием целлюлозы или полиакриламида и т.д.

В последние годы одним из перспективных методов концентрирования бактерий из культуральной суспензии бактерий является использование высокомолекулярного хитозана.

Хитозан – линейный полисахарид – производное природного биополимера – хитина, второго (после целлюлозы) по распространенности в природе органического вещества. Хитозан – основное производное хитина – получают промышленным способом путем химического или ферментативного деацетилирования хитина. В зависимости от условий реакции получают хитозаны, обладающие различной молекулярной массой и различной степенью деацетилирования. Запасы хитина биологически возобновляются и практически неисчерпаемы. Он входит в состав опорных тканей и внешнего скелета ракообразных (крабы, креветки, омары и т.п.), насекомых, оболочек клеток микроорганизмов, некоторых грибов и водорослей. Только морские ракообразные синтезируют его 10 млрд тонн в год. Хитозан является единственным природным катионным полисахаридом. Это придает ему особые свойства, объясняющие его применение во многих сферах

История исследований хитина и хитозана насчитывает около 200 лет. Хитин был открыт в 1811 году, а хитозан в 1859 году. В первой половине XX века к хитину и его производным был проявлен заслуженный интерес, в частности к его исследованию имели непосредственное отношение три Нобелевских лауреата: E. Fischer (1903) синтезировал глюкозамин, P. Karrer (1929) провел деградацию хитина с помощью хитиназы и, наконец, W.N. Haworth (1939) установил абсолютную конфигурацию глюкозамина.

До 1970 года по всем странам было опубликовано 78 патентов (кроме этого есть большое количество закрытых патентов), связанных с хитином и хитозаном. На сегодняшний день количество патентов, полученных по данной теме в мире, достигает 5000. Такое внимание к практическому использованию хитина и его производных обусловлено их уникальными свойствами, дающими большой положительный эффект в самых различных отраслях. В настоящее время известно более 100 областей применения хитозана и композиций на его основе.

Уникальные свойства биополимеров – хитина и его производных (высокая сорбционная способность, биосовместимость, биodeградируемость, нетоксичность, бактерицидность и др.) – и неисчерпаемые запасы сырья (панцири морских и пресноводных ракообразных, грибы, покровы насекомых) обуславливают все возрастающий интерес к их производству и практическому применению.

Цель исследования – отработать способ концентрирования культуральной массы бацилл после реакторного культивирования с использованием хитозана для изготовления пробиотиков.

### **Материалы и методы исследований**

Исследования проводились на кафедре эпизоотологии и инфекционных болезней, отраслевой лаборатории ветеринарной биотехнологии и заразных болезней животных УО

«Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины», ООО «Биопрогресс».

Для работы использован высокомолекулярный хитозан ММ 500, Степень деацетилирования 87 %, изготовленный в условиях ООО «Биопрогресс» (Щелково, Российская Федерация).

Бактериальную массу спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* БИМ В-454 Д, полученный путем глубинного культивирования бактерий получали виз биотехнологического центра ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси». Титр бактерий –  $3 \times 10^9$  КОЕ/мл

Для концентрирования бацилл на первом этапе проводили растворение хитозана ММ 500 в 1 % раствор уксусной кислоты. Для этого готовили его 2 % раствор. Растворение проводила с использованием 1% раствора уксусной кислоты, которую готовили путем смешивания 10 мл ледяной уксусной кислоты и 990 мл дистиллированной воды. К раствору кислоты добавляли 20 г хитозана ММ 500, тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 1 сутки

Далее в суспензию бацилл добавили 2% раствор хитозана ММ 500:

Для получения 0,25% концентрации – на 1 часть раствора хитозана ММ 500 добавили 7 частей бацилл;

Для получения 0,5 % концентрации – 1 часть раствора хитозана ММ 500 добавили 3 части сальмонелл;

При контроле рН должно быть от 5,0 до 6,0. Если рН идет в щелочную сторону – довести уксусной кислотой

Для контроля рН- использовать индикатор (фенолфталеин или феноловый красный) при кислой рН – фенолфталеин прозрачный, а феноловый красный – желтый; при щелочной рН – фенолфталеин и феноловый красный – малиновые

После тщательного перемешивания через 2–3 часа довести рН с помощью 10 % раствора едкого натра (NaOH) до 8,0. Смесь оставить на 24 часа в стеклянном цилиндре при  $+2+4^{\circ}\text{C}$ .

Через 24 часа должен образоваться плотный осадок хитозана с бациллами.

После контакта осадок отделить от надосадка и дальнейшую работу проводить как с осадком, так и с надосадком.

Для определения концентрация бактерий осадок его ресуспендировали в изотоническом растворе натрия хлорида. Для этого готовили разведения от  $10^1$  до  $10^{12}$

С надосадком также проводили разведение от  $10^1$  до  $10^{12}$ .

С разведениями надосадка и осадка концентрацию бацилл будем определять путем посева на МПА.

### Результаты исследований

При проведении исследований по концентрированию бацилл из культуральной жидкости с помощью хитозана были получены следующие результаты.

После внесения в культуральную жидкость растворенного хитозана отмечено равномерное смешивание без разделения на фракции.

Через 3 часа после внесения хитозана и тщательного перемешивания в реакционную смесь добавили 10% раствор едкого натра (NaOH) с доведением рН до 8,0–8,5. Сразу после доведения рН до 8,0–8,5 отмечено образование хлопьев хитозана, на который сорбировались бациллы. Смесь оставили на 24 часа в стеклянном цилиндре при  $+2+4^{\circ}\text{C}$ . Через 24 часа после

осаждения хлопьев надосадочная жидкость была прозрачной, а осадок составлял 10-ю часть от исходной концентрации.

При высеве разведений надосадка и осадка получены следующие результаты (табл. 1).

Таблица 1

**Титр бацилл при концентрировании их хитозаном**

Разведение	Наличие роста бацилл (культальная жидкость бацилл )	Наличие роста бацилл (осадок, полученный с использованием 0,25% хитозана )	Наличие роста бацилл (осадок, полученный с использованием 0,5 % хитозана)	Наличие роста бацилл (надосадок полученный с использованием 0,25% хитозана)	Наличие роста бацилл (надосадок полученный с использованием 0,5% хитозана)
10 <sup>1</sup>	+	+	+	+	+
10 <sup>2</sup>	+	+	+	+	+
10 <sup>3</sup>	+	+	+	+	+
10 <sup>4</sup>	+	+	+	+	+
10 <sup>5</sup>	+	+	+	-	-±
10 <sup>6</sup>	+	+	+	-	-
10 <sup>7</sup>	+	+	+	-	-
10 <sup>8</sup>	+	+	+	-	-
10 <sup>9</sup>	+	+	+	-	-
10 <sup>10</sup>	±-	+	+	-	-
10 <sup>11</sup>	-	+	±	-	-
10 <sup>12</sup>	-	±	-	-	-

Приведенные в таблице данные свидетельствуют, что при использовании высокомолекулярного хитозана ММ 500 при концентрации 0,25 % отмечается концентрация бацилл из культуральной жидкости в 1000 раз (с 10<sup>9</sup> до 10<sup>12</sup> КОЕ/м), при использовании 0,5 % раствора хитозана – концентрирование бактерий отмечается в 100 раз (с 10<sup>9</sup> до 10<sup>11</sup> КОЕ/мл).

Таким образом установлено, что с помощью высокомолекулярного хитозана возможно провести концентрирование бацилл в 100–1000 раз, что имеет перспективу для получения и использования бациллярных препаратов как в ветеринарии (в качестве ветеринарных препаратов), так и в животноводстве (в качестве кормовых добавок).

**Список литературы**

1. Биополимеры, иммуномодуляторы и пробиотики в бройлерном птицеводстве / А.П. Дуктов [и др.]. Горки: БГСХА, 2016. 289 с.
2. Исследование адьювантных свойств сукцината хитозана / Д.П. Кузнецов [и др.] – ВНИРО/VNIRO Publishing, 2006.
3. Исследование сорбционной емкости кислоторастворимых хитозанов по отношению к бычьему сывороточному альбумину / В.А. Королева [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация 4 (2015): 85–89.

4. Использование иммуномодуляторов в бройлерном птицеводстве / А. П. Дуктов [и др.] – Тюмень: ГАУ Северного Зауралья, 2021. 352 с. Леваньков С.В. Адсорбционные свойства хитозана по отношению к белковым веществам / С.В. Леваньков, Е.В. Якуш //Известия ТИНРО (Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра). 2001. Т. 129. С. 121-128.
5. Области применения хитозана / Г.Г. Няникова [и др.] // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). 2007. №. 2. С. 20–26.
6. Перспективы использования хитозана как стабилизатора при коллоидных помутнениях / Трусова М. М., Камедько Т. Н., Павлова О. В. // Пищевая промышленность: наука и технологии. Т. 14, №. 4. С. 97–102.
7. Практические аспекты применения хитозана и его производных в различных областях народного хозяйства / М.А. Фролова [и др.], Изд-во ВНИРО/VNIRO Publishing.
8. Прикладные аспекты иммуномодуляции с использованием средств природного происхождения / П. А. Красочко [и др.] Краснодар: КубГАУ, 2021. 398 с.
9. Сорбционная способность различных модификаций хитозана в отношении регламентируемых микотоксинов / П.А. Красочко [и др.] // Известия Уфимского научного центра РАН. 2016. № 3–1. С. 124–127.

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИТОЗАНА В КАЧЕСТВЕ АДЬЮВАНТА ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ**

**А.И. Албулов<sup>1</sup>, М.А. Фролова<sup>1</sup>, П.А. Красочко<sup>2</sup>,  
П.П. Красочко<sup>2</sup>, А.В. Гринь<sup>1</sup>, А.К. Елисеев<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт  
биологической промышленности, Щелково, Московская область*

<sup>2</sup> *Учреждение образования «Витебская государственная академия ветеринарной  
медицины», Витебск, Республика Беларусь  
E-mail: info@bioprogress.ru*

**Аннотация.** Исследована возможность использования хитозана в качестве адьюванта в составе вакцинных препаратов. Установлено, что сукцинат и низкомолекулярная форма хитозана позволяют получать иммунный ответ на вводимые антигены на уровне или выше известных масляных и сорбционных адьювантов. Наибольшей адьювантной активностью по отношению к ротавирусу обладали хитозан низкомолекулярный и его солевая форма глутамат, титры антител к E-sol1 после использования в составе колибактериозной вакцины различных хитозановых адьювантов были самыми высокими с сукцинатом хитозана и низкомолекулярным хитозаном (мм 80 кДа, СДА 87 %).

**Ключевые слова:** адьювант, вакцина, сукцинат хитозана, глутамат хитозана, альбумин, ротавирусы, колибактерии.

## Введение

В последние десятилетия все более востребованным становится применение хитозана в медицине и ветеринарии. С учетом экономической составляющей выбор адъюванта для ветеринарных вакцин существенно сокращается. За счет высокомолекулярной структуры хитозан способен удерживать антигены внутри полимера, а низкая скорость его расщепления обуславливает длительное присутствие антигена в месте введения [1]. Были продемонстрированы адъювантные свойства различных форм хитозана в составе вакцин при мукозальном, парентеральном и интраназальном применении [2–6]. В связи со сложностью и дороговизной работ с вакцинными антигенами изучение иммунного ответа часто проводят на моделях протеиновых вакцин. Было отмечено усиление иммунного ответа после введения крысам хитозана и глутамата хитозана с очищенным яичным альбумином [7]. В наших исследованиях для этих целей был применен бычий сывороточный альбумин – БСА.

## Материалы и методы исследований

В опытах использовали препараты хитозана производства ООО «Биопрогресс»: хитозан высокомолекулярный и низкомолекулярный, сукцинат и глутамат хитозана. Определение адъювантных свойств хитозанов на модели БСА проводили забуференным физраствором с 2 % сукцинатом хитозана. В растворе БСА фирмы Sigma содержание белка довели до 5 мг/мл.

Для сравнения использовали такие адъюванты как гидроокись алюминия (ГОА), квасцы, масляный адъювант ПЭС, неполный адъювант Фрэйнда. Их концентрации в смеси с БСА устанавливали, исходя из используемых в вакцинном производстве.

Опыты проводили на белых лабораторных мышах массой 20–25 г по 20 животных в группе, включая контрольную. Смеси адъювантов с БСА инъецировали по 100 мкл подкожно дважды с интервалом в 21 день, после чего в сыворотке крови с помощью ИФА определяли уровень антител к БСА.

## Результаты исследований

Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что наиболее высокие уровни антител к БСА были получены после первого и второго введения животным смеси альбумина с сукцинатом хитозана.

Таблица 1

### Уровень антител в сыворотках крови мышей к БСА в реакции ИФА при использовании различных адъювантов

№ п/п	Вид адъюванта	Концентрация адъюванта, %	Значения уровня антител к БСА в МЕ через 21 день	
			после 1-й инъекции	
1	Без адъюванта	0	11,2+3,2	1.
2	Неполный адъювант	50,0	21,3+18,1	2.
3	ПЭС (масло)	50,0	22,4+19,6	3.
4	ГОА	1,5	28,7+21,1	4.
5	Сукцинат	0,25	45,1 ±4,0	5.

В сыворотке животных, которым вводили БСА без адьюванта и с хитозаном, отмечался незначительный разброс уровней антител. В группах мышей, которым инъецировали препараты с ГОА, масляным адьювантом ПЭС и неполным адьювантом Фрэйнда, наблюдался очень большой разброс уровней антител, что отрицательно сказывалось на общей напряженности гуморального иммунитета в группе. Недостатком ГОА и масляных адьювантов является также выраженная местная воспалительная реакция, переходящая зачастую в процесс инкапсулирования и изъязвления места введения, что приводит к снижению ожидаемого эффекта.

На следующем этапе для проверки адьювантных свойств хитозана вместо альбумина использовали антигены инактивированных вакцин против ротавирусной инфекции и колибактериоза. Накопление ротавирусов проводили на культуре клеток СПЭВ в среде Игла до титра 7,0 Ig ТЦЦ 50/мл, эшерихии культивировали на мясо-пептонном агаре до титра микробных тел 5 млрд/мл. После инактивации теотропином в культуральные жидкости с антигенами вносили хитозан различных препаративных форм до конечной концентрации 0,25 %, тщательно перемешивали и вводили внутримышечно белым крысам в дозе 0,5 мл. Через 7 дней животных тотально обескровливали и в сыворотках крови определяли наличие антител к ротавирусу в РИГА к эшерихиям – в РА. Для контроля использованы алюмокалиевые квасцы в общепринятой концентрации.

В табл. 2 приведены результаты определения титров антител к ротавирусной инфекции после введения подопытным животным хитозанов различного качества.

*Таблица 2*

**Титры антител к ротавирусу у крыс после использования различных адьювантов**

№ п/п	Адьювант	Титр антител к ротавирусу	
		Геометрический	Log <sub>2</sub>
1	Хитозан глутамат	1:16	1.
2	Хитозан сукцинат	1:8	2.
3	Хитозан высокомолекулярный ММ 495, СДА 81%	1:8	3.
4	Хитозан низкомолекулярный ММ 80, СДА 87%	1:16	4.
5	Антиген (без адьювантов)	1:8	5.
6	Алюмокалиевые квасцы	1:4	6.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что наибольшей адьювантной активностью по отношению к ротавирусу обладали хитозан низкомолекулярный и его солевая форма-глутамат.

Из таблицы 3 видно, что титры антител к E-coli после использования в составе колибактериозной вакцины различных хитозановых адьювантов были самыми высокими с сукцинатом хитозана и низкомолекулярным хитозаном (ММ – 80 кДа, СДА – 87 %).

## Титры антител к эшерихиям у крыс после использования различных адъювантов

№ п/п	Адъювант	Титр антител к <i>E. coli</i> к 88		Титр антител к <i>E. coli</i> A20	
		геометрический	Log <sub>2</sub>	геометрический	Log <sub>2</sub>
1	2	3	4	5	6
1	Хитозан глютамат	1:32	5,0	1:64	6,0
2	Хитозан сукцинат	1:32	5,0	1:128	7,0
3	Хитозан высокомолекулярный ММ 495, СДА 81%	1:32	5,0	1:32	5,0
4	Хитозан низкомолекулярный ММ 80, СДА 87%	1:128	7,0	1:256	8,0
5	Антиген (без адъювантов)	1:8	3,0	1:2	1,07
6	Алюмокалиевые квасцы	1:64	6,0	1:128	7,0

Алюмокалиевые квасцы показали низкую адъювантную активность к вирусному антигену и высокую — к бактериальному, однако сильная местная воспалительная реакция, образование язв и некрозов делают их применение нецелесообразным.

### Заключение

Полученные результаты демонстрируют, что использование сукцината и низкомолекулярной формы хитозана в качестве адъюванта позволяет получать иммунный ответ на вводимые антигены на уровне или выше известных масляных и сорбционных адъювантов, что указывает на перспективность исследований в этом направлении. Проявленные свойства хитозана позволяют предложить этот препарат в качестве адъюванта в производстве отечественных вакцинных препаратов.

### Список литературы

1. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение. М.: Наук, 2002, 368 с.
2. Гендон Ю.З., Маркушин С.Г., Кривцов Г.Г. и др. Способ повышения иммуногенности инактивированной гриппозной вакцины. Патент № 2323742 РФ.
3. Borges O., Silva M., de Sousa A. et al. Alginate coated chitosan nanoparticles are an effective subcutaneous adjuvant for hepatitis B surface anti-gen // *Int. Immunopharmacol.* 2008. Vol. 8. P. 1773–1780.
4. Ghendon Y., Markushin S., Krivtsov G., Akopova I. Chitosan as an adjuvant for parenterally administered inactivated influenza vaccines // *Arch. Virol.* 2008. Vol. 153. P. 831–837.
5. Ilium L., Jabbal-Gill I., Hinchcliffe M. et al. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001. Vol. 51. P. 81–96. Ilium L. Nasal drug delivery – possibilities, problems and solutions // *J. Control Release.* 2003. Vol. 87. P. 187–198.
6. Kang M.L., Cho C.S., Yoo H.S. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines // *Biotechnol. Adv.* 2009. Vol. 27. P. 857–865.
7. Hefferman M.Y., Zaharoff D.A., Fallon Y.K., Schlom Y., Greiner Y.W. *In vivo* efficacy of chitosan/IL-12 adjuvant system for protein based vaccines // *Biomaterials.* 2011. Vol. 32. P. 926–932.

## ОПТИМИЗАЦИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ПОЛИМЕРА ПРИ СОЗДАНИИ ЖИДКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

А.С. Шуршина<sup>1</sup>, М.А. Афанасьева<sup>1</sup>, А.В. Самородов<sup>2</sup>, Е.И. Кулиш<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уфимский университет науки и технологий, ул. Заки Валиди, дом 32,  
Уфа, 450076, Россия

<sup>2</sup> Уфимский юридический институт, ул. Муксинова, дом 2, Уфа, 450091, Россия  
E-mail: anzhela\_murzagil@mail.ru

Создание систем, перспективных для использования в качестве доставки лекарственных препаратов, представляет собой одну из важнейших задач науки о материалах. Она предполагает проведение междисциплинарных изысканий для оптимизации терапевтического индекса и биодоступности, с одной стороны, и обеспечения пролонгированного действия лекарственных веществ (ЛВ), с другой. Среди большого разнообразия систем доставки, весьма перспективными представляются жидкие лекарственные формы (ЖЛФ). К преимуществам ЖЛФ относят удобство применения, дозирования, минимизация побочных эффектов и т.д. Для обеспечения пролонгированного действия ЛВ в ЖЛФ вводят полимеры, например, полисахариды, в частности аминополисахарид хитозан и его производные, пектины. Введение полимеров должно приводить к эффекту пролонгирования выхода лекарственного препарата из ЖЛФ благодаря по крайней мере двум факторам. Первый фактор связан с высокой вязкостью растворов полимеров и определенными диффузионными затруднениями. Второй - с возможностью образованию комплексных соединений между полимером и ЛВ. Чем прочнее образуемый комплекс полимера с ЛВ и чем больше его количество, тем сильнее проявляется эффект пролонгирования.

С одной стороны, кажется очевидным, что и повышенная вязкость полимерных ЖЛФ, и способность к образованию комплекса между полимером и ЛВ должны способствовать более медленному высвобождению ЛВ из ЖЛФ. С другой стороны, при увеличении содержания полимера в растворе одновременно с повышением вязкости происходит уменьшение макромолекулярных клубков в размерах, увеличение плотности их упаковки и усиление агрегационных процессов между макромолекулами. Как следствие, доступность звеньев полимера для взаимодействия с лекарственным веществом может уменьшиться, что в свою очередь, приведет к уменьшению количества лекарственного вещества, прочно закрепленного на макромолекулярной цепи (комплексного аддукта реакции между полимером и лекарственным веществом). В результате в этом случае повышение вязкости может не только не привести к усилению пролонгирующего эффекта, но и, напротив, вызвать ускоренное высвобождения лекарственного вещества из лекарственной формы. Кроме того, использование высоких концентраций полимера может вызывать отрицательное воздействие на организм пациента.

Таким образом, целью данной работы стала комплексная оценка влияния концентрации полимеров в растворе на скорость высвобождения ЛВ из ЖЛФ и на биологическое действие изучаемых полимеров на организм человека. В качестве лекарственного препарата был использован антибиотик широкого спектра действия цефазолин (в виде натриевой соли), активно применяемый при лечении инфекций кожи, мягких тканей, костей и суставов, а также интраоперационного орошения ран для профилактики развития инфекций. В качестве полимеров были использованы полисахариды, такие как пектин (ПК), хитозан (ХТЗ) и натриевая соль сукцинилата хитозана (СХТЗ).



Процесс высвобождения ЦФЗ из жидкой лекарственной формы изучали методом диализа через полупроницаемую мембрану. Предварительно смешанный раствор полимера с лекарственным веществом помещали в целлофановый мешок и опускали в сосуд, содержащий 150.0 мл раствора полимера соответствующей концентрации. Диализ проводили в термостатируемых условиях при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Пробы диализата по 10.0 мл отбирали через определенное время с момента начала эксперимента, восполняя взятые количества новыми порциями диализной среды. Содержание ЦФЗ в диализате определяли в указанные промежутки времени методом спектрофотометрии в УФ-области при длине волны, соответствующей максимуму поглощения ЦФЗ. В качестве раствора сравнения использовали раствор полимера. По тангенсу угла наклона зависимости  $G_t$  – количества лекарственного вещества (в %) от введенного в систему, прошедшее через полупроницаемую мембрану к определенному моменту времени  $t$  от времени, определяли скорость выхода лекарственного препарата.

Оценка биологического действия исследуемых полимеров была выполнена на кафедре биологической химии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России в соответствии с рекомендациями "Руководства по доклиническому изучению новых фармакологических веществ" (Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. 944 с.) и ГОСТ ISO 10993–1–2011 "Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий".

В работе [1] было показано, что исследуемые полимеры образуют с ЦФЗ комплексный аддукт реакции посредством водородных связей. Состав комплекса всех изученных полимеров с ЦФЗ составил 1:1. Константа равновесия образующихся аддуктов реакции составляла  $7.9 \cdot 10^4$ ,  $8.1 \cdot 10^4$  и  $6.5 \cdot 10^5$  л/моль для растворов ПК, СХТЗ и ХТЗ, соответственно. Данные значения констант равновесия позволяют утверждать, что формируемые аддукты взаимодействия изучаемых полимеров с ЦФЗ в предельно разбавленных растворах, могут быть отнесены к соединениям со средней устойчивостью, в принципе способные обеспечить определенный уровень пролонгирования действия лекарственных препаратов за счет закрепления их на полимерной матрице.

Действительно, как показано на кривой 1 рисунка диализ ЦФЗ из водного раствора в отсутствие полимера происходит достаточно быстро, со скоростью 0.54 % от введенного количества в минуту (образец № 1 из табл.), что приводит к полному прохождению ЦФЗ через полупроницаемую мембрану приблизительно за три часа.

Из кривых 2–4 рисунка и данных табл. (образцы № 2–6, 11–14 и 18–21) видно, что с увеличением концентрации полимера скорость прохождения ЦФЗ через полупроницаемую мембрану уменьшается. Это обусловлено как повышением вязкости раствора полимера (относительная вязкость растворов полимеров увеличивается при этом в 1.5–2 раза), так и увеличением количества лекарственного вещества, прочно закрепленного на макромолекулярной цепи. Но дальнейшее повышение концентрации полимера в растворе, напротив, приводит к увеличению скорости высвобождения ЦФЗ из ЖЛФ (образцы № 6-8, 14-15 и 21-22 таблицы). Поскольку такой же эффект увеличения скорости высвобождения ЛВ имеет место при уменьшении количества комплексного аддукта реакции, которое имеет место вызванное отклонением соотношения полимер:ЛВ от значений 1 к 1 (образцы № 9, 10, 16, 17 и 23, 24 таблицы), можно предположить, что уменьшение эффекта пролонгирования при дальнейшем увеличении содержания полимера в растворе связан именно с уменьшением количества комплексносвязанного с полимерной цепью ЛВ вследствие уменьшения доступности звеньев полимера для взаимодействия).

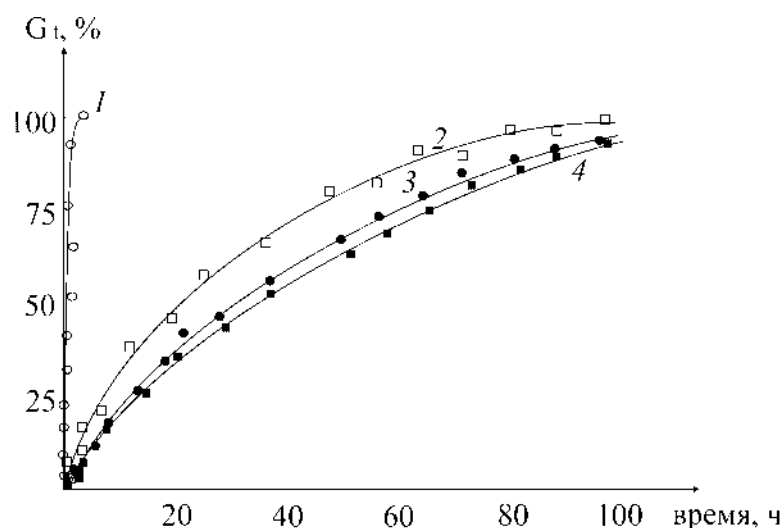


Рис. Кинетическая кривая высвобождения ЦФЗ из водного раствора в отсутствие полимера (1) и из растворов пектина с концентрацией  $1 \cdot 10^{-5}$  (2),  $1 \cdot 10^{-4}$  (3),  $1 \cdot 10^{-3}$  (4) моль/л и соотношением ЦФЗ:пектин – 1:1

Таблица

**Результаты обработки кинетических кривых выхода ЦФЗ из жидких лекарственных форм на основе ПК, СХТЗ и ХТЗ на начальном участке (в течение первого часа)**

Используемый полимер	Номер исследуемого образца	Концентрация, моль/л	Мольное соотношение полимер:ЦФЗ	V, %/мин
-	1	вода	-	0.540
пектин	2	$1 \cdot 10^{-5}$	1:1	0.064
	3	$1 \cdot 10^{-4}$	1:1	0.049
	4	$1 \cdot 10^{-3}$	1:1	0.020
	5	$1 \cdot 10^{-2}$	1:1	0.015
	6	$1 \cdot 10^{-1}$	1:1	0.010
	7	$2 \cdot 10^{-1}$	1:1	0.242
	8	$3 \cdot 10^{-1}$	1:1	0.357
	9	$1 \cdot 10^{-3}$	1:0.10	0.102
	10	$1 \cdot 10^{-3}$	1:0.01	0.119
	СХТЗ	11	$1 \cdot 10^{-5}$	1:1
12		$1 \cdot 10^{-4}$	1:1	0.059
13		$1 \cdot 10^{-3}$	1:1	0.031
14		$1 \cdot 10^{-2}$	1:1	0.022
15		$1 \cdot 10^{-2}$	1:1	0.043
16		$1 \cdot 10^{-3}$	1:0.10	0.118
17		$1 \cdot 10^{-3}$	1:0.01	0.126
ХТЗ	18	$1 \cdot 10^{-5}$	1:1	0.199
	19	$1 \cdot 10^{-4}$	1:1	0.180
	20	$1 \cdot 10^{-3}$	1:1	0.168
	21	$1 \cdot 10^{-2}$	1:1	0.163
	22	$1 \cdot 10^{-1}$	1:1	0.179
	23	$1 \cdot 10^{-3}$	1:0.10	0.185
	24	$1 \cdot 10^{-3}$	1:0.01	0.192

Использование разбавленных растворов более благоприятно и с биологической точки зрения. В ходе изучения гемолитической активности растворов полимеров в условиях *in vitro*

было установлено, что все полимеры в исходной концентрации  $5 \times 10^{-2}$  моль/л вызывают полный гемолиз эритроцитов. Гемолиз эритроцитов в концентрации  $5 \times 10^{-3}$  моль/л и меньше составляет менее 2 % для всех полимеров, что свидетельствует об их полной гемосовместимости в данных концентрациях.

Таким образом, в ходе работы показано, что для создания ЖЛФ на основе хитозана, натриевой соли сукцинилата хитозана и пектина наиболее целесообразно использовать более разбавленные растворы, что обеспечит с одной стороны полную гемосовместимость лекарственной формы с тканями и организмом человека, а с другой – пролонгированный выход лекарственных веществ.

### Список литературы

1. Shurshina A.S., Galina A.R., Kulish E.I. Features of the use of polyelectrolytes to prolong the action of medicinal substances // Russ. J. Phys. Chem. B. 2022. Vol. 16, N 2. P. 353–360.

## СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ КОЛИСТИНА С МОДИФИЦИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ

**Н.В. Дубашинская, А.Н. Бокатый, Ю.А. Скорик**

*Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук,  
Большой проспект В.О., дом 31, Санкт-Петербург, 199004, Россия*

Полипептидный антибиотик колистин является перспективным лекарственным средством для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями с множественной лекарственной устойчивостью. Однако высокая нефро- и нейротоксичность, а также низкая пероральная биодоступность ограничивают медицинское применение колистина. Одним из способов улучшения биодоступности и снижения токсичности противомикробных препаратов является их инкапсулирование в полимерные носители, а также конъюгирование с полимерами [1]. Для создания систем доставки колистина для парентерального и перорального введения с пролонгированным высвобождением и сниженной токсичностью нами были использованы две основные стратегии: (i) образование полиэлектролитных комплексов (ПЭК) колистина с полисахаридами и (ii) конъюгирование колистина с полисахаридами.

Для получения ПЭК использовали тройную систему колистин-диэтиламиноэтил-хитозан-гиалуронат натрия, что позволило модифицировать высвобождение (30–45 % и 85–90% колистина высвобождалось через 15 и 60 мин соответственно) и сохранить антимикробную активность на уровне свободного колистина (минимальная ингибирующая концентрация в отношении *Pseudomonas aeruginosa* составила 1 мкг/мл) [2, 3]. Для снижения нефро- и нейротоксичности синтезировали конъюгаты колистина с гиалуроновой кислотой [4] и сукцинил-хитозаном [5], которые, наряду с высокой антимикробной активностью (на уровне свободного колистина), показали сниженную на 20–50 % нефро-и нейротоксичность (на клеточных линиях НЕК 293 и Т 98G).

Для улучшения кишечной проницаемости при пероральном введении нами получены модифицированные цианокобаламином (витамин В12) системы доставки колистина в виде

полимерных конъюгатов с гиалуроновой кислотой, а также ПЭК, включающие поликатионы (цианокобаламин-хитозан и колистин) и полианионы (гиалуронат натрия или каррагинан). Полученные системы имели пролонгированный профиль высвобождения колистина, высокую антимикробную активность и сниженную токсичность, а также характеризовались улучшенной кишечной проницаемостью на модели Caco-2 (коэффициент кажущейся кишечной проницаемости составил от  $4.5 \times 10^{-6}$  до  $1.6 \times 10^{-5}$  см/с).

Таким образом, использование полимерных системы доставки на основе различных полисахаридов позволяет модифицировать высвобождение колистина и улучшить его биофармацевтические характеристики.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 19-73-20157-П).*

### Список литературы

1. N.V. Dubashynskaya, Y.A. Skorik // Pharmaceuticals. 2020. Vol. 13. # 83.
2. N.V. Dubashynskaya et al. // Int. J. Biol. Macromol. 2021. Vol. 187. P. 157–165.
3. N.V. Dubashynskaya et al. // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22. # 8381.
4. N.V. Dubashynskaya et al. // Int. J. Biol. Macromol. 2022. Vol. 215. P. 243–252.
5. N.V. Dubashynskaya et al. // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24. # 166.

## ТЕРМОПЛАСТИЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И ПОЛИЛАКТИДА

**С.Д. Зайцев, И.Р. Леднев, К.В. Апрятина, Е.В. Саломатина, Л.А. Смирнова**

*Национальный исследовательский нижегородский государственный университет им.  
Н.И. Лобачевского, проспект Гагарина, дом 23, корп. 5, Нижний Новгород, 603022, Россия  
E-mail: szay@inbox.ru*

Разработка биосовместимых биodeградируемых полимерных материалов – одна из сложнейших задач, решаемых методами химии полимеров. Выбор хитозана в качестве основы для биodeградируемых полимерных материалов связан с наличием у него уникального набора физико-химических свойств, к которым следует отнести расщепление под действием ферментов внутри организма и амфифильность макромолекул, обуславливающую способность к управляемым гидрофильно-гидрофобным взаимодействиям с мембранными белками. Это позволяет клеткам самых разных типов успешно прикрепляться к поверхности матриц из хитозана. Наряду с указанными свойствами, в рамках современных тенденций перехода к персонализированной медицине стоит проблема получения термопластичных композиций на основе хитозана для изделий индивидуальной формы методами аддитивных технологий (3D-печать).

Для получения биосовместимых и биоразлагаемых материалов, которые могут быть использованы для 3D-печати методом послойного наложения (FDM) необходимо, чтобы данный материал обладал термопластичностью, т.е. размягчался при повышении температуры и позволял бы формовать изделие из данного расплава. Таким образом важны механические характеристики материалов и возможность получения изделий традиционными способами с

использованием серийного промышленного оборудования. Это остается нерешенной проблемой для большинства неплавких полисахаридов, включая немодифицированный хитозан, который не индивидуальном виде не может удовлетворить существующим требованиям, предъявляемым к полимерным термопластичным матриксам для биомедицины. Сложность формования изделий из хитозана, существенно снижают возможности его применения. Для придания материалам на основе хитозана термопластичности, их смешивают с термопластичными полимерами, такими как полиэфиры, например полилактидом и поликапролактоном.

Можно полагать, что при подборе системы с единым растворителем для хитозана и полиэфиров возможно получение их гомогенных растворов. Известно о растворении хитозана и поликапролактона в одном растворителе, в качестве которого использовали гексафторизопропанол, однако этот растворитель достаточно токсичный и коммерчески недоступный, что ограничивает его применимость в биомедицине. Таким образом получение гомогенной системы на основе природных и синтетических биосовместимых полимеров, таких как хитозан, полилактид и поликапролактон в мягких условиях и без использования специального оборудования, остается актуальной проблемой.

Более перспективным растворителем для совмещения хитозана и полиэфиров является диметилсульфоксид (ДМСО), как один из наиболее широко используемых полярных растворителей. ДМСО – один из немногих органических растворителей, одобренных для использования в медицине, что крайне важно, поскольку разрабатываемый материал предполагается к использованию в этой области, и даже следовые количества оставшегося растворителя могут негативно влиять на биологические свойства изделия.

Одним из самых перспективных на сегодняшний день биоразлагаемых полимеров является полилактид – линейный, гидрофобный, полимер, входящий в группу алифатических сложных полиэфиров. Важное преимущество полилактида – возможность его переработки практически всеми методами, применяемыми для промышленных крупнотоннажных полимеров.

Несмотря на одобрение применения полилактида в медицине, высокие механические свойства и термопластичность, этот полимер не обладает биоактивностью, характерной для хитозана. Кроме того, при биоразложении полимера под действием ферментов, образуются продукты, которые могут привести к локальному воспалению окружающих тканей из-за снижения рН среды.

Таким образом, хитозан и полилактид, являются подходящей основой для создания композитных биодеградируемых полимерных матриксов, однако полилактид нерастворим в воде, а имеющиеся в литературе данные по синтезу органорастворимых форм хитозана свидетельствуют о необходимости его химической модификации для растворения в органических средах, что может в дальнейшем негативно сказаться на физико-химических и биологических свойствах. В результате чего возникает проблема совместимости хитозана и полилактида. В последнее время ряд полимерных материалов на основе хитозана и полилактида в виде пленок, пористых каркасов, микро- и наночастиц был получен и изучен с точки зрения их использования для биомедицины. В литературе известны способы получения механических смеси хитозан-полилактид/поликапролактон, однако несмотря на то, что их свойства гармонично дополняют друг друга, в результате смешения двух растворов, образуются двухфазные системы и, как следствие, ограниченная совместимость и невозможность введения больших количеств одного из компонентов и неоднородность получаемых материалов. Из

литературы также известно о создании термопластичного композита на основе хитозана, поливинилового спирта и поликапролактона, однако для достижения термопластичности в данной системе, ученым пришлось снизить долю хитозана до 5 % от общей массы композиции, что может негативно сказаться на биологических свойствах изделия.

В данной работе было проведено растворение хитозана в растворе кислоты в ДМСО, с дальнейшим добавлением к системе расчетных количеств полиэфира. Из полученных растворов заливали пленки размером 12×6 см и толщиной 0.05 мм на лавсановой подложке пленкозаливочной машины с вырубными ножом XiamenTMAX-TMH с целью дальнейшего исследования их свойств. Пленки сушили при температуре 75°C до постоянной массы и по её достижении обрабатывали водным раствором NaOH для перевода хитозана из солевой формы в основную, после чего промывали дистиллированной водой, доводя до нейтрального значения pH. Пленки характеризовались равномерным распределением компонентов смеси, отсутствием видимых «вкраплений», что свидетельствует о совместимости хитозана и полилактида в случае растворения их в едином растворителе.

Физико-механические характеристики (величина разрушающего напряжения и деформация при растяжении) материала определяли на разрывной машине Roell/Zwick Z005. Предел прочности при разрыве варьировался от 45 МПа (при массовом соотношении компонентов 1:1) до 68 МПа (при соотношении хитозан:полилактид 1:2) при относительной деформации 10 и 19 %, соответственно.

Термопластичность образцов, а также определение показателя текучести расплава определялась на установке XNR-400AM Melt Flow Indexer. Показатель текучести расплава полимера (ПТР) вычисляют по формуле:

$$\text{ПТР} = 600 \cdot m/t,$$

где 600 – стандартное время, равное 600 с;  $m$  – средняя масса экструдированных отрезков, г;  $t$  – промежуток времени между двумя последовательными срезами отрезков, с. За результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов двух определений на трех отрезках материала, расхождение по массе между которыми не превышает 5%.

Данное исследование преследовало не только определение ПТР образцов, как технического параметра, сколько определение факта термопластичности образца, а также минимальной температуры термопластичности, для образца хитозан:полилактид, с добавлением в систему гидроксиапатита и TiO<sub>2</sub>, без пластификаторов. она составила 140°C. Диоксид титана в данном случае препятствует комкованию хитозана и гидроксиапатита в процессе экструзии. Кроме того, данная группа образцов показала наилучшие прочностные характеристики – более 66 МПа на разрыв, что превышает показатели базового полилактида (52 МПа).

Далее проводили оптимизацию состава, чтобы препятствовать заклиниванию шнека экструдера и образованию неоднородных вкраплений хитозана и гидроксиапатита в получаемом филаменте. Отработка параметров печати из наработанного филамента и тестовая печать образцов проводилась на 3D-принтере Flashforge Adventurer 4 в стандартной комплектации, со стальным соплом 0.4. В качестве адгезивного состава на платформу наносился клей-лак для 3D-печати на полимерной основе Ateco (рис. 1). Для определения оптимальных температур печати был проверен диапазон печати (при прочих одинаковых настройках, аналогичных базовому ПЛА) от 150 до 250°C. Важно отметить, что в диапазоне до 230°C не наблюдались процессы деградации хитозана (потемнение, горение и т.п.), что обусловлено как кратковременным тепловым воздействием на филамент, так и правильно определенной формой ввода хитозана.



Рис 1. Фотография тестового образца хитозан:гидроксиапатит:полилактид, напечатанного методом FDM, температура 220°C

Были проведены исследования биосовместимости *in vitro* по адгезии на поверхности пленки, полученной из образцов, при культивировании на них фибробластов человека клеточной линии hTERT VJ-5t в качестве предшественников образования соединительной ткани. На рис. 2 представлены фотографии пленок после 24 часов инкубации клеток, на которых видно равномерное распределение клеток фибробластов, что свидетельствует об их хорошей адгезии на представленных образцах. Из этого следует, что введение полилактида не снизило клеточную адгезию материала, что позволяет использовать данные композиции для регенеративной медицины.

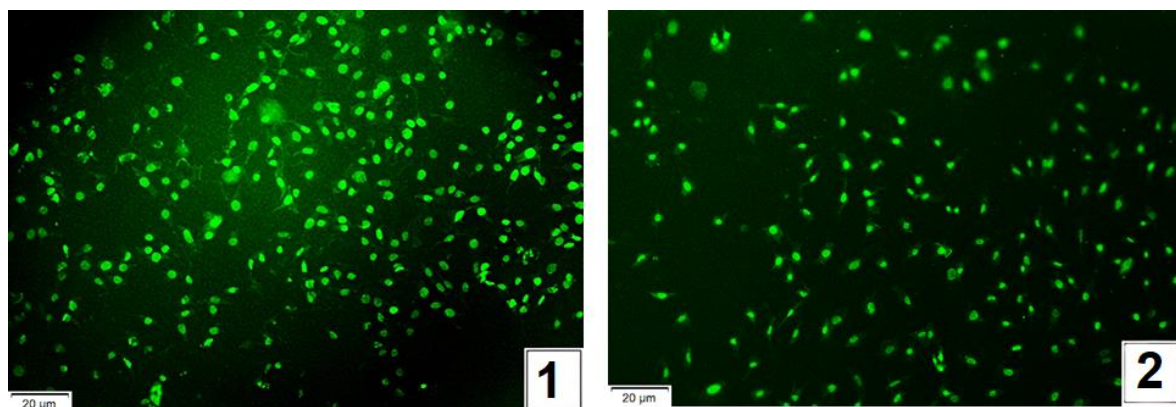


Рис. 2. Фотографии образцов, заселенных фибробластами, через 24 ч, полученных:  
(1) – на основе исходного хитозана; (2) – из композиции хитозан:полилактид

В ходе работы разработан принципиально новый способ совмещения хитозана с органорстворимыми полимером – полилактидом, основанный на растворении хитозана в органической среде вместо водной. Разработка термопластичного, биосовместимого и биоразлагаемого материала на основе хитозана и полилактида, совмещенных в едином растворителе, является перспективной для биомедицины, в частности для 3D-печати, поскольку не требует ни токсичных или дорогих растворителей, ни сложного оборудования, при этом позволяет варьировать соотношение компонентов в широком диапазоне.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 23-13-00342).*

# СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕКСТУРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК КОМПОЗИЦИОННЫХ АЛЬГИНАТ-ХИТОЗАНОВЫХ АЭРОГЕЛЕЙ

Н.А. Горшкова<sup>1</sup>, О.С. Бровко<sup>1</sup>, И.А. Паламарчук<sup>1</sup>,  
Н.И. Богданович<sup>2</sup>, А.Д. Ивахнов<sup>1,2</sup>, К.Г. Боголицын<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаврова РАН, 163000, г. Архангельск, пр. Никольский, дом 20, Архангельск, 163020, Россия*

<sup>2</sup> *Северный Арктический федеральный университет им. М.В. Ломоносова, наб. Северной Двины, дом 17, Архангельск, 163002, Россия  
E-mail: nat.gorshkova@mail.ru*

Создание новых полифункциональных аэрогельных материалов является актуальной областью науки и технологии. Особенностью таких материалов является высокая пористость 90–99 %, большая удельная поверхность 200–1500 м<sup>2</sup>/г, низкая плотность 0,003–0,5 г/см<sup>3</sup>, размер пор 2–100 нм. Именно эти характеристики и определяют основные направления практического применения аэрогелей в качестве сорбционных и изоляционных материалов, медицинских изделий, матриц-носителей различных активных веществ (лекарственных соединений, металлов, клеток) и т.д. [1–3]. Прекурсорами для получения органических аэрогелей служат гидрогели и лиогели, полученные различными способами на основе как природных, так и синтетических полимеров

Перспективным подходом формирования структуры гидрогелей является полиэлектролитное комплексообразование противоположно заряженных биополиэлектролитов из растворов [4]. На стадии синтеза полиэлектролитного комплекса закладываются размерные и структурные характеристики аэрогельных материалов, которые в дальнейшем определяют морфологию, физико-химические свойства и область их практического применения.

При получении аэрогелей в качестве исходных биополимеров все большее внимание исследователей привлекают альгинат (АЛ) и хитозан (ХТ), широко используемые в настоящее время для разработки материалов медицинского и фармацевтического назначения.

Наличие полярных групп ионного и неионного характера в макромолекулах АЛ и ХТ способствует их совмещению в общем растворителе без значительных энергетических затрат благодаря образованию межмолекулярных ионных, водородных связей и дисперсионных взаимодействий. При этом в области синерезиса образуется гидрогель в виде осадка вследствие формирования полиэлектролитного комплекса (ПЭК) и частичного обезвоживания целевого гидрогеля [5, 6]. Дальнейшим высушиванием геля в сверхкритических условиях, после замещения воды в гидрогеле на органический растворитель (ацетон), получают аэрогель с сохранением исходной морфологии влажного геля, в котором жидкая фаза полностью заменена газообразной [7]. При наполнении альгинат-хитозановых аэрогелей минеральными компонентами, например, карбонатом кальция и лекарственными препаратами можно получить композиционные аэрогели медико-биологического назначения.

Целью работы является получение композиционных аэрогелей на основе альгината натрия и хитозана и карбоната кальция и исследование их текстурных характеристик.

Микрочастицы СаСО<sub>3</sub> получали смешиванием эквимольных 0,33 моль/г растворов СаСl<sub>2</sub> и Na<sub>2</sub>СО<sub>3</sub>. Скорость перемешивания смеси варьировали от 400 до 1000 об/мин.



Результаты эксперимента показали, что при низкой скорости перемешивания 400–600 об/мин формируются частицы правильной округлой формы, размером 2,9–3,3 мкм, при этом визуализируется значительное количество агломератов. Чем быстрее соли  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  гомогенно распределяются в рабочем объеме, тем больше образуется центров нуклеации, что приводит к увеличению числа растущих микрочастиц, и, следовательно, уменьшению их среднего размера. При высокой скорости перемешивания (800–1000 об/мин) образуется большое количество кристаллов ромбоэдрической и сферолитной формы, при этом количество частиц значительно уменьшается, размер частиц составляет 0,7–1,5 мкм. Высокая скорость перемешивания (800–1000 об/мин) приводит к ориентации микрочастиц в потоке, в результате чего сокращается время контакта кристаллов при столкновениях, что, по-видимому, снижает вероятность их срастания, а также возрастает скорость разрушения кристаллов и непрочных агломератов частиц  $\text{CaCO}_3$  при столкновении друг с другом.

С целью получения композиционных аэрогелей на стадии синтеза ПЭК АЛ–ХТ осуществляли введение микрочастиц  $\text{CaCO}_3$  в систему. В кислой среде микрочастицы  $\text{CaCO}_3$  растворяются, что приводит к высвобождению ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , которые обеспечивают сшивку молекул АЛ и ХТ с образованием хелатных комплексов, при этом одновременно происходит формирование ПЭК АЛ–ХТ.

Полученные таким образом гидрогели сушили в среде сверхкритического диоксида углерода с предварительной последовательной заменой водной фазы в структуре гидрогеля на органическую (ацетон). В результате получено четыре образца композиционных аэрогеля с введением микрочастиц  $\text{CaCO}_3$ , синтезированных при различной скорости перемешивания: 400, 600, 800, 1000 об/мин, обозначенных как КАГ400, КАГ600, КАГ800, КАГ1000, соответственно. Следует отметить, что все полученные материалы приняли заданную форму и монолитность.

Результаты исследования текстурных характеристик методом низкотемпературной адсорбции азота представлены в таблице. Все образцы характеризуются развитой мезопористой структурой и высокой удельной поверхностью 388–403  $\text{м}^2/\text{г}$ , при этом нет значительных различий в текстурных характеристиках материалов. Размер пор в полученных материалах составляет 19,5–24,6 нм, что значительно превосходит размеры синтезированных микрочастиц  $\text{CaCO}_3$ .

*Таблица*

**Текстурные характеристики композиционных аэрогелей**

Образец	$S_{\text{уд.}}, \text{м}^2/\text{г}$		$V_{\text{пор.}}, \text{см}^3/\text{г}$			$d_{\text{ср}} \text{ пор, нм}$
	общая	мезопор	общий	мезо -	микро-	
КАГ400	388±19	352±17	1.90±0.09	1.74±0.08	0.12±0.01	24.6±2.0
КАГ600	400±20	323±16	1.93±0.09	1.83±0.09	0.14±0.01	21.3±2.1
КАГ800	403±20	367±18	1.82±0.08	1.65±0.08	0.13±0.01	22.5±2.5
КАГ1000	392±20	357±17	1.76±0.08	1.71±0.08	0.12±0.01	19.5±2.3

Микрочастицы  $\text{CaCO}_3$  выступают не в роли темплата, а только как источник ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , участвующих в формировании гидрогеля АЛ–ХТ, в отличие от однокомпонентных систем на основе АЛ или ХТ, где  $\text{CaCO}_3$  используют для создания матриц (гидрогелей, скаффолдов) с контролируемыми размерами пор в диапазоне 5–50 мкм, соответствующими размеру микрочастиц  $\text{CaCO}_3$  [8,9]. Таким образом, можно предположить, что при разработке

технологии получения композиционных материалов можно использовать любую легко реализуемую схему синтеза микрочастиц  $\text{CaCO}_3$  при наименьшей скорости перемешивания прекурсоров, что будет способствовать удешевлению процесса производства материалов за счёт сокращения энергозатрат.

*Исследования проведены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 23-23-10021).*

### Список литературы

1. Z. Ulker, C. Erkey. An emerging platform for drug delivery: Aerogel based systems // Journal of Controlled Release. 2014. Vol. 177. P. 51–63.
2. S. Wei, Y.C. Ching, C.H. Chuah. Synthesis of chitosan aerogels as promising carriers for drug delivery: A review // Carbohydrate polymers. 2020. Vol. 231. P. 115–124.
3. N.A. Gorshkova, O.S. Brovko, I.A. Palamarchuk, K.G. Bogolitsyn Influence of the structure of alginate-chitosan materials on the kinetics of usnic acid release // Applied Biochemistry and Microbiology. 2022. Vol. 58, N 2. P. 110–117.
4. O.S. Brovko, I.A. Palamarchuk, T.A. Boitsova, K.G. Bogolitsyn, N.A. Valchuk, D.G. Chukhchin. Influence of the conformation of biopolyelectrolytes on the morphological structure of their interpolymer complexes // Macromolecular Research. 2015. Vol. 23. P. 1059–1067.
5. N. Gorshkova, O. Brovko, I. Palamarchuk, K. Bogolitsyn, A. Ivakhnov, N. Bogdanovich, D. Chukhchin, M. Arkhilin. Formation of supramolecular structure in alginate/chitosan aerogel materials during sol-gel synthesis // J. Sol-Gel Science and Technology. 2020. Vol. 95, N 1. P. 101–108.
6. W. Shi, Y.C. Ching, C.H. Chuah. Preparation of aerogel beads and microspheres based on chitosan and cellulose for drug delivery: A review // International Journal of Biological Macromolecules. 2021. Vol. 170. P. 751–767.
7. N.A. Valchuk, O.S. Brovko, I.A. Palamarchuk, T.A. Boitsova, K.G. Bogolitsyn, A.D. Ivakhnov, D.G. Chukhchin, N.I. Bogdanovich Preparation of aerogel materials based on alginate-chitosan interpolymer complex using supercritical fluids // Russian Journal of Physical Chemistry B. 2019. Vol. 13, N 7. P. 1–4.
8. P. Arpornmaeklong, N. Jaiman, K. Apinyauppatham, A. Fuongfuchat, S. Boonyuen. Effects of calcium carbonate microcapsules and nanohydroxyapatite on properties of thermosensitive chitosan/collagen hydrogels // Polymers. 2023. Vol. 15. P. 1–23.
9. A. Sergeeva, A.S. Vikulina, D. Volodkin. Porous alginate scaffolds assembled using vaterite  $\text{CaCO}_3$  crystals // Micromachines. 2019. Vol. 10. P. 357–362.

## БИОСОВМЕСТИМЫЕ ПЛЕНКИ НА ОСНОВЕ БЛОК-СОПОЛИМЕРА ХИТОЗАНА И КОЛЛАГЕНА

**К.В. Апрытина, Е.А. Бобрынина, А.П. Моница, Е.И. Черкасова, Л.А. Смирнова**

*Национальный исследовательский нижегородский государственный университет им.  
Н.И. Лобачевского, проспект Гагарина, дом 23, корп. 5, Нижний Новгород, 603022, Россия  
E-mail: apryatina\_kv@mail.ru*

Тканевая инженерия – развивающаяся область, целью которой является разработка различного рода регенеративных матриц, способных заменить или улучшить поврежденные ткани или органы. Первоначально биоматериалы, используемые в области биомедицины, как правило, были инертными, например, металлы и керамика, во избежание любого возможного иммунного ответа организма. Однако, со временем, все большее значение приобретают материалы на основе биополимеров. Они не только выполняют функцию каркаса, но и способны взаимодействовать с организмом, способствуя его активной регенерации.

Белки и полисахариды рассматриваются перспективными природными соединениями для создания композиций с требуемыми характеристиками. Среди них внимание исследователей все больше привлекают коллаген, хитозан и материалы на их основе. Коллаген является основным структурным белком большинства видов соединительных тканей, обеспечивая поддержание биологической и структурной целостности, составляющий от 25 % до 45 % белков во всем теле. Все увереннее коллаген, получаемый из крупного рогатого скота, вытесняет рыбный коллаген, благодаря, в первую очередь, своим гипоаллергенным свойствам, так как он на 96 % идентичен человеческому белку, и трансдермальным свойствам. Однако, быстрая биodeградация и низкая механическая прочность коллагена ограничивают дальнейшее использование материалов на его основе. По этой причине для изготовления композиций используются смеси биоразлагаемых полимеров, например – смесь коллагена с хитозаном. Гидрофильная структура хитозана способствует адгезии и пролиферации практически всех типов клеток, также данный полимер биосовместим и биоразлагаем, обладает противомикробными и ранозаживляющими свойствами и, как следствие, представляет интерес в качестве материала для создания композиций для тканевой инженерии. Скорость разложения хитозана в сравнении с природными полимерами животного происхождения, такими как коллаген, желатин и фибрин, относительно низкая и зависит как от степени его деацетилирования, так и молекулярной массы.

В настоящий момент исследователи занимаются созданием композиций на основе смесей коллагена и хитозана, в том числе сшитых структур из этих полимеров. Авторами [1] были получены материалы для биомедицинских целей на основе смеси коллагена и хитозана с различными молекулярными массами. В работе рассмотрено влияние состава пленок и пористых губчатых материалов и условия формирования резорбируемых матриц для культивирования двух типов клеток - фибробластов и кератиноцитов. В работе [2] приводятся данные по свойствам пленок на основе биополимеров при использовании сшивающих компонентов - дубильной кислоты и дженипина – с потенциальным применением в офтальмологии. Материал характеризуется высокой адгезией и пролиферацией клеток фибробластов мыши на его поверхности. Композиции на основе коллагена и хитозана исследовались в качестве биоматериалов для регенерации утраченных элементов костной

ткани человека [3]. Показано образование водородной связи между макромолекулами гомополимеров в композите, и доказано ускорение пролиферации, дифференцировки и минерализации матрикса остеобластов в клетках МСЗЕЗ-Е1 композитной пленки. Биоразлагаемые пленки на основе хитозана и коллагена также получали с использованием в качестве основы для пленочных материалов морских водорослей – *Gracilaria sp.* [4]. Пленки обладали максимальной прочностью на растяжение в 65,62 МПа, при соответствующем удлинении на разрыв 17,44 %. Авторы работ [5, 6] исследовали биополимерные пленки с иммобилизацией на них различных лекарственных препаратов антибактериального и обезболивающего действия в качестве раневых покрытий.

Приведенные исследования показывают перспективность разработок и использования пленок на основе хитозана и коллагена для биомедицинских приложений. Следует отметить, что все эти работы основаны на изучении смесевых композиций. Целью данной работы является получение блок-сополимеров на основе рыбного коллагена и хитозана, исследование их физико-механических свойств и биосовместимости в сопоставлении с соответствующими смесевыми композициями.

В работе были изучены свойства пленок, полученных из растворов блок-сополимеров и смеси исходных гомополимеров (хитозана и коллагена), взятых в соотношении 1:1 по массе. Поскольку пленки были высушены при 50°C, они содержали воду в связанном состоянии. В работе использовался хитозан с молекулярной массой 330 кДа, полученный из крабовых раковин (ОАО «Биопрогресс», Москва, Россия). Коллаген рыбный получен по методике [7] из шкур атлантической трески (*Gadus morhua*). Блок-сополимеры на основе хитозана и коллагена синтезировали с помощью ультразвукового (УЗ) воздействия на растворы смесей гомополимеров, что является простым и эффективным методом [8, 9]. Этот метод позволяет получать однородные композиционные материалы, содержащие в макромолекулах последовательности звеньев исходных гомополимеров. Варьирование продолжительности УЗ воздействия позволяет регулировать длину блоков полисахарида в процессе получения блок-сополимеров [9]. Было установлено время УЗ воздействия на водноуксуснокислые растворы хитозана и коллагена, при котором достигается предельная деструкция цепей полимеров при данных условиях. В раствор вводили гидрохинон для предотвращения рекомбинации макрорадикалов, образующихся из макромолекул полимеров при УЗ-воздействии. Определение времени, обеспечивающее разрушение цепей гомополимера контролировали по изменению вязкости, оно составило 30 мин. Результат согласуется с результатами ГПХ-исследования, поскольку молекулярная масса хитозана изменяется с 330 кДа до 25 кДа (полидисперсность 1,3) за 30 мин УЗ воздействия, коллагена – с 220 кДа до 23 кДа (полидисперсность 1,2).

В результате 30 мин УЗ-обработки раствора смеси хитозана и коллагена образовывался блок-сополимер со среднемассовой молекулярной массой 310 кДа с полидисперсностью 1,2.

Из растворов полимеров, их механической смеси и блок-сополимера были получены пленки. Пленки блок-сополимеров прозрачны, имеют слегка желтоватый оттенок.

Новые материалы, в особенности для инженерии тканей кожи и костей, должны обладать рядом свойств, без которых их применение сильно ограничивается – высокие прочностные характеристики, биосовместимость, биоразлагаемость. Это обусловлено не только возможным токсическим откликом организма на материал, отсутствием потенциального вреда для окружающей среды, но и его оптимальными физико-химическими свойствами.

В таблице 1 представлены результаты механических испытаний на растяжение пленок различных образцов. Показано возрастание жесткости образцов при введении в них коллагена. Все пленки предварительно были отмыты от кислоты, так как для multifunctionальных биомедицинских приложений целесообразно использовать материалы с нейтральным значением pH среды. Однако при этих условиях пленка из чистого коллагена растворялась. Неотмытая от кислоты коллагеновая пленка обладала низкой прочностью. Высокие прочностные характеристики хитозана обусловлены наличием воды в пленках, поскольку по данному методу их получения – сушкой при 50°C – до 8 % воды остается в полимере в структурно-связанном виде.

В таблице 1 отчетливо прослеживается влияние как молекулярной массы хитозана на прочностные характеристики пленок, так и времени УЗ воздействия.

Таблица 1

**Прочностные характеристики пленочных материалов**

Состав материала	Разрывное напряжение ( $\sigma$ , МПа)	Деформация ( $\epsilon$ , %)
хитозан	53,1±4,7	4,1±0,3
хитозан-коллаген, смесь	82,9±7,8	2,8±0,3
хитозан-коллаген, 5 мин УЗ	95,5±9,5	2,4±0,2
хитозан-коллаген, 30 мин УЗ	123,7±11,5	3,5±0,3

На типичных деформационных кривых механической смеси биополимеров и кривых образцов после воздействия УЗ практически полностью отсутствует область вынужденной эластичности при значительном увеличении разрывного напряжения в сравнении с пленкой исходного хитозана (рис. 1). Это может быть связано как со специфическим взаимодействием коллагена и хитозана, образующих водородные связи между собой, с армированием микрофибриллами коллагена хитозановой матрицы [2], так и с разрушением структуры тройной спирали для коллагена в блок-сополимерах.

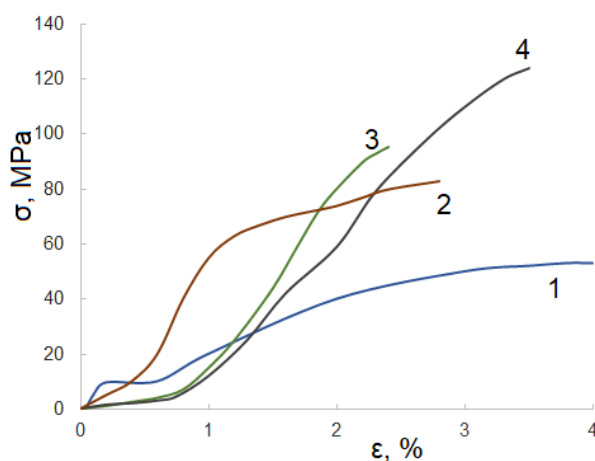


Рис 1. Типичные деформационные кривые образцов:  
 1 – хитозан; 2 – хитозан-коллаген, смесь;  
 3 – блок-сополимер хитозан-коллаген, 5 мин УЗ;  
 4 – блок-сополимер хитозан-коллаген, 30 мин УЗ

Прочность образцов пленок блок-сополимера возрастает более, чем в два раза по сравнению с исходным хитозаном и в 1,5 раза – по сравнению с пленками на основе механической смеси коллагена и хитозана.

Клеточная адгезия имеет решающее значение при создании матриц для регенерации тканей. Известно, что введение коллагена в растворы хитозана улучшает адгезию дермальных фибробластов [10]. Доказана биосовместимость всех композитов на клетках фибробластов hTert-BJ5a (рис. 2), наиболее высокие показатели при исследовании имели пленки блок-сополимеров, причем, чем выше время УЗ-диспергирования, тем выше в итоге степень адгезии и пролиферации фибробластов по поверхности пленок. Пленки механических смесей характеризуются меньшей клеточной адгезией и пролиферацией по сравнению с блок-сополимером.

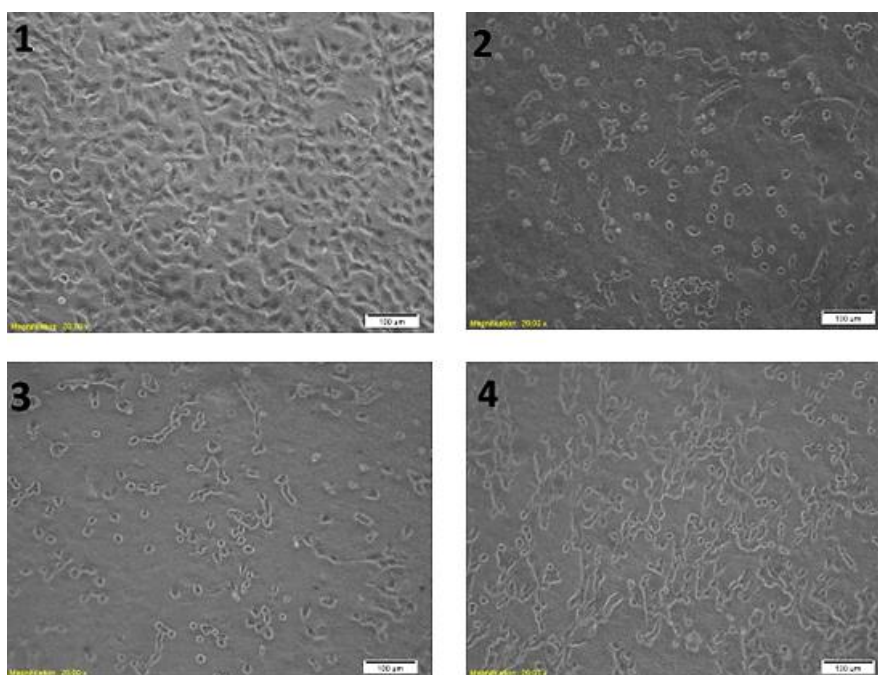


Рис. 2. Исследование биосовместимости материалов на фибробластах hTert-BJ5a пленок состава:  
 1 – сшитый коллаген; 2 – хитозан-коллаген, смесь;  
 3 – хитозан-коллаген, 5 мин УЗ; 4 – хитозан-коллаген, 30 мин УЗ

Методом УЗ воздействия растворов гомополимеров хитозана и рыбного коллагена с высокими молекулярными массами получены блок-сополимеры приводящие к разрушению тройной спирали белка, и равномерному распределению фрагментов цепей гомополимеров в макромолекулах гибридного сополимера.

Совокупность полученных результатов показывает, что композиции на основе блок-сополимеров по механическим свойствам и клеточной адгезии и пролиферации превосходят пленки из гомополимеров и их механической смеси.

Таким образом, материалы на основе сополимеров коллагена с хитозаном перспективны для использования в тканевой инженерии.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-13-00342.*

### Список литературы

1. E.F. Panarin, L.A. Nud'ga, V.A. Petrova, A.M. Bochek, I.V. Goffman, Yu.G. Baklagina, N.N. Saprykina, M.I. Blinova, N.M. Yudinseva, O.G. Spichkina, L.V. Kukhareva, I.A. Samusenko, G.P. Pinaev, G.P. Composite chitin- and chitosan-based matrices for culturing human dermal cells // Cell. Transplant. and Tissue Eng. 2010. Vol. 5, N 1. P. 65–73.

2. R. Shah, P. Stodulka, K. Skopalova, P. Saha. Dual crosslinked collagen/chitosan film for potential biomedical applications // *Polymers*. 2019. Vol. 11. # 2094.
3. X. Wang, G. Wang, L. Liu, D. Zhang. The mechanism of a chitosan-collagen composite film used as biomaterial support for MC3T3-E1 cell differentiation // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. # 39322.
4. M.Z.E. Sinaga, Y.A. Sihombing, R. Hardiyanti, E. Zaidar, R. Bulan, F. Sebayang, D.Y. Pinem. Preparation and mechanical properties of biodegradable films based on seaweed, chitosan, and collagen // *AIP2342 Conference Proceedings*. 2021. # 080015.
5. A.I. Bezhin, V.A. Lipatov, E.V. Fronchek, A.Yu. Grigoryan, M.D.Z. Naimzada. Treatment of infected wounds with a chitosan-collagen complex with dioxidin and lidocain in the experimental conditions // *Med. News North Cauc.* 2019. Vol. 14. P. 159–163.
6. E.V. Fronchek, A.Yu. Grigoryan, V.A. Mitish, L.A. Blatun, Y.S. Paskhalova. Innovative biologically active wound healing and hemostatic agents based on chitosan and collagen: development stages, medical and technical characteristics. *Wounds and wound infections // The Prof. V.M. Kostyuchenok journal*. 2018. Vol. 5, N 4. P. 14–21.
7. Патент РФ № 2567171 «Способ получения уксусной дисперсии высокомолекулярного рыбного коллагена» / Семенычева Л.Л., Астанина М.В., Кузнецова Ю.Л., Валетова Н.Б., Гераськина Е.В., Таранкова О.А., опубликован 10.11.2015, бюл. № 31.
8. M. Degirmenci, H. Catalgil-Giz, Y. Yagci. Synthesis of block copolymers by combined ultrasonic irradiation and reverse atom transfer radical polymerization processes // *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 2004. Vol. 42, N 3. P. 534–540.
9. N.E. Silina, A.G. Morozov, E.E. Gornostaeva, L.A. Smirnova, S.D. Zaytsev. Ultrasound-assisted synthesis of block copolymers of chitosan and D,L-lactide: Structure and properties // *Polym. Sci. Ser. B*. 2017. Vol. 59. P. 551–559.
10. K. McGarry, E. Sefat, T.C. Suh, K.M. Ali, J.M. Gluck. Comparison of NIH 3T3 Cellular adhesion on fibrous scaffolds constructed from natural and synthetic polymers // *Biomimetics*. 2023. Vol. 8. # 99.

## **ПОКРЫТИЯ ИЗ ХИТОЗАНА НА МИКРОЧАСТИЦАХ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ**

**Т.С. Демина<sup>1,2,3</sup>, Е.В. Глотова<sup>2</sup>, Т.Н. Попырина<sup>1,2</sup>, Т.А. Акопова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН,  
ул. Профсоюзная, дом 70, Москва, 117393, Россия*

<sup>2</sup> *Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет),  
Волоколамское шоссе, дом 4, Москва, 125993, Россия*

<sup>3</sup> *Центр «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение», ФГАОУ ВО  
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), ул.  
Трубецкая, дом 8/2, Москва, 119991 Россия  
E-mail: detans@yandex.ru*

Благодаря биосовместимости и способности к биодegradации хитозан перспективен для применения в медицине при создании материалов для регенеративной медицины или систем с пролонгированным выделением лекарственных веществ. Одной из наиболее распространенных форм материалов для медицины являются микрочастицы, которые можно

использовать в качестве микроносителей лекарств/клеток или получать на их основе трехмерные материалы с помощью аддитивных технологий.

Целью работы является создание и исследование покрытий из хитозана на поверхности микрочастиц из различных биodeградируемых полимеров синтетического и природного происхождения. Покрытия из хитозана, его производных и сополимеров получали с использованием двух подходов: (1) в процессе получения микрочастиц из полилактида методом испарения растворителя из эмульсий масло/вода, в которых хитозан и его производные применяли в качестве эмульгаторов в дисперсионной среде; (2) иммобилизацией хитозана на поверхность микрочастиц из полилактида или природных полисахаридов (гиалуроновая кислота, альгиновая кислота) после их формования.

В рамках первого подхода хитозан или его производные применяли в качестве эмульгатора для стабилизации эмульсий масло/вода, в которых в качестве дисперсной фазы выступал раствор полилактида в смеси дихлорметан/ацетон [1]. После испарения растворителей из дисперсной фазы образуются сферические микрочастицы полилактида, поверхность которых обогащена хитозаном или его производными, которые были адсорбированы на границе раздела фаз [2]. Химическая структура хитозана (ММ, СД, наличие заместителей или привитых фрагментов) влияет на его способность стабилизировать микрочастицы в процессе их формования, т.е. на выход микрочастиц, их средний размер и распределение по размерам [3]. Полученные микрочастицы полилактида, содержащие на поверхности хитозан, можно использовать в качестве исходных порошков для формования биodeградируемых трехмерных структур методом поверхностно-селективного лазерного спекания [2].

Второй подход к нанесению покрытий из хитозана на поверхность микрочастиц, основанный на пост-обработке предварительно сформованных микрочастиц, позволяет использовать более широкий диапазон микрочастиц по составу и форме. Для нанесения покрытий из хитозана на поверхность материалов из полилактида их поверхность необходимо предварительно активировать в смеси растворителей, а потом выдержать в растворе хитозана [4]. В этом случае характеристики покрытия будут определяться условиями активации поверхности подложки и нанесения покрытия. Таким образом, на микрочастицы из полилактида, полученные размолотом его гранул, было нанесено покрытие из хитозана, благодаря которому данные микрочастицы также можно использовать для создания трехмерных структур с использованием аддитивных технологий [5]. Методом пост-обработки хитозан также можно наносить на поверхность микрочастиц из полисахаридов, полученных путем гелирования растворов альгиновой и гиалуроновой кислоты. Гидрогели в форме микрочастиц получали путем капельного добавления смеси 1 % водных растворов альгината и гиалуроната натрия в 2 мас. % водный раствор хлорида кальция. После гелирования полианионов (20 мин) образцы промывали в дистиллированной воде, выдерживали в 2% растворе хитозана (ММ 350 кДа, СД 0.86, «Сонат», Россия) в 1 % уксуснокислом водном растворе в течение 20 мин и промывали в дисстиллированной воде. Исследование скорости высвобождения кармина из полученных гидрогелей, проведенное фотометрически по оптической плотности аликвот воды, в которых выдерживались гидрогели, показало пролонгированное высвобождения кармина из гидрогелей, покрытых хитозаном [6].

Таким образом, нанесение покрытий из хитозана на микрочастицы различной природы позволяет формировать на их основе системы с пролонгированным выделением низкомолекулярных компонентов и биodeградируемые трехмерные материалы для регенеративной медицины.



### Список литературы

1. Demina T.S., Akopova T.A., Vladimirov L.V., Zelenetskii A.N. et al. Polylactide-based microspheres prepared using solid-state copolymerized chitosan and D, L -lactide // Mater. Sci. Eng. C. 2016. Vol. 59. P. 333–338.
2. Demina T.S., Popyrina T.N., Minaeva E.D., Dulyasova A.A. et al. Polylactide microparticles stabilized by chitosan graft-copolymer as building blocks for scaffold fabrication via surface-selective laser sintering // J. Mater. Res. 2022. Vol. 37, N 4. P. 933–942.
3. Demina T.S., Kilyashova L.A., Popyrina T.N., Svidchenko E.A. et al. Polysaccharides as stabilizers for polymeric microcarriers fabrication // Polymers (Basel). 2021. Vol. 13, N 18. # 3045.
4. Demina T.S., Frolova A.A., Istomin A.V., Kotova S.L. et al. Coating of polylactide films by chitosan: Comparison of methods // J. Appl. Polym. Sci. 2020. Vol. 137, N 3. # 48287.
5. Минаев Н.В., Демина Т.С., Минаева С.А., Дулясова А.А. et al. Развитие метода поверхностно-селективного лазерного спекания: модификация и формирование 3D структур для тканевой инженерии // Известия Российской академии наук. Серия физическая. 2020. Т. 84, № 11. С. 1530–1536.
6. Глотова Е.В. Гидрогели на основе гиалуроновой кислоты для пролонгированного высвобождения низкомолекулярных соединений // Сборник тезисов работ международной молодежной научной конференции XLIX Гагаринские чтения 2023, 11–14 апреля 2023 г., Москва, Россия. 2023. С. 632.

## ПЕРСПЕКТИВЫ КОММЕРЦИАЛИЗАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ В МЕДИЦИНСКОЙ ОТРАСЛИ

**П.Л. Иванов**

*Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН  
(ИСПМ РАН), Профсоюзная улица, дом 70, Москва, 117393, Россия  
E-mail: ivanovpl@inbox.ru*

Одним из основных ориентиров в современной экономике для стран с существенным вкладом интеллектуальной составляющей является показатель эффективности инновационной деятельности. Причем современный тренд направлен не столько на увеличение количества успешных разработок, сколько на сокращение разницы показателей «коммерчески успешный проект/ идея». Что примечательно, сейчас этот показатель для большинства стран приблизительно одинаков и находится в пределах  $2-3 \cdot 10^{-4}$ . При этом по количеству коммерчески успешных проектов США опережает РФ более чем на порядок. Одно из конкурентоспособных направлений инновационной деятельности в РФ, заслуживающего отдельного внимания, является отрасль медицины.

Одной из определяющих сложностей в продвижении изделий на основе полисахаридов в области медицины является их непосредственное применение (имплантированные материалы, продукты, контактирующие с кровью и т.д.). Регистрация таких продуктов попадает под самый высокий класс потенциального риска применения медицинского изделия (2б, 3), что влечет за собой повышенную сложность в прохождении данной процедуры. Также

продукты научных разработок подразумевают под собой инновационность изделия, что является оборотной стороной при проведении клинических испытаний, где при проведении клиники методом анализа клинических данных эксперты Росздравнадзора уделяют повышенное внимание приведенным в анализе аналогам. Проведение же клинических испытаний с участием человека связано с высокими финансовыми затратами, длительностью проведения испытаний и сложностью подбора клинических организаций, аккредитованных и согласных на проведение данных мероприятий.

В работе анализируются общемировые причины, которые встают на пути коммерчески успешной реализации проекта. Помимо этих факторов, рассматривается роль специфических для российской действительности причин при продвижении медицинской продукции, таких как: административный барьер (регистрация и т.д.), кредитная политика государства и инфраструктура.

В докладе оцениваются плюсы и минусы различных способов и подходов по минимизации выше описанных причин, такие как: продвижение в бизнес инкубаторе или Технопарке, где созданы целые структуры для отработки технологий инновации, различных консультаций и финансирования проектов; продвижение с помощью частных инновационных компаний (R&D), или приглашение в научную команду R&D – менеджера.

## **ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ХИТОЗАНА НА СПОСОБНОСТЬ ЛПС ВЗАИМОДЕЙСТВОВАТЬ С КЛЕТКАМИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ**

**В.Н. Давыдова<sup>1</sup>, А.В. Володько<sup>1</sup>, В.И. Горбач<sup>1</sup>,  
С.В. Чусовитина<sup>2</sup>, Т.Ф. Соловьева<sup>1</sup>, И.М. Ермак<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Тихоокеанский Институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение Российской Академии Наук, просп. 100-летия Владивостока, дом 159, Владивосток, 690022, Россия

<sup>2</sup> Институт автоматики и процессов управления, Дальневосточное отделение Российской академии наук, ул. Радио, дом 5, Владивосток, 690041, Россия  
E-mail: vikdavidova@yandex.ru

Проблема терапии инфекционных заболеваний, вызванных бактериями, не теряет своей актуальности. В последнее время она осложняется появлением новых антибиотико-резистентных штаммов со множественной лекарственной устойчивостью. Это приводит к тому, то антибиотики не всегда являются эффективными средствами борьбы, в связи с чем продолжается поиск антибактериальных веществ, в основном природного происхождения, способных нейтрализовать действие бактерий. Природный полисахарид хитозан известен своей антибактериальной активностью, в основе которой лежит его способность взаимодействовать с компонентами мембраны бактерий. В случае грамотрицательных бактерий – это основной компонент наружной мембраны – липополисахарид (ЛПС, эндотоксин).

Для изучения влияния хитозана на способность ЛПС взаимодействовать и активировать клетки иммунной системы был получен набор комплексов ЛПС из грамотрицательной бактерии *Escherihia coli* с хитозанами при разном соотношении компонентов.

В представленной работе мы использовали хитозан с молекулярной массой 110 кДа (ХН-110) и олигохитозан с молекулярной массой 5 кДа (ХН-5). Для оценки взаимодействия с клетками организма была использована проточная цитометрия и ЛПС, меченый флуоресцеин-5-изотиоцианатом. При образовании комплексов методом атомно силовой микроскопии зафиксировано изменение надмолекулярной организации ЛПС. Показано, что комплексы имели разную стабильность в биологических средах. Комплексы с соотношением ЛПС-ХН 1:1 в/в, независимо от молекулярной массы ХН, в присутствии сывороточных белков теряли свой поверхностный заряд и имеют склонность к агрегации, комплексы с высоким содержанием ХН более стабильны, не агрегировали и сохраняли свой поверхностный заряд. Комплексы способны связываться с клетками иммунной системы – нейтрофилами. В отсутствие сывороточных белков, эндотоксин и его комплексы в основном оставались на поверхности клетки. При этом связывание с ХН не ингибировало взаимодействие ЛПС с клеткой. Внесение в среду белков сыворотки увеличивало количество ЛПС, связавшегося с нейтрофилом и способствовало поступлению эндотоксина внутрь клетки. При этом ХН-110 обладал способностью ингибировать прикрепление ЛПС к нейтрофилам и ингибировать синтез ФНО- $\alpha$  не только в составе комплекса, но и при предварительной обработке клеток поликатионом.

## **ВЛИЯНИЕ ХИТОЗАНА И ГЕКСАНОИЛ ХИТОЗАНА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ЛИНИЙ КЛЕТОК 3Т3 И 3Т3-L1**

**Б.Ц. Шагдарова<sup>1</sup>, М.В. Коновалова<sup>2</sup>, Е.В. Свирцевская<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *ФИЦ Биотехнологии РАН, Ленинский проспект, дом 33, стр. 2, Москва, 119071, Россия*

<sup>2</sup> *Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
Москва, 117997, Россия*

*E-mail: shagdarova.bal@gmail.com*

Ожирение и сахарный диабет 2 типа являются проявлением метаболического синдрома, который стал серьезной проблемой здравоохранения во всем мире. На сегодняшний день проводится поиск веществ, которые бы снижали риск и проявления метаболического синдрома [1]. Хитозан обладает многими уникальными биологическими свойствами, в числе которых: гиполипидемические, противодиабетические и антиоксидантные [2]. Химическая модификация хитозана возможна благодаря присутствию в молекуле хитозана реакционноспособных аминогрупп, а также первичных и вторичных гидроксильных групп [3]. Такой подход позволяет изменить химические свойства, усилить или добавить биологическую активность в зависимости от природы введенных групп, сохраняя при этом естественную основу хитозана. Таким образом, хитозан и его производные могут быть потенциальными терапевтическими средствами для лечения метаболических нарушений. Механизмы дифференцировки преадипоцитов изучаются, главным образом, посредством экспериментального моделирования адипогенеза *in vitro* [4]. Исследователи используют преадипоциты 3Т3-L1, способные, как терминально дифференцироваться в адипоциты, так и оставаться в недифференцированном состоянии. Этот процесс имитирует созревание клеток-предшественников жировой ткани и отложение липидов при развитии ожирения у людей. 3Т3-L1 часто

используются для выяснения различных лежащих в основе клеточных и молекулярных событий, вовлеченных в процесс адипогенеза [5]. Целью данной работы был анализ эффекта хитозана и его производных на пролиферацию/дифференцировку мышечных клеток линий 3Т3 и 3Т3-L1 в адипоциты.

В ходе работы были использованы хитозаны с молекулярными массами (ММ) 30, 60, 100 и 700 кДа, со степенями дезацетилирования (СД) 90-95 %, полученные азотнокислым гидролизом. На основе хитозана 30 кДа были получены ацилированные производные гексаноил хитозаны (С6) со степенями замещения (СЗ) 10, 23 и 33% (С6.1, С6.2, С6.3 соответственно). Молекулярные массы хитозанов определяли методом высокоэффективной гель проникающей хроматографии, СД и СЗ определяли методом протонного магнитного резонанса.

Клетки 3Т3 и 3Т3-L1 выращивали на среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и антибиотиков. Перед постановкой эксперимента клетки снимали с флаконов трипсином, вносили в 96-луночные планшеты (2500 клеток на лунку) в лунки с заранее раститрованными образцами хитозанов и его производных в культуральной среде или с добавлением инсулина, 3-изобутил-1-метилксантина и дексаметазона для определения влияния на дифференцировку клеток в адипоциты. Инкубировали клетки в течение 10 дней в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C. Пролиферацию/функцию митохондрий оценивали методом МТТ. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли диметилсульфоксидом [6]. Анализ оптической плотности проводили спектрометрически.

Добавление дифференцировочных факторов останавливало пролиферацию клеток обеих линий (рис. 1А), что может свидетельствовать как о стимуляции дифференцировки, так и о возможной токсичности дифференцировочных факторов. Отношение оптических плотностей, пропорциональное количеству живых клеток, показывает, что эффект дифференцировочных факторов на 3Т3 и 3Т3-L1 жизнеспособность был одинаковым (рис. 1Б).

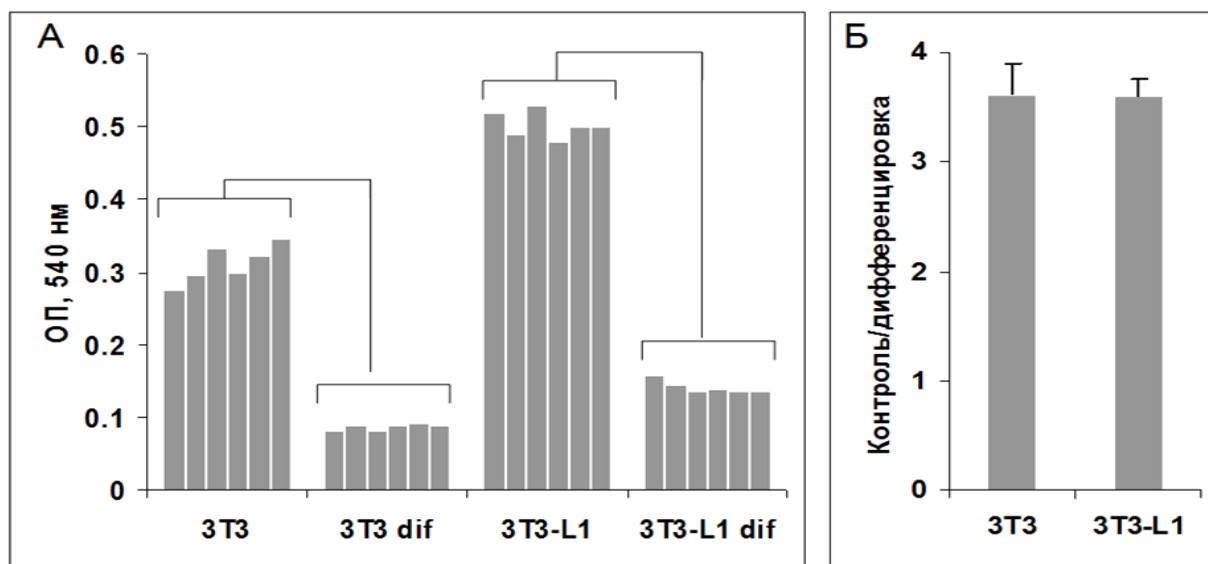


Рис. 1. Влияние дифференцировочных факторов (dif) на пролиферацию клеток 3Т3 и 3Т3-L1. А. Приведены оптические плотности (ОП) контрольных культур. Достоверные отличия показаны скобками. Б. Отношение ОП в контрольных культурах к дифференцировочным

Инкубация клеток 3Т3 с хитозанами разной ММ привела к стимуляции пролиферации клеток в ряду ММ 30>60>100>700 кДа (рис. 2А). На клетках 3Т3-L1 хитозаны разной ММ

проявляли примерно равную токсичность в концентрации 250 мкг/мл и стимуляцию при низких концентрациях (Рис. 2С). Хитозаны С6 также стимулировали рост клеток 3Т3 в ряду С6.1>С6.2=С6.3 (Рис. 2В). Уровень пролиферации в присутствии С6.1 достоверно превышал пролиферацию в присутствии С6.2 и С6.3 ( $p$  0.004 и 0.012 соответственно). Различий между эффектами С6.2 и С6.3 не выявили ( $p=0.2$ ). Интересно, что гексаноил хитозаны подавляли пролиферацию клеток 3Т3-L1 (рис. 2Г).

При добавлении дифференцировочных факторов хитозаны с разной ММ восстанавливали пролиферативную способность как клеток 3Т3, так и 3Т3-L1 (рис.2, А, Б). Минимальный эффект на обоих типах клеток показал хитозан ММ 700 кДа. Гексаноил хитозаны также восстанавливали пролиферацию клеток 3Т3, так и 3Т3-L1 (рис. 2, В, Г). Различий между гексаноил хитозанами с разной СЗ не выявили.

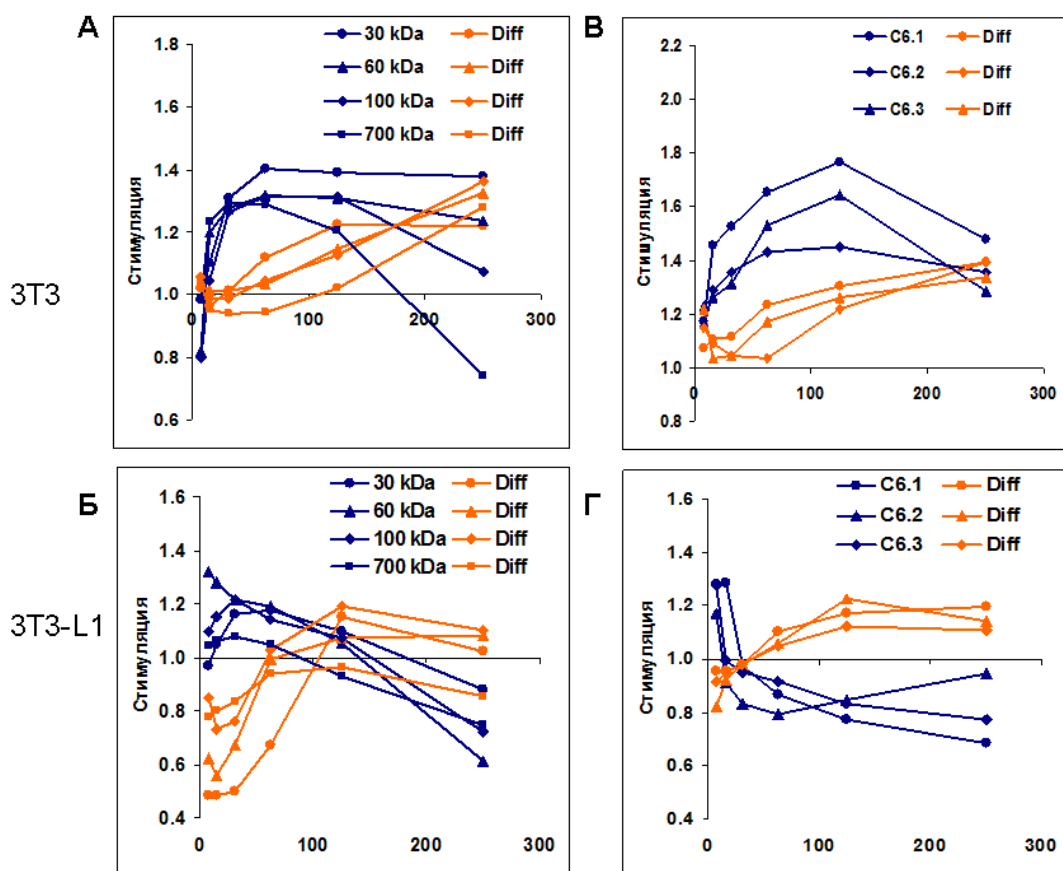


Рис. 2. Индекс стимуляции пролиферации хитозанами с различными ММ и гексаноил хитозанами С6.1, С6.2, С6.3 со степенями замещения 10, 23 и 33 % соответственно на клеточные линии 3Т3 (А, В) 3Т3-L1 (Б, Г) в культуральной среде или с дифференцировочными факторами (Diff)

Считается, что линия фибробластов мыши 3Т3-L1 способна дифференцироваться в адипоциты под действием специфических факторов. Линия 3Т3 была использована как контроль. Показали, что дифференцировочные факторы в равной степени подавляют пролиферацию клеток линий 3Т3 и 3Т3-L1. Для анализа дифференцировки клетки по окончании инкубации окрашивали липофильной краской Oil Red.

Показали, что, во-первых, число клеток действительно снижается (рис. 3) и, во-вторых, дифференцировка наблюдается не только в клетках 3Т3-L1 (рис. 3, Б), но и в клетках 3Т3 (рис. 3, Г), хотя и в меньшей степени. В целом, преадипоциты 3Т3-L1 более чувствительны к

препаратам хитозана в контроле, в то время как хитозаны стимулируют пролиферацию контрольных ЗТЗ клеток. Можно предположить, что хитозаны тормозят пролиферацию преадипоцитов и стимулируют рост нормальных клеток. В условиях действия дифференцировочных факторов, хитозаны препятствуют дифференцировке, что потенциально можно использовать для терапии ожирения и развития метаболических осложнений.

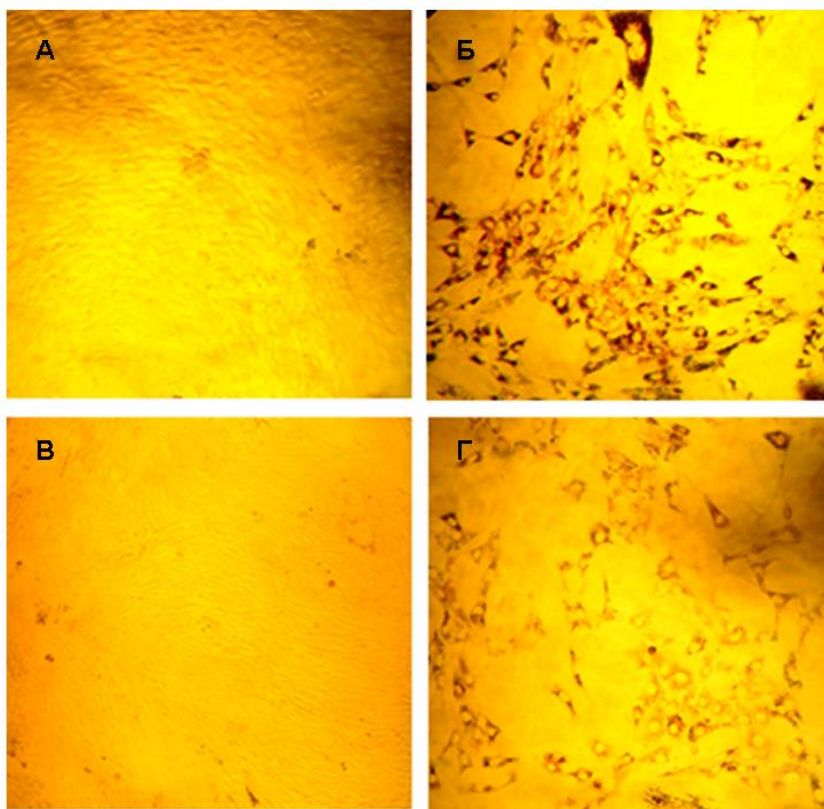


Рис. 3. Дифференцировка клеток ЗТЗ и ЗТЗ-Л1 под действием дифференцировочных факторов. Клетки ЗТЗ- Л1 (А, Б) и ЗТЗ (В, Г) в контроле (А, В) и после 10 дней дифференцировки (Б, Г). Окраска Oil Red

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-10070, <https://rscf.ru/project/23-24-10070>.

### Список литературы

1. Н.Н. Wang, D.K. Lee, M. Liu, P. Portincasa, D.Q.H. Wang. Novel insights into the pathogenesis and management of the metabolic Syndrome // *Pediatr. Gastroenterol. Hepatol. Nutr.* 2020. Vol. 23; N 3. P. 189–230. DOI: 10.5223/pghn.2020.23.3.189.
2. V.P. Varlamov, A.V. Il'ina, B.Ts. Shagdarova, A.P. Lunkov, I.S. Mysyakina. Chitin/chitosan and its derivatives: Fundamental problems and practical approaches // *Biochemistry (Moscow)*. 2020. Vol.85 (Suppl 1). P. S154–S176. DOI: 10.1134/S0006297920140084.
3. N.A. Negm, H.H.H. Hefni, A.A.A. Abd-Elaal, E.A. Badr, M.T.H. Abou Kana. Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 152, P. 681–702. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.02.196.
4. K. Meijer, M. de Vries, S. Al-Lahham, M. Bruinenberg, D. Dijkstra, N. Kloosterhuis, R.J. van der Leij, H. van der Want, B.-J. Kroesen, R. Vonk, F. Rezaee. Human primary adipocytes exhibit immune

cell function: Adipocytes prime inflammation independent of macrophages // PLoS One. 2011. Vol. 6. # e17154. DOI: 10.1371/journal.pone.0017154.

5. J.M. Ntambi, K. Young-Cheul. Adipocyte differentiation and gene expression // J. Nutr. 2000. Vol. 130. P. 3122S–3126S. DOI:10.1093/jn/130.12.3122S.

## **МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ, ФОРМИРУЕМЫЕ ПРИ МОДИФИКАЦИИ СИНТЕТИЧЕСКИХ И БИОПОЛИМЕРОВ В СВЕРХКРИТИЧЕСКОМ ДИОКСИДЕ УГЛЕРОДА**

**А.Б. Соловьева<sup>1</sup>, В.С. Каплин<sup>1</sup>, Н.А. Аксенова<sup>1,2</sup>, А.С. Копылов<sup>1,3</sup>, И.В. Шершнев<sup>1</sup>,  
С.Ф. Тимашев<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова  
Российской академии наук, ул. Косыгина, дом 4, Москва, 119991, Россия*

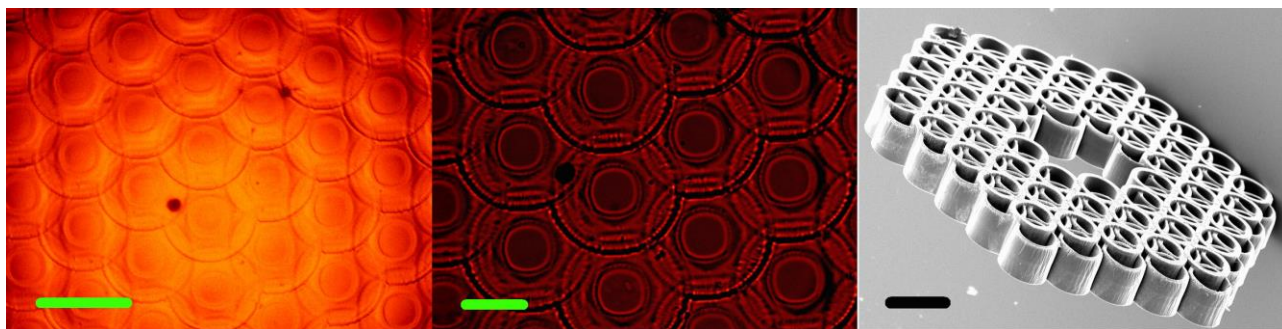
<sup>2</sup> *Институт регенеративной медицины, Первый Московский государственный медицинский  
университет им. И.М. Сеченова, Большая Пироговская ул., дом 2, стр. 4,  
Москва, 119435, Россия*

<sup>3</sup> *Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Российский  
технологический университет, пр. Вернадского, дом 86, Москва, 119571, Россия  
E-mail: ann.solovieva@gmail.com*

Проблемы модификации полимеров, в том числе, биоразлагаемых и биосовместимых, для придания им комплекса новых свойств, являются активным полем деятельности многих исследовательских групп. Химическую модификацию полимеров обычно осуществляют путем варьирования условий полимеризации, в том числе, использования смеси стереоизомеров (например, при получении полилактидов [1]), или получая сополимеры с целевыми мономерами. Так, для повышения гидрофильности, пластичности и улучшения адгезии к клеткам получают сополимеры гидрофобного полилактида с  $\epsilon$ -капролактоном [2]. Для улучшения перерабатываемости и повышения растворимости матриц используют хитозан (обычно растворяющийся лишь в слабокислых средах), получая его сополимеры с лактидом, причем из-за отсутствия общего растворителя, модификацию хитозана проводят в твердой фазе [3]. Одним из перспективных способов контролируемого изменения свойств гидроксилсодержащих, гидрофобных полимеров (например, полигидроксиалканоатов, в том числе, полилактидов, ПЛА) может оказаться химическая модификация концевых гидроксильных групп, в частности, введение в макромолекулы ковалентно-связанных полимеризационно-способных олигомерных группировок. Варьируя размеры олигомерного блока и природу боковых заместителей, можно менять степень гидрофобности полимера, улучшать механические свойства, сродство к клеточным культурам. Фотоактивацией непердельных связей в олигомерных блоках модифицированного полимера можно менять степень сшивки соответствующих конструкций и плотность получаемого биоразлагаемого материала. Формируемые таким путем материалы перспективны для использования при производстве биоимплантатов. В частности, особый интерес представляет использование ПЛА и их сополимеров в тканевой инженерии, прежде всего, в инженерии костной ткани,

когда из биodeградируемого полимера формируется трехмерная структура, на которую высаживаются аутологичные стволовые клетки, и при помещении такой конструкции в костный дефект происходит формирование ткани за счет роста и дифференциации клеток [4]. В данной работе осуществлена химическая модификация концевых гидроксильных групп полилактида с введением полимеризационно-способных метакрильных группировок. Процесс проводили в среде сверхкритического диоксида углерода (ск-СО<sub>2</sub>) по реакции уретанообразования взаимодействием ПЛА с изофорондиизоционатам (ИФ) и моно(мет)акриловым эфиром этиленгликоля (МАЭГ) в присутствии оловоорганических катализатора. Степень модификации полилактида устанавливали ИК-спектроскопией и гелепроникающей хроматографией (ГПХ). Последующей фотополимеризацией модифицированных ПЛА были получены пространственно-сшитые структуры, пригодные для формирования имплантатов (рис. 1). Интересно отметить, что роль сшивающего агента при отверждении продукта взаимодействия ПЛА с монометакрилатом этиленгликоля играли диметакрилаты, образующиеся в качестве побочных продуктов. Степень сшивания (25-35%) оценивали по количеству незаполимеризованного ПЛА, экстрагированного в ТГФ из образца после облучения. Оказалось, что продукт взаимодействия ПЛА с монометакрилатом этиленгликоля образует трехмерно-сшитую структуру, практически не растворимую в ТГФ.

Для получения образцов трехмерных сшитых структур разного профиля были сформированы 3-мерные структуры с использованием метода 2-фотонной полимеризации (рис. 1) [5]. Структурирование проводилось в присутствии 1 % кетона Михлера (в качестве инициатора) на установке, представленной в работе, для удаления непрореагировавшего материала использовался дихлорметан (98 %). Формирование трехмерных структур происходило без искажений и усадки, что позволяет рассматривать разработанный подход как удачный для изготовления высокоточных биodeградируемых структур.



*Рис. 1.* Микрофотографии ряда структур, полученные в процессе их формирования в ходе 2-фотонной полимеризации на оптическом микроскопе (а, б) и сканирующем электронном микроскопе (в). Шкала – 150 мкм (а, б) и 300 мкм (в), соответственно

### Список литературы

1. A. Sodergard, M. Stolt. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition // Prog. Polym. Sci. 2002. Vol. 27, Iss. 6. P. 1123–1163.
2. D. Pappalardo, L. Annunziata, C. Pellecchia. Living ring-opening homo- and copolymerization of  $\epsilon$ -caprolactone and L- and D, L-lactides by dimethyl(salicylaldiminato) aluminum compounds // Macromolecules. 2009. Vol. 42, Iss. 16. P. 6056–6062.
3. Твердофазная сополимеризация L, D-лактида с хитозаном / Т.С. Демина, Л.В. Владимиров, Т.А. Аكوпова, А.Н. Зеленецкий // Химия в интересах устойчивого развития. 2013. Т. 21. С. 631–637.



4. The use of acellular matrices for the tissue engineering of cardiac valves / R.L. Knight, H.E. Wilcox, S.A. Korossis et al. // Proc. Inst. Mech. Eng. H. 2008. Vol. 222, Iss. 1. P. 129–143.
5. A. Koroleva, A. Deiwick, A. Nguyen et al. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in 3-D Zr-Si organic–inorganic scaffolds produced by two-photon polymerization Technique // PLoS ONE. 2015. Vol. 10, Iss. 2. # e0118164.

## **КАРБОКСИЭТИЛХИТОЗАН СШИТЫЙ ГЛУТАРАЛЬДЕГИДОМ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ГЕЛЕВЫЙ НОСИТЕЛЬ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

**А.В. Корель<sup>1</sup>, А.Г. Самохин<sup>1</sup>, Е.О. Землякова<sup>2</sup>, А.В. Пестов<sup>2</sup>, Е.А. Блинова<sup>1</sup>, М.В. Зеликман<sup>3</sup>, В.О. Ткаченко<sup>4</sup>, В.Д. Бец<sup>1</sup>, С.О. Кретьен<sup>5</sup>, Е.Л. Аржанова<sup>1</sup>, Е.А. Литвинова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный технический университет», проспект Карла Маркса, дом 20, Новосибирск, 630073, Россия*

<sup>2</sup> *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, ул. Софьи Ковалевской, дом 20, Екатеринбург, 620108, Россия*

<sup>3</sup> *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Кутателадзе, дом 18, Новосибирск, 630090, Россия*

<sup>4</sup> *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера Сибирского отделения Российской академии наук, проспект Лаврентьева, дом 11, Новосибирск, 630090, Россия*

<sup>5</sup> *Федеральное государственное бюджетное учреждение Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Министерства здравоохранения РФ, ул. Фрунзе, дом 17, Новосибирск, 630091, Россия*  
*Email: samoxin@corp.nstu.ru*

Значительный прогресс последнего десятилетия в области развития органической химии, наряду с формируемым запросом со стороны различных отраслей промышленности и медицины, привел к появлению большого количества гелей из материалов как природного, так и синтетического происхождения, а также их комбинаций, что открывает большие перспективы по их применению для решения широкого спектра задач, начиная от сельского хозяйства и заканчивая биологией и медициной.

В последнем случае предпочтение чаще отдают гидрогелям из сырья природного происхождения, что нашло свое выражение в массиве работ по созданию различных имплантатов, носителей для доставки лекарств и каркасов для тканевой инженерии. Одним из таких природных полимеров является хитозан, известный своей биосовместимостью, отсутствием токсичности, сорбционными свойствами и способностью к биодegradации, обусловленными наличием amino-, гидроксильных и эфирных функциональных групп [1, 2].

Возрастающий последнее десятилетие интерес к фаготерапии сталкивается с целым рядом барьеров, среди которых имеются и сугубо прикладные задачи, связанные с доставкой

бактериофагов к точке приложения. В частности - транспорт бактериофагов на раневые поверхности, либо в кишечник с защитой от воздействия агрессивных факторов среды и ферментов в целях сохранения максимально возможного титра и литической активности бактериофагов для получения терапевтического эффекта, поскольку оптимальный диапазон рН функционирования фагов лежит в пределах 6,0–8,0.

Среди прочих производных хитозана интерес с биомедицинской точки зрения, благодаря своим свойствам, представляет карбоксиэтилхитозан (КЭХ) – это и растворимость в воде в широком диапазоне значений рН [3], превосходящая немодифицированный хитозан биосовместимость [4], антиоксидантные свойства и выраженная антимуtagenная активность [5], большая способность к желированию, нежели у немодифицированного хитозана [6]. Тем не менее, в мировой литературе очень мало публикаций [7–10], которые бы описывали свойства КЭХ и возможные направления для его применения.

Карбоксиалкильные группы в составе молекулы хитозана увеличивают сродство полимера к клеточным субстратам [11, 12]. В нашем предыдущем исследовании КЭХ продемонстрировал один из лучших результатов по биосовместимости с клетками фибробластов человека [13].

В настоящем исследовании мы решили изучить КЭХ как возможный носитель для биомедицинского применения в качестве средства доставки бактериофагов в желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) с его переменным рН, а также в фармакологические точки приложения с фиксированной щелочной и кислой рН в модельном эксперименте *in vitro*. Одновременно мы хотели проверить метод фотонно-корреляционной спектроскопии как способ точного подсчета эмиссии из гелевого носителя малоразмерных частиц, таких как вирусы (бактериофаги).

### Материалы и методы

Величины равновесного набухания были рассчитаны гравиметрическим методом. Элементный анализ вещества осуществляли методами ЯМР- и ИК-Фурье-спектроскопии. Моделирование среды для имитации условий желудочно-кишечного тракта проводили в условиях *in vitro* в жидкой среде с использованием инкубатора, снабженного ротационной платформой для постоянного перемешивания жидкости. В качестве тестового штамма вирусов-бактериофагов использовали штамм *Staphylococcus spp.* в исходном титре не менее чем  $10^5$  КОЕ/мл, в качестве бактериального тестового штамма был использован *S. aureus* (АТСС 29213). Детекцию вирусных частиц, выгруженных из гелевого носителя, осуществляли методом фотонно-корреляционной спектроскопии, их антибактериальную (литическую) активность оценивали микробиологическими методами.

### Результаты исследования

*Спектральные характеристики синтезированного геля и характеристика его набухания*

КЭХ со степенью замещения 1,0 был синтезирован методом синтеза в геле с добавлением акриловой кислоты [14], с использованием глутаральдегида в качестве сшивающего агента [14].

ЯМР-спектрограмма (Рис. 1) отражает сигналы атомов водорода в основной полимерной цепочке (2.07 (CH<sub>3</sub>), 3.07 (H-2 GlcNH<sub>2</sub>), 3.44–4.10 (H-2,3,4,5,6), 4.63 (H-1 GlcNHAc), 4.92 (H-1 GlcNH<sub>2</sub>) ppm (частиц на миллион)) и новых карбоксиэтиловых групп (3.35 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.33 (H-2 GlcNHCH<sub>2</sub>) ppm).

Сигналы 4.92, 5.06 and 5.25 ppm соответствуют Н-1 атому глюкозамина, содержащему первичный, вторичный и третичный амин соответственно, что подтверждает N-функционализацию хитозана.

Анализ методом ИК-Фурье спектроскопии показал, что помимо спектров поглощения в 3243 (О–Н, N–Н), 2872 (С–Н), 1709 (СООН), 1568, 1394 (COO<sup>-</sup>) и 1060, 1032 (С–О, С–С) см<sup>-1</sup>, характерных для КЭХ, в полученных образцах присутствует также и очень слабый спектр с длиной волны 1641 см<sup>-1</sup>, что характеризует С=N иминовую связь, которая образуется в ходе взаимодействия между КЭХ и глутаральдегидом.

Полученный гель КЭХ демонстрирует рН- и температурозависимый характер набухания: максимальные величины были зарегистрированы при нейтральной и слабощелочной рН. Увеличение температуры среды приводило к росту величин набухания для большинства значений рН - величина набухания возрастала, начиная от рН = 3,0 (687 %) и вплоть до щелочных значений рН=7,0, достигая 1127 %. Максимальная степень набухания в 1212 %, тем не менее, была достигнута при рН=8,0 и температуре 22°C.

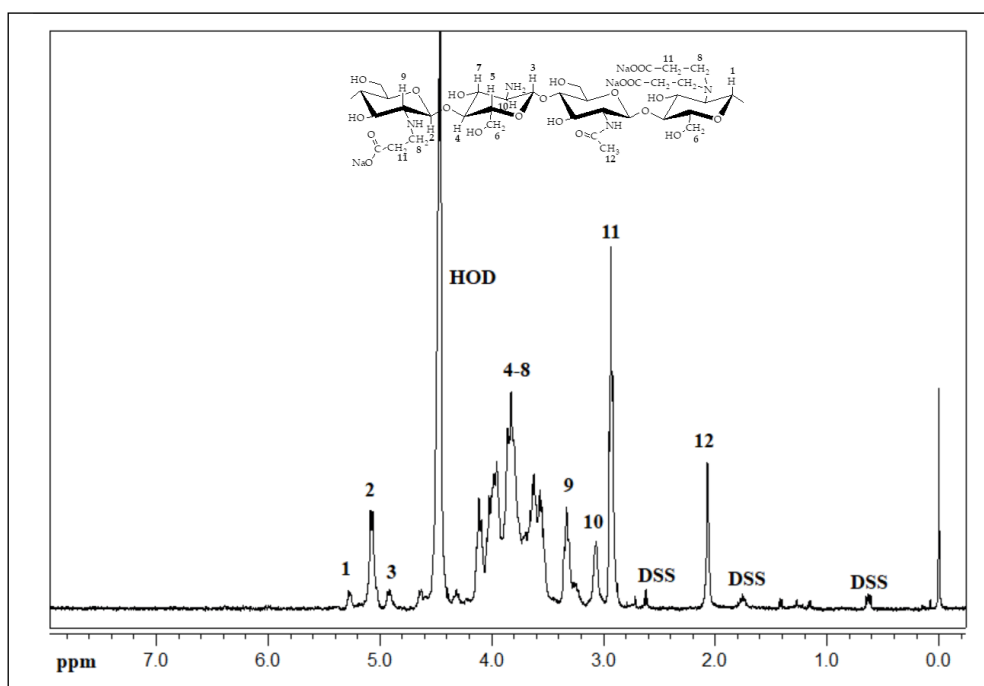


Рис. 1. 400 МГц <sup>1</sup>Н ЯМР-спектр N-(2-карбоксиил)хитозана со степенью замещения 1,0 (D<sub>2</sub>O/DCI) (DSS – 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфонат натрияевая соль была использована в качестве внутреннего <sup>1</sup>Н ЯМР-стандарта; ppm – частицы на миллион)

#### *Скорость высвобождения из геля в средах с различным водородным показателем*

В ходе эксперимента по исследованию эмиссии полезной нагрузки из образца КЭХ, предварительно доведенного до предельного набухания раствором, содержащим терапевтический агент (бактериофаг) и флюоресцентный краситель (мегломина акридонацетат), при последующем помещении нагруженного образца в условия с постоянной температурой 37°C и различным водородным показателем буферной среды – кислой рН (2.2) и щелочной рН (7.4), было установлено, что тенденцию к наибольшей величине эмиссии полезной нагрузки образец демонстрирует в кислой среде, с последующим постоянным снижением величины оптической плотности (ВОП), как эквивалента величины эмиссии в буферной среде с течением времени, вплоть до 4-го часа наблюдений от момента начала эксперимента.

Снижение ВОП было полуторакратным в щелочной среде – от 0,196 [0,194; 0,198] до 0,128 [0,123; 0,130], и в 1,9 раза в кислой среде – от 0,243 [0,237; 0,249] до 0,135 [0,123; 0,136] к третьему часу наблюдений, при этом статистически значимой разницы между медианами ВОП в кислом и в щелочном вариантах буферной среды не отмечено ( $p = 0,500$  во всех случаях, с учетом поправки Бонферрони на множественность сравнений).

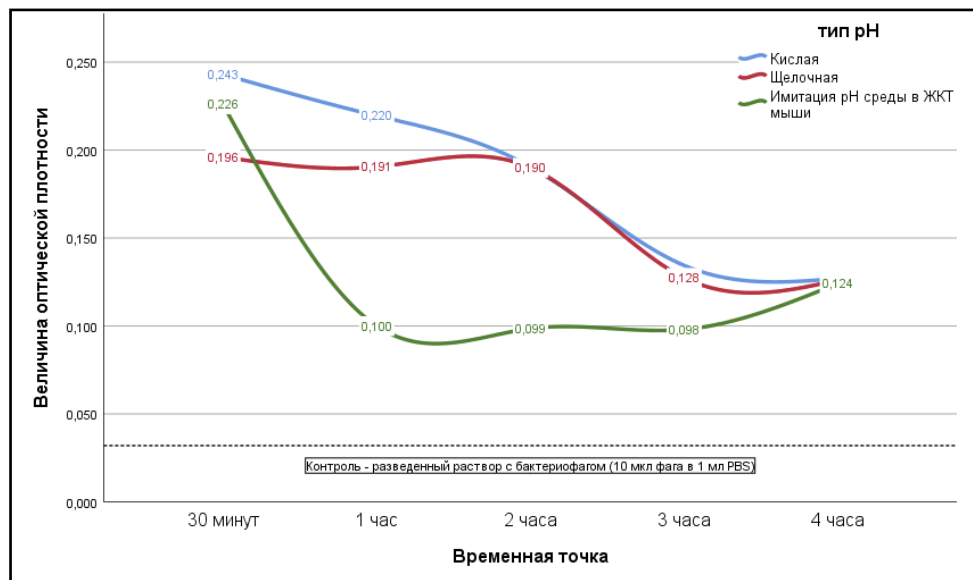


Рис. 2. График эмиссии из гелевого образца КЭХ, предварительно нагруженного раствором, содержащим терапевтический агент (бактериофаг) и краситель (меглюмина акридонатацетат), для трех вариантов эмиссионных сред с постоянной температурой 37°C

Подсчет абсолютного количества содержащихся в анализируемых аликвотах вирусных частиц методом фотонно-корреляционной спектроскопии показал, что доминирующим размером частиц во всех исследуемых аликвотах была величина порядка 80–100 нм, а максимум интенсивности рассеяния света частицами в исследуемых аликвотах приходился на второй час от начала эксперимента.

Полученные результаты эмиссии также показали, что кинетика высвобождения из геля КЭХ происходит очень быстро в течение двух часов инкубации при фиксированном значении pH. В случае моделирования условий ЖКТ это является ограничивающим фактором для применения такого носителя в целях доставки бактериофагов в ЖКТ, поскольку высвобождение произойдет уже в кислой среде желудка, что приведет к элиминации бактериофагов и утрате их терапевтической эффективности, что было подтверждено нами в ходе оценки литической активности отобранных в эксперименте аликвот по отношению к бактериальному тест-штамму.

В то же время, эмиссия бактериофагов из КЭХ в благоприятных для них условиях среды продемонстрировала возможность достижения эффективного терапевтического титра и лизиса бактериального тест-штамма, что свидетельствует о том, что данный носитель вместо применения для транспорта терапевтических агентов в ЖКТ может быть использован в других клинических и биомедицинских точках приложения, где pH среды близка к нейтральным либо слабощелочным значениям.

Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках работ по программе «Приоритет-2030».

### Список литературы

1. Chopra S. et al. Advances and potential applications of chitosan derivatives as mucoadhesive biomaterials in modern drug delivery // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2010. Vol. 58, N 8. P. 1021–1032.
2. Апрятина К.В. Полимерные композиции на основе хитозана медико-биологического назначения. Нижний Новгород: Нижегород. гос. ун-т им. Н.И. Лобачевского, 2018. 24 p.
3. Skorik Y.A. et al. N-(2-Carboxyethyl)chitosans: regioselective synthesis, characterisation and protolytic equilibria // *Carbohydrate Research*. 2003. Vol. 338, N 3. P. 271–276.
4. Sashiwa H. et al. Michael reaction of chitosan with various acryl reagents in water // *Biomacromolecules*. 2003. Vol. 4, N 5. P. 1250–1254.
5. Kogan G. et al. Antioxidant and antimutagenic activity of -(2-carboxyethyl)chitosan // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2004. Vol. 201, N 3. P. 303–310.
6. Bratskaya S. et al. Stimuli-responsive dual cross-linked N-carboxyethylchitosan hydrogels with tunable dissolution rate // *Gels*. 2021. Vol. 7, N 4. # 188.
7. Wei Z. et al. Self-healing polysaccharide-based hydrogels as injectable carriers for neural stem cells // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6, N 1. # 37841.
8. Mou D. et al. Intra-articular injection of chitosan-based supramolecular hydrogel for osteoarthritis treatment // *Tissue Eng. Regen. Med.* 2021. Vol. 18, N 1. P. 113–125.
9. Li Z.W., Zhang L.Y., Zeng Q.X. pH-Sensitivity of N-carboxyethyl chitosan hydrogel and drug controlled release *in vitro* // *MSF*. 2007. Vol. 561–565. P. 1455–1458.
10. Yang S. et al. N-carboxyethyl chitosan fibers prepared as potential use in tissue engineering // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016. Vol. 82. P. 1018–1022.
11. Boroda A. et al. Sponge-like scaffolds for colorectal cancer 3D models: Substrate-driven difference in micro-tumors morphology // *Biomimetics*. 2022. Vol. 7, N 2. # 56.
12. Boroda A. et al. Chitosan versus carboxymethyl chitosan cryogels: Bacterial colonization, human embryonic kidney 293T cell culturing and co-Culturing // *IJMS*. 2022. Vol. 23, N 20. # 12276.
13. Zemlyakova E.O. et al. Preparation and cytotoxicity evaluation of hydrogels based on poly(trimethylene carbonate) and carboxyalkyl chitosans for regenerative medicine applications // *Materials Today: Proceedings*. 2020. Vol. 25. P. 470–473.
14. Pestov A.V., Zhuravlev N.A., Yatluk Yu.G. Synthesis in a gel as a new procedure for preparing carboxyethyl chitosan // *Russ J Appl Chem*. 2007. Vol. 80, N 7. P. 1154–1159.
15. Ma C.B. et al. Investigation of an eco-friendly aerogel as a substrate for the immobilization of MoS<sub>2</sub> nanoflowers for removal of mercury species from aqueous solutions // *Journal of Colloid and Interface Science*. 2018. Vol. 525. P. 251–259.

# ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ХИТОЗАНА, РАСТВОРИМЫЕ В НЕЙТРАЛЬНЫХ СРЕДАХ – СРЕДСТВО ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ И ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА: ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА

**М.Ю. Горшкова<sup>1</sup>, Э.С. Григорян<sup>1</sup>, И.Ф. Волкова<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup> Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук,  
Ленинский пр., дом 29, Москва, 119991, Россия  
E-mail: mgor@ips.ac.ru*

Кватернизованные производные хитозана, обладающие растворимостью в физиологических условиях широко используются для создания различных типов систем доставки лекарственных веществ. Наиболее перспективным среди кватернизованных производных хитозана представляется N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний) пропил] хитозан хлорид (мХТЗ). В отличие от кватернизованных производных хитозана, полученных прямым метилированием аминогрупп, мХТЗ является не только высокозаряженным, но и структурно гомогенным поликатионом, каждое модифицированное звено которого помимо кватернизованной аминогруппы, содержит вторичную аминогруппу, сочетающую биосовместимость, биodeградируемость исходного полисахарида с растворимостью во всем диапазоне рН. Структура и свойства ГТМАХ и закономерности его взаимодействий с синтетическими и нуклеиновыми кислотами были изучены в цикле наших предыдущих работ [1–3]. Были получены комплексы мХТЗ с ДНК и МиРНК и показано, что они обеспечивали большую эффективность трансфекции чем известные системы на основе хитозана [4]. Для повышения эффективности действия таких систем, увеличения стабильности его комплексов с отрицательно заряженными соединениями, проявления рН-чувствительности поликатиона необходимо наличие первичных аминогрупп, которые утрачиваются в ходе синтеза его кватернизованных производных. Таким образом, разработка способа получения растворимых производных хитозана с сохранением первичных аминогрупп является актуальной задачей, для решения которой предложен 2-стадийный метод проведения модификации хитозана, обеспечивающий контролируемое присоединение кватернизованного блока. Структура полученных продуктов изучена методами ИК-Фурье и ЯМР-спектроскопии; растворимость охарактеризована методом турбодиметрии; кислотно-основные свойства определены методом потенциометрии. Показано, что для получения растворимых продуктов необходимо наличие ~ 50 % кватернизованных аминогрупп. Разница в рН-чувствительности модифицированных производных с разным типом присоединения кватернизованного блока выявлена на примере их комплексов с модельным полианионом – ППСNa.

Продемонстрирована возможность получения на основе полученных производных комплексов с ДНК – полиплексов, обладающих стабильностью в условиях приближенным к физиологическим. Показано, что наличие первичных аминогрупп на цепях поликатионов приводит к уменьшению размеров полиплексов.

Результаты работы свидетельствуют о перспективности применения полученных производных хитозана в качестве основного компонента растворимых, физиологически активных, биосовместимых и биodeградируемых комплексов. Полученные данные могут составить основу для разработки систем и доставки лекарственных средств и генетического материала.

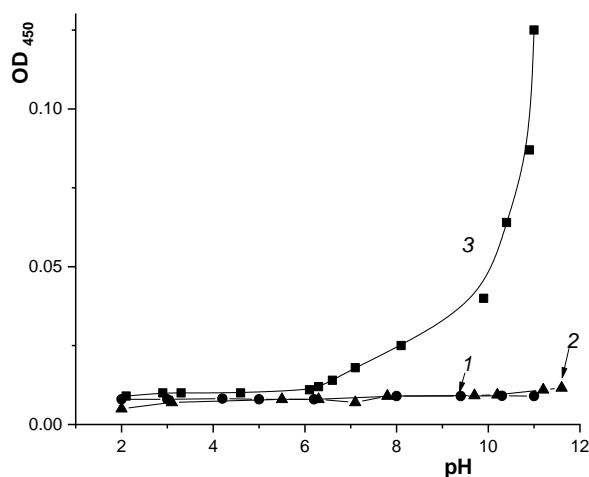


Рис. 1. Определение растворимости модифицированных хитозанов по данным турбидиметрии: оптическая плотность при 450 нм водных растворов образцов мХТЗ в средах с различными значениями pH: 1 – N-мХТЗ; 2 – N, O-мХТЗ; 3 – O-мХТЗ; T 23°C

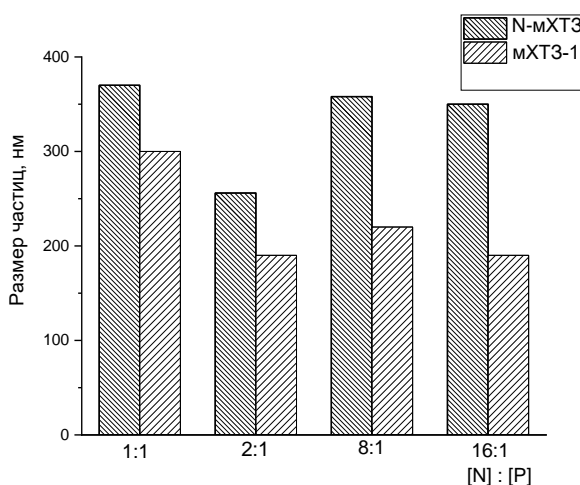


Рис. 2. Размеры частиц полиплексов, полученных при разном соотношении компонентов; фосфатный буфер, pH 7.4, 23°C

Работа выполнена в рамках Госзадания Института нефтехимического синтеза РАН.

Авторы выражают благодарность сотрудникам АО «Институт пластмасс» И.М. Шелониной и С.Г. Алексеевой за выполнение спектральных исследований.

### Список литературы

1. Горшкова М.Ю., Волкова И.Ф., Алексеева С.Г., Молоткова Н.Н., Скорикова Е.Е., Изумрудов В.А. // Высокомолек. соед. Сер.А. 2011. Т. 53, № 1. С. 60.
2. Yevlampieva N.P., Gubarev A.S., Gorshkova M.Yu., Okrugin B.M., Ryumtsev E.I. // J. Polym. Res. 2015. Vol. 22. # 166.
3. Izumrudov V. A., Volkova I.F., Gorshkova M.Yu. // Eur. Polym. J. 2013. Vol. 49. P. 3302–3308.
4. Костина Н.Ю., Горшкова М. Ю., Изумрудов В.А. // Высокомолек. соед. Сер. А. 2011. Т. 53, № 10. С. 1767–1775.
5. Faizuloev E., Marova A., Nikonova A., Volkova I., Gorshkova M., Izumrudov V. // Carbohydr. Polym. 2012. Vol. 89, N 4. P. 1088–1094.

# ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ КОМПОЗИЦИОННЫХ АЭРОГЕЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА АЛЬГИНАТ-ХИТОЗАН В БИМЕДИЦИНЕ

**О.С. Бровко<sup>1</sup>, И.А. Паламарчук<sup>1</sup>, Н.А. Горшкова<sup>1</sup>,  
Н.И. Богданович<sup>2</sup>, А.Д. Ивахнов<sup>1,2</sup>, К.Г. Боголицын<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика  
Н.П. Лаврова РАН, 163000, г. Архангельск,  
пр. Никольский, дом 20, Архангельск, 163020, Россия*

<sup>2</sup> *Северный Арктический федеральный университет им. М.В. Ломоносова,  
наб. Северной Двины, дом 17, Архангельск, 163002, Россия  
E-mail: nat.gorshkova@mail.ru*

Одно из основных направлений научных разработок последнего десятилетия – синтез функциональных материалов биомедицинского назначения с заданными свойствами, структурой и составом. Наибольший интерес в качестве таких материалов представляют органические аэрогели (АГ) – наноструктурные высокопористые материалы, обладающие чрезвычайно низкой плотностью, большой удельной поверхностью и высокой пористостью, что позволяет загружать в матрицу материала биологически активные или лекарственные вещества и использовать их в качестве раневых покрытий или систем доставки лекарств [1–3].

Использование аэрогелей для доставки активных веществ задает определенные требования к материалам: нетоксичность, высокая адсорбционная емкость, а также высокая площадь удельной поверхности, так как от нее зависит как величина максимальной загрузки препарата в матрицу аэрогеля, так и скорость высвобождения активного вещества [4, 5].

В связи с этим целью настоящей работы являлось получение композиционного материала на основе полиэлектролитного комплекса альгинат-хитозан и оценка возможности его использования в биомедицине.

Благодаря линейному строению и наличию ионногенных групп ХТ и АЛ в водных растворах взаимодействуют с формированием полиэлектролитного комплекса (ПЭК) в виде гидрогеля, который служит каркасом будущего аэрогеля [6–8]. При этом, оба ПС характеризуются отсутствием токсичности, биосовместимостью, сродством к тканям живых организмов, способностью к биологическому разложению, благодаря чему активно используются в медицине.

Для создания гидрогеля в работе использовали альгинат натрия с молекулярной массой (ММ) 100 кДа и хитозан (ХТ) с ММ 200 кДа, степенью деацетилирования 0.89 (ООО Биопрогресс, Россия). ПЭК в виде гидрогелей получали смешением водного раствора АЛГ и уксуснокислого раствора ХТЗ с концентрацией 0.25 % при эквимольном соотношении компонентов. Для повышения прочностных характеристик гидрогелей на стадии формирования ПЭК в качестве сшивающего агента вводили микрочастицы CaCO<sub>3</sub> в количестве 10 % от массы ПЭК.

Дальнейшее высушивание геля в среде сверхкритического диоксида углерода после замещения растворителя на органический (ацетон) приводило к получению композиционного аэрогеля, сохраняющего структуру исходного гидрогеля. Медом низкотемпературной адсорбции азота установлено, что полученные образцы характеризуются развитой мезопористой структурой и высокой удельной поверхностью 388-403 м<sup>2</sup>/г.



Для исследования возможности использования полученного материала в биомедицине в качестве системы доставки лекарств и/или раневых покрытий в матрицу материала вводили биологически активное соединение растительного происхождения – атранорин (АТ) – один из наиболее распространенных вторичных лишайниковых метаболитов, обладающий обезболивающим, противовоспалительным и антимикробным действием [9]. АТ выделяли из лишайников вида *Hypogymnia physodes* методом сверхкритической флюидной экстракции.

Введение АТ в матрицу КАГ400 проводили в статических условиях путем погружения материала в спиртовой раствор АТ с последующим выдерживанием в течение 5 ч при 20°C.

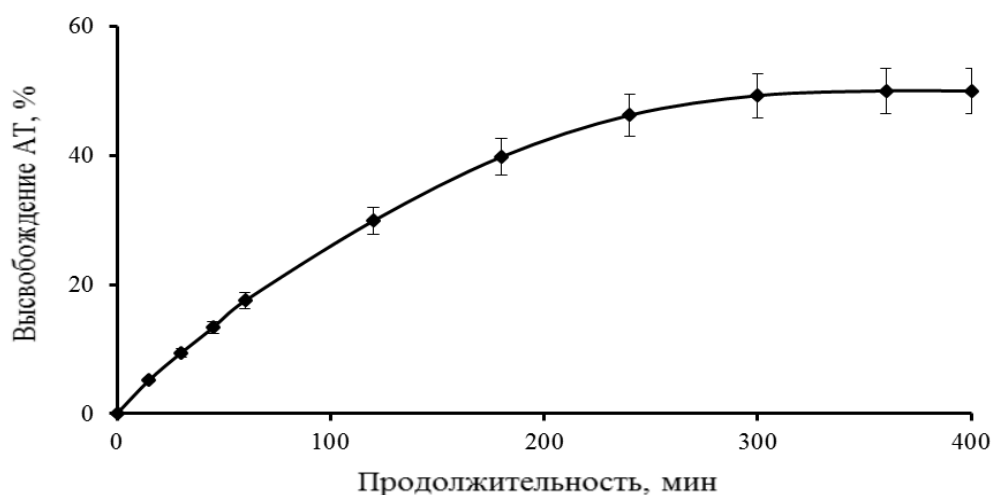


Рис. Высвобождение АТ из аэрогеля

Как показано на рис., высвобождение основного количества АТ из матрицы аэрогелевого материала происходит в течение 4 ч. Максимальное высвобождение АТ составляло 50 % от общего количества АТ, загруженного в матрицу материала, что обусловлено особенностями пористой структуры аэрогеля и высокой способностью к влагопоглощению, которая составляет до 110 г/г.

Совокупность полученных экспериментальных данных позволяет рекомендовать полученные композиционные аэрогели для дальнейшего применения в качестве аппликационного материала, обеспечивающего доставку активного лекарственного вещества, в т.ч. как основы для создания высокоэффективных раневых покрытий,

*Исследования проведены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 23-23-10021).*

### Список литературы

1. Z. Ulker, C. Erkey. An emerging platform for drug delivery: Aerogel based systems // Journal of Controlled Release. 2014. Vol. 177. P. 51–63.
2. S. Wei, Y.C. Ching, C.H. Chuah. Synthesis of chitosan aerogels as promising carriers for drug delivery: A review // Carbohydrate polymers. 2020. Vol. 231. P. 115–124.
3. N. Gorshkova, O. Brovko, I. Palamarchuk, K. Bogolitsyn, A. Ivakhnov, N. Bogdanovich, D. Chukhchin, M. Arkhilin. Formation of supramolecular structure in alginate/chitosan aerogel materials during sol-gel synthesis // J. Sol-Gel Science and Technology. 2020. Vol. 95, N 1. P. 101–108.

4. W. Shi, Y.C. Ching, C.H. Chuah. Preparation of aerogel beads and microspheres based on chitosan and cellulose for drug delivery: A review // International journal of biological macromolecules. 2021. Vol. 170. P. 751–767.
5. M. Alnaief, R.M. Obaidat, M.T.M. Alsmadi. Preparation of hybrid alginate-chitosan aerogel as potential carriers for pulmonary drug delivery // Polymers. 2020. Vol. 12, N 10. # 2223.
6. O.S. Brovko, I.A. Palamarchuk, T.A. Boitsova, K.G. Bogolitsyn, N.A. Valchuk, D.G. Chukhchin. Influence of the conformation of biopolyelectrolytes on the morphological structure of their interpolymer complexes // Macromolecular Research. 2015. Vol. 23. P. 1059–1067.
7. N.A. Valchuk, O.S. Brovko, I.A. Palamarchuk, T.A. Boitsova, K.G. Bogolitsyn, A.D. Ivakhnov, D.G. Chukhchin, N.I. Bogdanovich Preparation of aerogel materials based on alginate-chitosan interpolymer complex using supercritical fluids // Russian journal of Physical Chemistry B. 2019. Vol. 13, N 7. P. 1–4.
8. N.A. Gorshkova, O.S. Brovko, I.A. Palamarchuk, K.G. Bogolitsyn. Influence of the structure of alginate-chitosan materials on the kinetics of usnic acid release // Applied Biochemistry and Microbiology. 2022. Vol. 58, N 2. P. 110–117.
9. E. Studzinska-Sroka, A. Galanty, W. Bylka, Atranorin-an interesting lichen secondary metabolite // Mini reviews in medicinal chemistry. 2017. Vol. 17. P. 1633–1645.

## **ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ХИТОЗАН–АЛЬГИНАТ КАК НОСИТЕЛЬ ДЛЯ ТЕТРАФЕНИЛПОРФИРИНОВ В СИСТЕМАХ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ РАН**

**Н.А. Аксенова<sup>1,2</sup>, А.С. Копылов<sup>1,3</sup>, И.В. Шершнева<sup>1</sup>, В.А. Тимофеева<sup>1</sup>,  
М.А. Савко<sup>1</sup>, Т.С. Зархина<sup>1</sup>, А.Б. Соловьева<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова  
Российской академии наук, ул. Косыгина, дом 4, Москва, 119991, Россия*

<sup>2</sup> *Институт регенеративной медицины, Первый Московский государственный медицинский  
университет им. И.М. Сеченова, Большая Пироговская ул., дом 2, стр. 4,  
Москва, 119435, Россия*

<sup>3</sup> *Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Российский  
технологический университет, пр. Вернадского, дом 86, Москва, 119571, Россия  
E-mail: naksenova@mail.ru*

Создание гетерогенных фотосенсибилизирующих систем медицинского назначения (для использования, в частности, при лечении ран методом антибактериальной фотодинамической терапии, АФДТ) требует использования биосовместимых, бактерицидных и нетоксичных носителей. [1, 2]. Таким требованиям отвечают природные полисахариды – хитозан (ХТ) и альгинат натрия (АН). В частности, хитозан хорошо зарекомендовал себя в качестве бактерицидного полимерного носителя для фотосенсибилизаторов (ФС) при АФДТ как в условиях *in vitro* при инактивации *E.coli* [3], так и в условиях *in vivo* при лечении инфицированных ран [4]. Альгинат натрия благодаря своим ранозаживляющим и кровеостанавливающим свойствам используется в клинической практике, поскольку его применение в лечении повреждений кожи и тканей ускоряет реабилитацию пациентов [5].

Интерес к полисахаридам обусловлен еще и тем, что раневые покрытия на их основе могут удалять избыток экссудата, при этом сохраняя раневую поверхность влажной, обеспечивать газообмен, предотвращать механическую травму тканей, а также обеспечивать возможность бесконтактного визуального контроля за раной [6].

В данной работе изучены фотокаталитическая активность (в модельной реакции фотоокисления триптофана в воде) и фотосенсибилизирующие свойства в генерации синглетного  $^1\text{O}_2$  кислорода гидрофобного фторированного тетрафенилпорфирина, иммобилизованного на водонерастворимом полиэлектролитном комплексе (ПЭК) на основе природных полисахаридов – хитозана и альгината натрия – для возможного использования в антимикробной фотодинамической терапии. Особенность ПЭК как носителя заключается в сочетании свойств исходных полиэлектролитов и новых свойств, которые появляются в результате их комплексообразования [6, 7]. В частности, в [7] показано, что антимикробные свойства сформированных ПЭК (пленок) усиливаются по сравнению с антимикробными свойствами индивидуальных полисахаридов. Такой эффект, как предположили авторы [7, 8], может быть связан с понижением адгезии бактериальных клеток к полимерным пленкам на основе комплексов хитозан-альгинат. Таким образом, комплексообразование полимеров может быть одним из эффективных методов формирования и управления свойствами носителей на основе ПЭК, используемых для иммобилизации ФС.

В работе иммобилизацией фторированного тетрафенилпорфирина (ФТФП) из раствора в ацетоне на пленки полиэлектролитных комплексов (ПЭК) на основе ХТ и АН, а также на твердые водонерастворимые гели альгината и хитозана получены водонерастворимые фотосенсибилизирующие (ФС) системы, активные в генерации синглетного  $^1\text{O}_2$  кислорода. В присутствии полученных полимерных ФС-систем установлена интенсивность фотолюминесценции синглетного кислорода в  $\text{D}_2\text{O}$ , а также активность в процессах фотокаталитического окисления триптофана в воде.

Показано, что фотокаталитическая активность в реакции окисления триптофана фторированного тетрафенилпорфирина, иммобилизованного на полиэлектролитном комплексе ХТ–АН и твердом геле альгината, выше, чем активность ФТФП, иммобилизованного на твердом геле хитозана. Для выяснения механизма повышения активности порфирина при его закреплении на альгинат-содержащих носителях были изучены спектрально-люминесцентные свойства систем полисахарид – ФТФП и структура поверхности носителей методом атомно-силовой микроскопии. Высказано предположение, что причиной повышения фотокаталитической активности ФТФП при иммобилизации на альгинат-содержащие полисахаридные системы являются особенности надмолекулярной структуры твердых гелей.

*Работа выполнена в рамках Госзадания, тема № 122040400099-5.*

### Список литературы

1. D.K. Deda, B.A. Iglesias, E. Alves et al. Porphyrin derivative Nanoformulations for therapy and antiparasitic agents // *Molecules* 2020. Vol. 25. # 2080.
2. A.B. Solov'eva, N.A. Aksenova, N.N. Glagolev et al. Amphiphilic polymers in photodynamic therapy // *Russ. J. Phys. Chem. B.* 2012. Vol. 6. P. 433.
3. K.A.D.F. Castro, N.M.M. Moura, F. Figueira et al. New materials based on cationic porphyrins conjugated to chitosan or titanium dioxide: Synthesis, characterization and antimicrobial efficacy // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20. # 2522.

4. A.B. Solovieva, T.G. Rudenko, N.N. Glagolev et al. Broad-spectrum antibacterial and pro-regenerative effects of photoactivated Photodithazine-Pluronic F127-Chitosan polymer system: in vivo study // J. Photochem. Photobiol. B. 2020. Vol. 210. # 111954.
5. S. Hampton. The role of alginate dressings in wound healing. // The Diabetic Foot. 2004. Vol. 7. # 162.
6. О.С. Бровко, И.А. Паламарчук, Н.А. Вальчук и др. Перспективы получения новых пленочных материалов биомедицинского назначения на основе интерполимерного комплекса альгинат-хитозан // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. №3(2). С. 45–49.
7. D. Kulig, A. Zimoch-Korzycka, Z. Król et al. Effect of film-forming alginate/chitosan polyelectrolyte complex on the storage quality of pork // Molecules. 2017. Vol. 22. # 98.
8. M. Zare-Gachi, H. Daemi, J. Mohammadi et al. Improving anti-hemolytic, antibacterial and wound healing properties of alginate fibrous wound dressings by exchanging counter-cation for infected full-thickness skin wounds // Mater. Sci. Eng. C. 2020. Vol. 107. # 110321.

## **ФОРМИРОВАНИЕ ГИДРОГЕЛЕЙ ХИТОЗАНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АЦЕТАЛЕЙ ГЛИЦИДОЛА КАК СШИВАЮЩИХ РЕАГЕНТОВ**

**Д.А. Казанцев<sup>1</sup>, С.Л. Хацко<sup>2</sup>, Д.В. Нестеров<sup>1</sup>, А.В. Пестов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН,  
ул. Софьи Ковалевской, дом 22, Екатеринбург, 620108, Россия*

<sup>2</sup> *Институт естественных наук и математики УрФУ,  
ул. Куйбышева, дом. 48, Екатеринбург, 620026, Россия*

*E-mail: daniil\_kazantsev@mail.ru*

В настоящее время востребованность мукоадгезивных систем доставки лекарств возросла благодаря их способности улучшать всасывание лекарств за счет прикрепления к поверхности слизистых оболочек организма. По сравнению с другими лекарственными формами, мукоадгезивные системы обладают рядом преимуществ, такими как: точная доставка лекарственного средства и возможность постепенного длительного высвобождения действующего вещества, что повышает эффективность применения препарата и удобство его использования. Вместе с этим мукоадгезивные системы способны повышать биодоступность фармакологических субстанций с малой липофильностью, что значительно расширяет возможность использования лекарственных средств в терапевтической практике.

Идеальным кандидатом в качестве основы для создания мукоадгезивных систем является хитозан. Биосовместимость и наличие первичной аминогруппы в составе мономерного звена позволяет хитозану хорошо закрепляться на слизистых оболочках тканей организма без реакций отторжения, а большая распространенность в живой природе исходного полимера – хитина – делает этот материал доступным для использования. На настоящий момент времени известны различные мукоадгезивные системы доставки лекарств на основе хитозана и его производных. Цефтазидин, инкапсулированный в систему хитозан – триполифосфат – гиалуроновая кислота используется для лечения инфекций глаз [1]. Модифицированный метилакрилатом хитозан может быть применен для селективной доставки противораковых средств в мочевиной пузырь [2]. Система на основе поликарбофила и хитозана используется для селективной доставки пептидов в желудочно-кишечный тракт [3].

Актуальным направлением развития отрасли мукоадгезивных средств доставки лекарств является разработка pH-чувствительных матриц. Подобные материалы имеют особую значимость в настоящее время в связи с увеличением распространенности заболеваний желудка. Матрицы на основе хитозана и ацеталей глицидола обладают необходимой функциональностью для осуществления процесса пролонгированного высвобождения лекарственного средства в желудке, благодаря возможности разрушения ацетального фрагмента в кислых условиях среды (схема 1) и хорошей возможности прикрепления к тканям. Низкая цитотоксичность подобных систем уже была продемонстрирована ранее в испытаниях с использованием клеток колоректального рака человека [4].

В рамках настоящего исследования разработаны методы получения ацеталей глицидола с целью оценки возможности использования их для сшивки хитозана и получения гидрогелевых материалов на его основе.

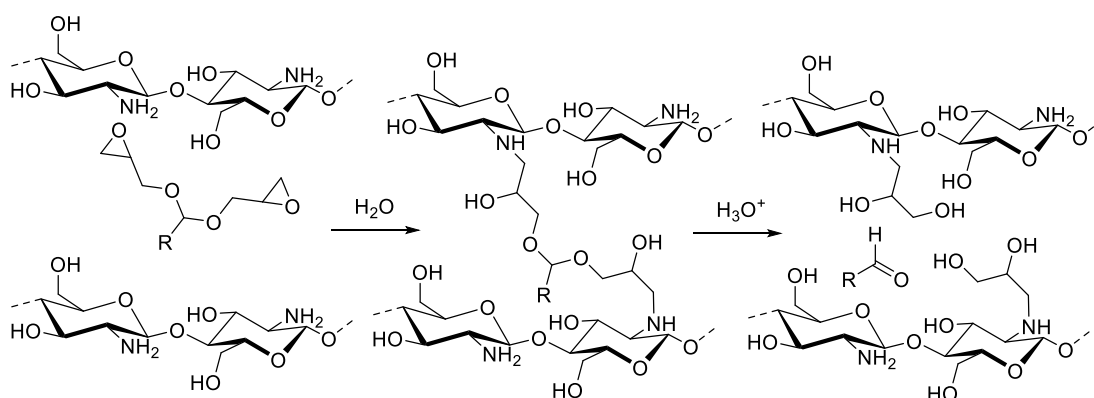


Схема 1. Сшивки хитозана ацеталем глицидола и разрушение линкера

Ацетали глицидола были синтезированы двухстадийным методом (схема 2). На первом этапе были получены ацетали аллилового спирта: бис(аллилокси)метан, 1,1-бис(аллилокси)этан и 1,1,3-аллилоксипропан из параформа, паральдегида и акролеина, соответственно. Конверсию ацеталей аллилового спирта в эфиры глицидола удалось осуществить с хорошим выходом в условиях реакции эпексидирования Пайена. Состав и строение полученных соединений охарактеризованы методами ЯМР  $^1\text{H}$  спектроскопии, ИК-спектроскопии и элементного анализа.

Получение гидрогелей при мольном соотношении хитозан : ацеталь = 5 : 1 осуществляли при  $70^\circ\text{C}$  в течение 12 ч. Для очистки материал промывали дистиллированной водой в течение 24 ч при комнатной температуре. Степень модификации сшивающими реагентами и строение полученных матриц охарактеризованы методами элементного анализа, ИК-спектроскопии и термогравиметрии. Как следует из полученных данных, степень модификации составила 20 % в случае каждого реагента. Для высушенных образцов определили степень набухания в воде (табл. 1).

Оценка общей токсичности полученных материалов производилась на белых мышах. В эксперименте использовали 15 белых беспородных мышей разного пола возрастом 6–7 мес., которые были случайным образом разделены на 3 группы по 5 особей: контрольная группа, гидрогель хитозана, сшитого бис(глицидилокси)метаном, гидрогель хитозана, сшитого 1,1,3-триглицидоксипропаном. Животных содержали при стандартных условиях вивария, со свободным доступом к еде и воде. Гидрогели вводили мышам перорально в виде кормовых гранул с массовой

долей сшитого полимера 3 % в течение 14 дней. На протяжении всего периода фиксировали изменение в поведении, оценивали общее состояние (шерсть, кожа и др.), потребление кормов. Контрольные взвешивания проводили в начале (0 сутки) и в конце (15 сутки) исследования.

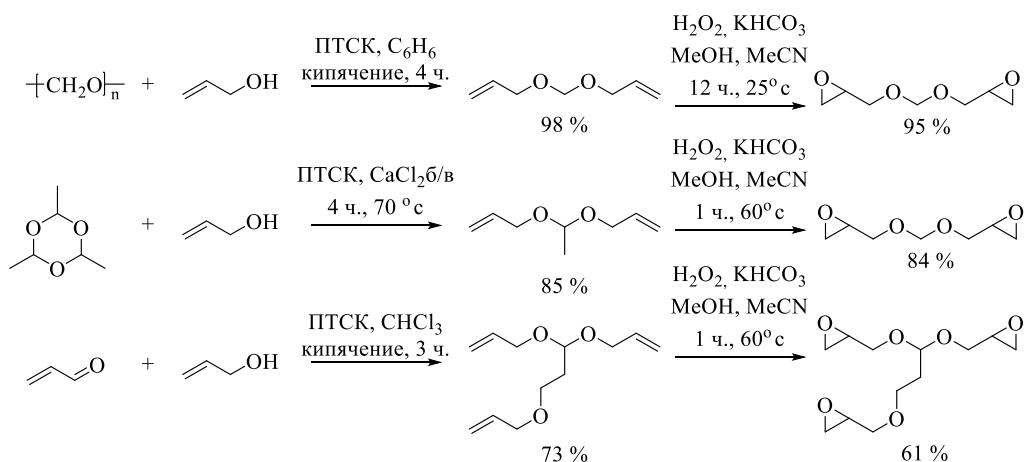


Схема 2. Получение ацеталей глицидола

Таблица 1

**Степень набухания модифицированного хитозана в воде**

Сшивающий агент	Степень набухания, %
Бис(глицидилокси)метан	1000
1,1-Бис(глицидилокси)этан	900
1,1,3-Триглицидилоксипропан	1400

В ходе проведённого исследования на протяжении 14 дней не выявлено существенного изменения группового поведения, внешние признаки тревоги отсутствовали, состояние шерсти и кожных покровов оставалось в норме во всех группах. Наблюдалось повышение потребления корма и значительное увеличение массы тела в группах (Рисунок 1), получающих корм с добавкой гидрогелей на основе хитозана, сшитого бис(глицидилокси)метаном и 1,1,3-триглицидилоксипропаном.

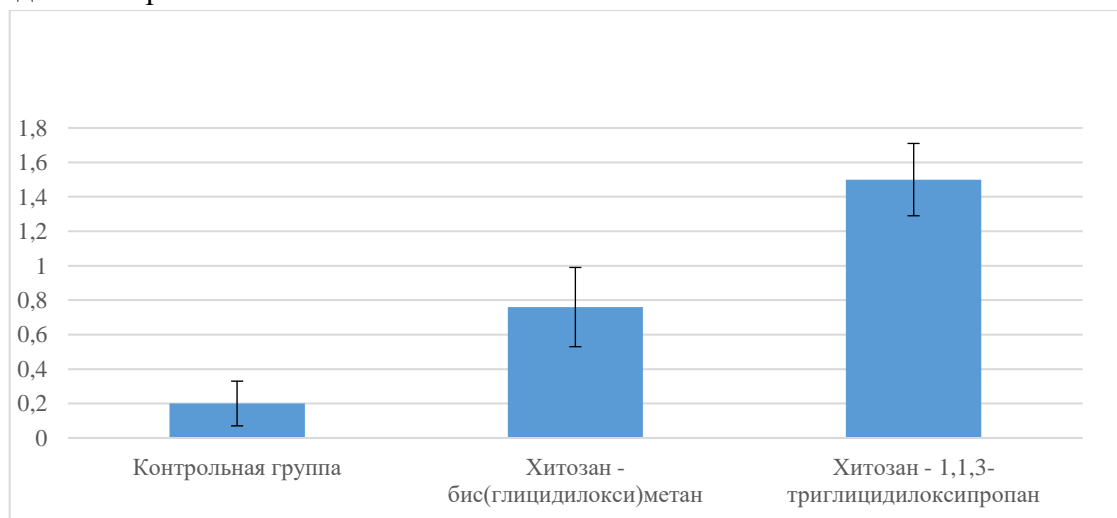


Рис. 1. Прирост значения средней массы белых мышей, %

Таким образом, в рамках настоящей работы были разработаны методы синтеза ряда новых гидрогелевых материалов на основе хитозана и ацеталей глицидола. Полученные материалы показали низкую токсичность в испытаниях на белых мышах и в будущем могут послужить основой для создания новых мукоадгезивных средств доставки лекарств.

### Список литературы

1. Mariana M.S., Raquel C., Joana M., Ana B., António J.A., Lídia M.D.G. Chitosan nanoparticles as a mucoadhesive drug delivery system for ocular administration // *Marine Drugs*. 2017. Vol. 15. P. 370–386.
2. Oluwadamilola M. K., Wing M. L., Vitaliy V. K. Methacrylated chitosan as a polymer with enhanced mucoadhesive properties for transmucosal drug delivery // *Int. J. Pharm.* 2018. Vol. 550, N 1–2. P. 123–129.
3. Luessen H. L., Rentel C.-O., Kotze A. F., Lehr C.-M., de Boer A. G., Verhoef J. C., Junginger H. E. Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery. IV. Polycarbophil and chitosan are potent enhancers of peptide transport across intestinal mucosae in vitro // *Journal of Controlled Release*. 1996. Vol. 45, N 1. P. 15–23.
4. Privar Y., Boroda A., Pestov A., Kazantsev D., Malyshev D., Skatova A., Bratskaya S. Chitosan cryogels cross-linked with 1,1,3-triglycidylxypropane: Mechanical properties and cytotoxicity for cancer cell 3D cultures // *Biomimetics*. 2023. Vol. 8, N 2. # 228.

## ГИДРОГЕЛЕВЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ КАРБОКСИАЛКИЛХИТОЗАНОВ В ЛЕЧЕНИИ ОСТЕОАРТРИТА

**Е.А. Веретенникова<sup>1</sup>, А.В. Пестов<sup>1</sup>, Е.О. Землякова<sup>1</sup>, Н.А. Друкаренко<sup>2</sup>, И.С. Каманцев<sup>2</sup>,  
А.В. Кузнецов<sup>2</sup>, А.В. Жиликов<sup>3</sup>, С.А. Чернядьев<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Институт органического синтеза УрО РАН, ул. Софьи Ковалевской, дом 22,  
Екатеринбург, 620108, Россия*

<sup>2</sup> *Институт машиноведения УрО РАН, ул. Комсомольская, дом 34,  
Екатеринбург, 620219, Россия*

<sup>3</sup> *Уральский государственный медицинский университет,  
ул. Репина, дом 3, Екатеринбург, 620028, Россия  
E-mail: lizaveret@yandex.ru*

Остеоартрит – это дегенеративное заболевание, вызывающее повреждение хрящей и окружающих их тканей. Одним из методов лечения данного заболевания является внутрисуставное введение гидрогелевого материала, увеличивающего стабильность и мобильность суставов человека.

Данная работа посвящена разработке методов получения гидрогелевых материалов на основе карбоксиалкилхитозанов для устранения проблем подвижности и нестабильности суставов, которые возникают при остеоартрите. Для получения гидрогелей использовали следующие биodeградируемые полимеры: гиалурионовая кислота, как основной коммерческий препарат, применяемый для лечения остеоартрита, N,O-карбоксиметилхитозан со степенью функционализации 1, N-карбоксиитилхитозан со степенью функционализации 0.5 и 1, N-(1,2-

дикарбоксиэтил)хитозан – со степенью функционализации 0.35 и 0.5. Получение гидрогелевых материалов осуществляли приготовлением гомогенного геля из полимеров с последующим сшиванием диглицидиловым эфиром бутандиола или в случае N-карбоксиэтилхитозана-1 – без сшивающего агента. Полученные гели высушивали в виде цилиндров при 25°C и 70°C.

Для оценки несущей способности полимеров проводили сжатие гидрогелевых материалов на универсальной испытательной машине Zwick Z2.5. Гидрогелевый материал на основе N,O-карбоксиметилхитозана получается хрупким и разрушается при сжатии. При добавлении гиалуроновой кислоты удалось повысить упругость гидрогеля до максимальной нагрузки 242 Н (Таблица 1). Гидрогели на основе N-(1,2-дикарбоксиэтил)хитозана со степенью функционализации 0.35 и 0.5 также разрушаются при нагрузке. Можно предположить, что хрупкость гидрогелевых материалов на основе N,O-карбоксиметилхитозана и N-(1,2-дикарбоксиэтил)хитозана объясняется большим количеством близко расположенных карбоксильных групп, которые формируют плотную сетку ионных связей с аминогруппами, тем самым образуя напряженное состояние.

Гидрогелевые материалы на основе N-карбоксиэтилхитозана обладают большей пластичностью в отличие от вышеописанных материалов. На основе N-карбоксиэтилхитозана-0.5 в смеси с гиалуроновой кислотой, сшитого диглицидиловым эфиром бутандиола получили упругий материал с максимальной выдерживаемой нагрузкой в 341–350 Н (Таблица 1). При использовании N-карбоксиэтилхитозана-0.5 без гиалуроновой кислоты несущая способность гидрогеля значительно падает.

Таблица 1

**Механические свойства гидрогелевых материалов  
на основе карбоксиалкилхитозанов и гиалуроновой кислоты**

Карбоксиалкилхитозан	Мольное соотношение карбоксиалкилхитозан : гиалуроновая кислота	Степень набухания, %	Максимальная нагрузка, Н
N,O-карбоксиметилхитозан-1	1.0 : 0	113	84 (разрушился)
	5.0 : 1.0	86	242
N-(1,2-дикарбоксиэтил)хитозан	1.0 : 0	-	нет данных (разрушился)
N-карбоксиэтилхитозан-0.5	1.0 : 0	-	185
	2.5 : 1.0	43	350
	1.3 : 1.0	58	341
N-карбоксиэтилхитозан-1	1.0 : 0	29	500
Не использовался	0 : 1.0	138	68



Гидрогелевый материал на основе N-карбоксииэтилхитозана со степенью функционализации 1 (Таблица 1) без добавления гиалуроновой кислоты показал наилучшие результаты в опытах по сжатию, обладая наибольшей упругостью и прочностью. Максимальная нагрузка составила 500 Н. Если гидрогелевые материалы формируются только из индивидуальных N,O-карбоксиметилхитозана-1 и N-(1,2-дикарбоксииэтил)хитозана, то они не обладают нужными механическими свойствами. Добавление гиалуроновой кислоты повышает упругость гидрогеля на основе N,O-карбоксиметилхитозана-1 и N-карбоксииэтилхитозана-0.5.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ЗАМОРОЗКИ ПОЛИМЕРНЫХ РАСТВОРОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОПОРИСТЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

К.Ю. Базылева<sup>1,2</sup>, Н.А. Шарикова<sup>2</sup>, Д.А. Волков<sup>2</sup>, С.Н. Малахов<sup>2</sup>, Т.Е. Григорьев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, Ленинские горы, дом 1, стр. 2, Москва, 119234, Россия*

<sup>2</sup> *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», площадь Академика Курчатова, дом 1, Москва, 123098, Россия  
E-mail: bazyleva.ki18@physics.msu.ru*

Высокопористые трехмерные полимерные каркасы находят широкое применение в различных областях биомедицины. Такие материалы обладают рядом отличительных преимуществ для использования в тканевой инженерии. Благодаря своей организации и морфологии пор они обеспечивают регуляцию функций клеток, высокопроизводительную доставку питательных веществ и удаление клеточных отходов. Кроме того, при разработке искусственных тканей архитектура пор каркаса должна имитировать структуру и свойства нативного матрикса [1].

Хитозан демонстрирует широкий спектр применений в качестве биоматериала из-за его хорошего поведения в организме человека, так как этот биополимер проявляет антимикробную активность, биоактивность, хемотактическое действие, иммуностимуляцию, ферментативную биоразлагаемость, слизистую адгезию или эпителиальную проницаемость, благоприятствуя его адгезии с различными типами клеток. Благодаря этому отличному поведению хитозан может быть использован при лечении ран, ожогов и язв из-за его гемостатических характеристик и ускоряющего эффекта заживления ран. С другой стороны, хитозан находит применение также при регенерации и восстановлении тканей из-за его биоразлагаемости и клеточного сродства. Материалы на основе хитозана можно использовать для замещения хрящевых мембран, нервов, костной и трахеальной тканей [3]. Для каждого из применений требуется тонкая настройка условий приготовления для получения нужной архитектуры каркаса.

Одним из распространенных методов получения высокопористых материалов является лиофилизация. Этот метод позволяет получать материалы с высокой удельной поверхностью и различной архитектурой пор. Процесс лиофилизации состоит из двух этапов: замораживание полимерного раствора и последующая сублимационная сушка. Меняя скорость охлаждения

на первом этапе, можно управлять зародышеобразованием и кинетикой роста кристаллов льда, что отражается на конечной структуре пор в материале [4, 5]. Хотя существует качественное понимание физических основ метода, многие детали происходящих в нем процессов изучены не полностью.

Целью данной работы является исследование процесса заморозки полимерных растворов на основе хитозана для получения высокопористых материалов для конкретного применения.

Для исследования кинетики заморозки полимерных растворов использовали 2% раствор хитозана, в 2 % водном растворе уксусной кислоты. В исследовании также использовались растворы хитозана с добавлением технической углерода (ТУ, Vulcan XC 72R), как модельная система, в следующих весовых концентрациях (от массы полимера): 1, 10 мас. %. Далее приготовленные растворы замораживали на разработанной установке с использованием элементов Пельтье. Затем образцы лиофилизировали в сушилке Martin Christ Alpha 2-4LSC в течение 72 ч при глубине вакуума 0,250 мбар для исследования полученной морфологии материалов с применением сканирующей электронной микроскопии на приборе Phenom XL (ThermoFisher Scientific, США). В процессе замораживания образцов зависимость температуры от времени фиксировали с помощью сенсора Termodat-1,3М на разных высотах колбы с полимерным раствором.

В результате работы была разработана и изготовлена замораживающая установка на основе элементов Пельтье. С помощью нее были получены полимерные высокопористые материалы на основе хитозана. Также исследована кинетика заморозки полимерного раствора и влияние условий охлаждения на морфологию получаемых образцов.

*Работа выполнена при поддержке государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».*

### **Список литературы**

1. Sharikova N. A. et al. Chitosan-based porous composites for bone tissue engineering // Macromolecular Symposia. 2022. Vol. 404, N 1. # 2100398.
2. Hosseinkhani M. et al. Tissue engineered scaffolds in regenerative medicine // World Journal of Plastic Surgery. 2014. Vol. 3, N 1. P. 3.
3. Jiménez-Gómez C. P., Cecilia J. A. Chitosan: a natural biopolymer with a wide and varied range of applications // Molecules. 2020. Vol. 25, N 17. # 3981.
4. Pawelec K. M. et al. Understanding anisotropy and architecture in ice-templated biopolymer scaffolds // Materials Science and Engineering: C. 2014. Vol. 37. P. 141–147.
5. Stolze C. et al. Investigation of ice-templated porous electrodes for application in organic batteries // ACS applied materials & interfaces. 2016. Vol. 8, N 36. P. 23614–23623.

# ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ НАНОРАЗМЕРНЫЕ ЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ПЕКТИНА И ХИТОЗАНА ДЛЯ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

**Ф.О. Трухин<sup>1</sup>, Р.А. Шатилов<sup>1</sup>, А.А. Патлай<sup>1</sup>, А.С. Белоусов<sup>1</sup>,  
М.Е. Шмелёв<sup>1</sup>, В.В. Кумейко<sup>1,2</sup>, В.Е. Силантьев<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> *Дальневосточный федеральный университет, Институт наук о жизни и биомедицины  
(школы), Посёлок Аякс, дом 10, Владивосток, 690022, Россия*

<sup>2</sup> *Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,  
улица Пальчевского, дом 17, Владивосток, 690041, Россия*

<sup>3</sup> *Институт химии Дальневосточного отделения Российской академии наук,  
проспект 100-летия Владивостока, дом 159, Владивосток, 690022, Россия  
E-mail: fedortruhin2940@gmail.com, vladimir.silantyev@gmail.com*

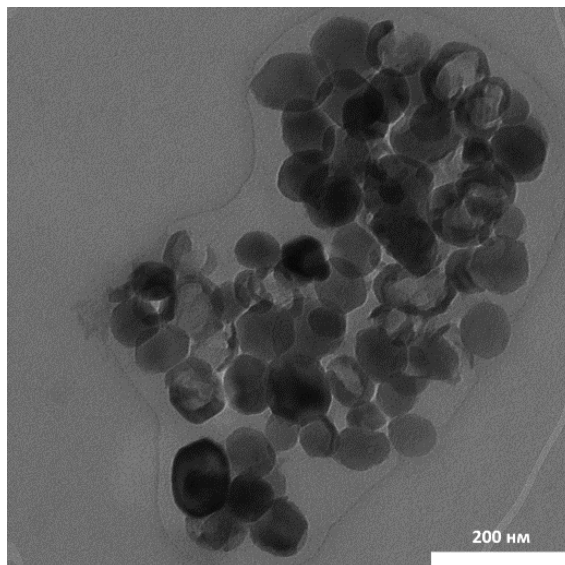
Методы лечения опухолей головного мозга, в частности глиом, – химио- и радиотерапия, имеют много побочных эффектов. К ним относится токсичность в отношении здоровых клеток, которая проявляется в уменьшении размеров эритроцитов и тератогенез. Потенциально эти эффекты могут быть сведены к минимуму при проведении таргетирования лекарств непосредственно к опухолевым клеткам. Эта методика предполагает либо переход лекарств из гидрогелей при покрытии после хирургической резекции опухоли и имплантации пораженного участка, либо использование наночастиц в качестве носителей лекарств через кровотоки. Во втором случае доставщики должны преодолевать фильтр, находящийся между кровью и клетками мозга – гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). ГЭБ способны проходить наночастицы с размерами до 200 нм и положительным поверхностным зарядом [1].

Наночастицы на основе углеводов потенциально могут быть использованы в качестве доставщиков лекарственных средств. Полисахариды содержатся в больших количествах во внеклеточном матриксе мозга (ВКМ). Их аналоги как животного, так и растительного происхождения биосовместимы, биоразлагаемы и нетоксичны. Материалы на основе полисахаридов лучше усваиваются опухолевыми клетками из-за их повышенной экспрессии белка CD-44, относительно здоровых клеток. Это белок помогает осуществлять фагоцитоз. Поверхность наночастиц может быть модифицирована специфичными антителами для улучшения усвояемости именно клетками опухолей и распознавания иммунной системой не в качестве антигена [1].

Противоположно заряженные полиэлектролиты хитозан и пектин были использованы в данной работе. Пектин является анионным полисахаридом, состоящим из звеньев галактоуроновой кислоты и содержащим карбоксильные группы. Он проявляет противоопухолевый эффект и имеет структуру, сходную с компонентом ВКМ гиалууроновой кислотой, к которой специфичен белок CD-44. Хитозан является катионным полисахаридом, состоящим из  $\beta$ -(1-4) D-глюкозаминовых звеньев и содержащий аминокислотные группы. Он придает наночастице положительный заряд и предотвращает коагуляцию. Они являются нетоксичными, биосовместимыми и биоразлагаемыми полимерами [2].

Целью работы являлась разработка полисахаридных наноразмерных комплексов с поверхностной модификацией, которая позволит преодолеть ГЭБ, для таргета лекарств против опухолей головного мозга. Наночастицы были сформированы методом ионного гелирования.

Стабильность частиц была достигнута обработкой ультразвуком, отмывкой и фильтрацией, без использования ПАВ. Структура и морфология наночастиц была охарактеризована при помощи просвечивающей электронной (рис.) и атомно-силовой микроскопии.



*Рис. ПЭМ изображение наночастиц на основе пектина и хитозана*

Было установлено, что наночастицы имеют как эллипсоидную, так и сферическую форму. Их размер варьировался в диапазоне от 30 до 300 нм. Сферические наночастицы большего размера формировались при повышении концентрации хитозана. С увеличением пектина наблюдалось образование агрегатов. Дзета-потенциал полученных наночастиц варьировался в диапазоне от -39 до 74 мВ. Взаимодействие функциональных заряженных групп полиэлектролитов было охарактеризовано с помощью инфракрасной спектроскопии. Наблюдалось смещение пиков, соответствующих карбоксильным и аминогруппам, в область низкочастотных колебаний. По ним, предположительно, происходило взаимодействие между полисахаридами.

Эффективности инкапсуляции и выхода метиленового синего были исследованы УФ-спектрофотометрией, аналогично работе [3]. В суспензии наночастиц добавляли растворы метиленового синего. Выход был измерен в буфере с рН 6,86, близком к нейтральным значениям, а также рН 7,4, 7,3 и 7,2, соответствующих крови, здоровому ликвору и ликвору при глиомах. Эффективность инкапсуляции метиленового синего составляла 89–96 %, а эффективность выхода – 23–83 %. Оба параметра зависели от соотношения биополимеров. Была проведена поверхностная модификация наночастиц модельным комплексом БСА-FITC. Результаты были подтверждены конфокальной микроскопией по интенсивности флуоресцентной метки. Эффективность поверхностной пришивки увеличивалась при повышении концентрации пектина. Методом МТТ-теста была исследована цитотоксичность на опухолевых клетках линии U87-MG. Большинство наночастиц без загрузки лекарством не оказывали влияния на метаболическую активность линии. Частицы с повышенным содержанием пектина снижали митохондриальную активность опухолевых клеток в 1,5 раза [2].

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (соглашение № 22-73-10172 от 29.07.2022 г.).*

### Список литературы

1. Silant'ev V.E. How to Develop Drug Delivery System Based on Carbohydrate Nanoparticles Targeted to Brain Tumors / Silant'ev V.E., Shmelev M.E., Belousov A.S. et.al. // *Polymers*. 2023. P. 1–7.
2. Ahmed O., Abdel-Halim M., Farid A., Elamir A. Taurine loaded chitosan-pectin nanoparticle shows curative effect against acetic acid-induced colitis in rats // *Chemico-Biological Interactions*. 2022. P. 8–10.
3. Cisco C.T., Valente A.J.M., Paulino A.T. Methylene blue release from chitosan pectin and chitosan DNA blend hydrogels // *Pharmaceutics*. 2021. P. 2–6.