

Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»
(ФИЦ Биотехнологии РАН)

На правах рукописи



Хайрова Аделя Шамилевна

**ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ И ФИЗИКО-
ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ХИТИНА, ХИТОЗАНА И ИХ
МЕЛАНИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ИЗ МУХИ *HERMETIA ILLUCENS*
НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ОНТОГЕНЕЗА НАСЕКОМОГО**

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.х.н. Лопатин Сергей Александрович

Москва – 2022

Оглавление

Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	11
1.1. Хитин и хитозан: свойства, источники, области применения.....	11
1.2. Способы получения хитина	13
1.3. Меланины.....	16
1.4. Получение хитина, хитозана и их меланиновых комплексов из насекомых.....	18
1.4.1. Пчела <i>Apis mellifera</i>	18
1.4.2. Тутовый шелкопряд <i>Bombyx mori</i>	21
1.4.3. Муха черная львинка <i>Hermetia illucens</i>	22
1.4.4. Шмель <i>Bombus terrestris</i>	29
1.4.5. Цикада <i>Neotibicen linnei</i>	29
1.4.6. Пятиустка <i>Leiperia cincinnalis</i>	30
1.4.7. Зофобас <i>Zophobas morio</i>	30
1.4.8. Шершень <i>Vespa crabro</i>	31
1.4.9. Жук <i>Holotrichia parallela</i>	32
1.4.10. Колорадский жук <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	32
1.4.11. Таракан <i>Periplaneta americana</i>	33
Глава 2. Экспериментальная часть	35
2.1. Объекты исследований, исходные материалы и химические реагенты	35
2.2 Лабораторное оборудование	36
2.3. Методы исследования	37
2.3.1. Технологические стадии	37
2.3.2.1. Физико-химические методы	42
2.3.2.2. Изучение физико-химических и биологических свойств полученных веществ	47
2.3.2.3. Получение и исследование кремов с хитозан-меланиновым комплексом.....	51
Глава 3. Результаты и обсуждение	54
3.1. Получение и исследование хитина и хитозана из личинок <i>H. illucens</i>	54
3.1.1. Получение аморфного хитина и низкомолекулярного хитозана	54
3.1.2. Получение кристаллического хитина и высокомолекулярного хитозана	60
3.1.3. Кислотный гидролиз	62
3.1.4. Ферментативный гидролиз.....	63
3.1.5. Исследование антибактериальной и противогрибной активностей	66

3.2. Получение и исследование хитин- и хитозан-меланиновых комплексов из кутикулы куколок и подмора <i>H. illucens</i>.....	69
3.2.1. Получение хитин- и хитозан-меланиновых комплексов	69
3.2.2. Исследование свойств хитин- и хитозан-меланиновых комплексов.....	73
3.2.2.1. Фотопротекторные и антиоксидантные свойства хитозан-меланинового комплекса	75
3.2.3. Получение и исследование эмульсионных систем с хитозан-меланиновым комплексом	78
3.2.3.1. Создание рецептуры солнцезащитного крема	78
3.2.3.2. Создание рецептуры крема антиоксидантного действия	85
3.3. Технология переработки мухи черная львинка на разных стадиях онтогенеза насекомого	90
3.3.1. Экономическая модель производства.....	92
Выводы	94
Заключение	96
Список сокращений.....	97
Список литературы	98

Введение

Актуальность проблемы

Проблема переработки отходов во всем мире стоит особенно остро, и одним из приоритетных направлений решения этого вопроса является их экологическая утилизация. В последние годы широкое распространение получила био, «зеленая» технология по утилизации органических отходов с помощью мухи черная львинка (*Hermetia illucens*) [1,2]. При переработке насекомого на разных стадиях онтогенеза на кормовые продукты в качестве отходов остается хитин-содержащее сырье. При наличии технологии его утилизации можно повысить эффективность всей технологии выращивания *H. illucens* и получать ценные биополимеры – хитин, хитозан, а также хитин- и хитозан-меланиновые комплексы.

На более ранних стадиях развития насекомые (личинки) слабо пигментированные, поэтому могут служить источником получения хитина и хитозана, в то время как на более поздних стадиях онтогенеза (куколки и подмор) сырье содержит хитин-меланиновый комплекс, который в дальнейшем можно преобразовать в хитозан-меланиновый комплекс.

На сегодняшний день основным источником хитина в промышленности являются отходы переработки ракообразных [3,4]. Кроме того, хитин содержится в грибах в комплексе с глюканом и в насекомых – с меланином. Хитозан, полученный в результате реакции дезацетилирования хитина, представляет собой природный полисахарид с уникальными свойствами, включая высокую биологическую и сорбционную активности [5]. На сегодняшний день известно более 200 областей применения данного биополимера, от медицины и парфюмерно-косметической промышленности до сельского хозяйства и сферы экологии [6,7]. Меланин является природным фото- и радиопротектором [8,9]. В зависимости от источника и метода выделения меланин обладает различными физико-химическими свойствами, которые могут дополнять биологическую активность хитозана и использоваться для решения важных научных и практических задач. Широкий потенциал таких соединений определяется высокой биологической активностью входящих в них компонентов. Насекомые являются

относительно малоизученными природными источниками хитина, хитозана и их меланиновых комплексов, поэтому исследование спектра биологической активности выделенных из них природных конъюгатов позволяет надеяться на создание новых лекарственных и косметических средств, БАДов, сорбентов. Таким образом, разработка эффективной и коммерчески привлекательной технологии получения природных полимеров из черной львинки будет стимулировать дальнейшее развитие технологии биоутилизации органических отходов с помощью насекомых.

Целью работы является разработка биотехнологических процессов получения хитина, хитозана, а также их меланиновых комплексов из мухи черная львинка на разных стадиях онтогенеза насекомого, изучение физико-химических и биологических свойств данных полимеров.

Для достижения поставленной цели были обозначены основные **задачи исследования:**

- разработать технологию получения хитина, хитозана из личинок мухи черная львинка, хитин- и хитозан-меланиновых комплексов из кутикулы куколок и подмора мухи черная львинка;
- исследовать динамику кислотного и ферментативного гидролизом с целью получения низкомолекулярных хитозанов с заданными молекулярными массами;
- исследовать биологическую (антибактериальную и противогрибную) активность низкомолекулярных хитозанов;
- исследовать сорбционную активность хитин-меланинового комплекса, фотопротекторные и антиоксидантные свойства хитозан-меланинового комплекса;
- исследовать возможность практического использования хитозан-меланинового комплекса в косметических кремах и разработать рецептуру косметического средства на его основе.

Научная новизна работы

Разработаны методы выделения хитина, хитозана и ковалентно связанных хитин- и хитозан-меланиновых комплексов из черной львинки как нового

уникального сырья. Впервые изучена биологическая (субстратная, антибактериальная и противогрибная) активность хитина и хитозана из *H. illucens* и сопоставлена с биополимерами из ракообразных. Показаны отличия по сравнению с биополимерами из традиционных источников.

Хитозан-меланиновые комплексы ранее не были получены в виде ковалентных комплексов из других промышленно разводимых насекомых, а были исследованы в форме механической смеси этих биополимеров. Чистота полученных соединений подтверждалась с помощью физико-химических методов и контроля содержания примесей.

Исследован ряд свойств меланиновых комплексов – сорбционных для хитин-меланиновых соединений, антиоксидантных и фотопротекторных – для хитозан-меланиновых. Показана усиленная биологическая активность хитозан-меланиновых комплексов, которые в дальнейшем были включены в состав косметических эмульсий.

Теоретическая и практическая значимость работы

Заключается в исследовании нового источника хитина, получении новых соединений и разработке методов их выделения. Разработаны технологии по получению хитина, низко- и высокомолекулярных хитозанов из личинок, хитин- и хитозан-меланиновых комплексов из кутикул куколок и подмора *H. illucens*. Исследованы физико-химические свойства и различные виды биологической активности полученных биополимеров и их комплексов. Разработаны рецептуры и исследованы *in silico* солнцезащитные и антивозрастные крема с водорастворимым хитозан-меланиновым комплексом, выделенным из подмора насекомых. Указанные разработки позволят наладить глубокую переработку черной львинки в промышленном масштабе с получением ценных биологически активных веществ для практического применения в косметической, фармацевтической и других сферах индустрии.

Объектом исследования являлось насекомое *Hermetia illucens* на разных стадиях онтогенеза – личинки 5-го возраста, куколки, имаго.

Предмет исследования – биополимеры, полученные из *H. illucens*, к которым относятся хитин, хитозан, хитин- и хитозан-меланиновые комплексы.

Методология диссертационного исследования: в работе использовали физико-химические методы исследования биополимеров, такие как метод кондуктометрического титрования, протонный магнитный резонанс (ПМР), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), инфракрасная (ИК) спектроскопия, элементный анализ, аминокислотный анализ и другие. Эксперименты выполняли в лабораторных условиях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Черная львинка служит сырьем для получения хитина и хитозана на ранних стадиях (личинки), хитин- и хитозан-меланиновых комплексов на более поздних стадиях онтогенеза (кутикула куколки и подмор).
2. Аморфный хитин может быть получен экстракцией фосфорной кислотой непосредственно из личинок.
3. Низкомолекулярный хитозан с заданными молекулярными массами может быть получен посредством контролируемого ферментативного или кислотного гидролиза.
4. Исследованы антибактериальная и противогрибная активности низкомолекулярного хитозана, полученного из *H. illucens*, показаны различия по сравнению с крабовым хитозаном с аналогичной молекулярной массой.
5. Хитин-меланиновый комплекс из подмора может быть использован в качестве сорбента радионуклидов. Благодаря синергическому эффекту двух биополимеров, хитозан-меланиновый комплекс обладает усиленными фотопротекторной и антиоксидантной активностями.
6. Водорастворимый хитозан-меланиновый комплекс может служить ингредиентом для создания рецептур солнцезащитных и антивозрастных косметических средств.

Степень достоверности и апробация результатов

Представленные в работе экспериментальные исследования были выстроены в строгом соответствии с рамками исследуемого предмета и проводились не менее, чем в трех повторностях. Проверка достоверности осуществлялась путем сравнения теоретических и экспериментальных результатов.

Материалы работы были представлены на Четырнадцатой Международной Конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Севастополь, 2018), Третьем Международном саммите по пищевой промышленности и пробиотикам (Third World summit and Expo on Food Technology and Probiotics) (Прага, 2018), Международной научно-практической конференции «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК» (Щелково, 2019), Третьей международной конференции по биоматериалам и наноматериалам (The 3rd International Conference on Nanomaterials and Biomaterials) (Лиссабон, 2019), Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения И.В. Звягина, «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК» (Щелково, 2020), Шестом междисциплинарном молодежном научном форуме с международным участием «Новые материалы и перспективные технологии» (Москва, 2020), XIII Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2021), Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию Армавирской биофабрики, «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов» (Армавир, 2021), Общероссийской конференции с международным участием «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Архангельск, 2021).

Работа стала победителем конкурса УМНИК РАН в 2020 году и была удостоена премии им. П.П. Шорыгина в 2021 году за лучшие разработки в области хитинологии.

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в выполнении основного объема теоретических и экспериментальных исследований, представленных в работе: анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, обработке полученных результатов, подготовке патентов, публикаций и научных докладов.

Методология и методы исследования

В работе использовались следующие физико-химические методы анализа: метод кондуктометрического титрования и ПМР для определения степени дезацетилирования (СДА) хитозанов, ВЭЖХ для выявления средневесовой молекулярной массы (M_w), среднечисленной молекулярной массы (M_n) и индекса полидисперсности ($I_p = M_w/M_n$), ИК спектроскопия для подтверждения структуры хитина, элементный и аминокислотный анализы для подтверждения чистоты соединения, электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) для определения содержания меланина в комплексах, методы динамического светорассеяния и лазерного микроэлектрофореза для определения размера и дзета-потенциала хитозана и хитозан-меланинового комплекса, метод двукратных серийных разведений для определения антибактериальной активности и метод радиального роста для определения противогрибной активности хитозана, радиометрические измерения для изучения сорбционных свойств хитин-меланинового комплекса для радионуклидов, потенциометрический метод для измерения рН крема, метод оптической микроскопии для определения микроструктуры крема, косметический аппарат для диагностики кожи и волос для определения параметров кожи, инструмент моделирования для подбора оптимальных концентраций фотопротекторных компонентов крема.

Объем работы

Работа состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Экспериментальная часть», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Заключение», «Список литературы». Работа изложена на 113 страницах, содержит

15 таблиц и 28 рисунков. Список литературы включает 153 источника, в том числе 140 иностранных.

Публикации

По теме диссертации опубликована 21 научная работа, среди них 5 статей в журналах, индексируемых в базах данных WoS, SCOPUS и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова, 1 статья в журнале, рекомендованном ВАК, 11 тезисов, получено 2 патента РФ.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность за ценные советы, переданный опыт и помощь в работе научному руководителю к.х.н. Лопатину Сергею Александровичу и заведующему лабораторией инженерии биополимеров ФИЦ Биотехнологии РАН, д.х.н., профессору Варламову Валерию Петровичу. Автор выражает признательность за поддержку и оказанное внимание всем сотрудникам лаборатории инженерии биополимеров ФИЦ Биотехнологии РАН.

Автор благодарен сотруднику ИПЭЭ РАН Бастракову А.И., сотруднику ИНЭОС РАН к.х.н. Тихонову В.Е., сотруднику ИБХФ РАН к.б.н. Донцову А.Е., сотруднику кафедры химической энзимологии МГУ им. М.В. Ломоносова к.х.н. Сеницыной О.А. за неоценимую помощь и содействие в проведении совместных работ.

Также автор выражает искреннюю признательность д.х.н., профессору Князеву Андрею Александровичу и всем сотрудникам кафедры «Технологии косметических средств» КНИТУ за помощь в проведении совместных исследований в разработке кремов.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Хитин и хитозан: свойства, источники, области применения

Хитин и хитозан – линейные полисахариды, которые состоят из различного количества N-ацетил-2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкопиранозы и 2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкозы в пиранозной форме и связаны друг с другом 1-4 гликозидными связями [5] (Рис. 1). Использование хитина было впервые описано французским химиком Анри Браконно в 1811 году, а название «хитин» происходит от греческого слова «хитон», что означает одежда, оболочка, кожа [10]. Хитин – второй по распространенности биополимер после целлюлозы, в котором содержится около 2-4% остатков 2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкозы [4]. Хитозан получают путем химического, реже ферментативного, деацетилирования хитина. Условно хитозаном считается полимер, растворимый в разбавленных органических кислотах, что соответствует степени деацетилирования примерно 40-45% [11,12].

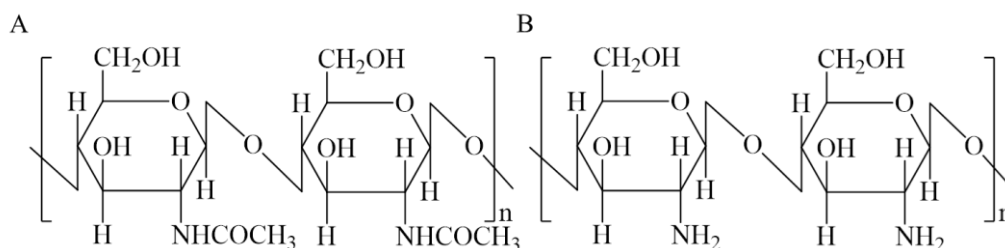


Рис. 1. Химическая структура хитина (А) и хитозана (В).

В природе хитин встречается у беспозвоночных, в панцирях ракообразных или кутикулах насекомых, в клеточных стенках грибов, зеленых водорослей и дрожжей [13,14]. Как правило, панцири ракообразных содержат 30-40% белка, 30-50% карбоната и фосфата кальция и 20-30% хитина [3,15]. Тем не менее, содержание хитина варьирует в зависимости от источника или даже вида, из которого он выделен. Например, панцири креветок *Crangon crangon* могут содержать 10-38% белка, 31-44% минеральных веществ и 24-46% хитина [16]. В грибах хитин содержится в виде хитин-глюканового комплекса, который крайне тяжело разделить на индивидуальные полисахариды [17]. Главное отличие насекомых как источника хитина – высокое содержание меланина, ковалентно

связанного с целевым биополимером. Для удаления меланина вводят стадию обесцвечивания. Тем не менее, стадия обесцвечивания не приводит к полному удалению биополимера, а только позволяет ослабить окраску.

В зависимости от источника хитин существует в виде двух основных полимерных форм: α - и β -хитин. Третий алломорф, γ -хитин, представляет комбинацию α и β форм [15,18]. α -хитин, β -хитин и γ -хитин соответствуют антипараллельным, параллельным и чередующимся полимерным цепям соответственно. Например, β -хитин можно извлечь из перьев кальмаров и легко превратить в α -форму с помощью щелочной обработки [15,19].

Благодаря сильным внутри- и межмолекулярным водородным связям, хитин нерастворим в обычных органических и неорганических растворителях, за исключением концентрированных минеральных кислот [7,20]. Известны некоторые традиционные системы полярных растворителей, такие как хлорид лития/диметилацетамид (LiCl/DMAc), хлорид лития/*N*-метил-2-пирролидон (LiCl/NMP) и дигидрат хлорида кальция/метанол ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$) [21]. В настоящее время для растворения хитина применяются альтернативные экологически чистые растворители, включая ионные жидкости [22], глубокие эвтектические растворители [23] и водные системы щелочь/мочевина [24]. Также было показано, что использование щелочных процедур замораживания-оттаивания может улучшить растворимость хитина и облегчить дальнейшие модификации, разрывая его внутри- и межмолекулярные водородные связи [25].

Хитозан является наиболее важным производным хитина. Благодаря наличию множества функциональных групп на его полисахаридной цепи, в первую очередь, аминогрупп, хитозан легко подвергается структурным модификациям [26]. Благодаря этому, хитозан обладает таким важным свойством, как растворимость в слабокислых водных растворах [27–29]. Аминогруппы в структуре хитозана являются хелатирующими лигандами, способными связывать различные ионы металлов.

Степень дезацетилирования и молекулярная масса хитозана сильно влияют на многие физико-химические, такие как растворимость, гидрофильность,

кристалличность, а также и биологические свойства хитозана. Применяются различные аналитические методы для определения степени дезацетилирования, включая ИК-спектроскопию, пиролизную газовую хроматографию, гель-проникающую хроматографию и ультрафиолет (УФ)-видимую спектрофотометрию, ^1H ядерный магнитный резонанс (ЯМР)-спектроскопию, ^{13}C ЯМР в твердом состоянии, термический анализ, различные схемы титрования, кислотный гидролиз, ВЭЖХ, методы разделительной спектрометрии и спектро스코пии в ближней инфракрасной области [6].

Хитозан предлагает большой спектр применения во многих областях, включая биотехнологию, пищевую промышленность и медицину. Биополимер широко используется в химической и текстильной промышленности, мембранах и очистке сточных вод из-за своей поликатионной природы [26,27,30,31]. Кроме того, он часто применяется в сельском хозяйстве, косметике, защите пищевых продуктов, производстве бумаги и тканевой инженерии [31–34]. В более поздних работах были исследованы наночастицы [35–41] и гидрогели [42–47] на основе хитозана с потенциальным внедрением в биомедицинских, фармацевтических и сельскохозяйственных сферах.

1.2. Способы получения хитина

В настоящее время основным источником сырья для получения хитина являются панцири ракообразных. Способ получения хитина включает стадию депротеинирования для удаления белков и деминерализации для удаления неорганического карбоната кальция вместе с небольшими количествами пигментов и липидов [48]. В некоторых случаях для удаления остаточных пигментов применяется дополнительная стадия обесцвечивания. На протяжении последних десятилетий были предложены и использованы различные методы для получения кристаллического хитина; однако, стандартный метод принят не был.

Стадия депротеинирования заключается в разрыве химических связей между хитином и белками. Этот процесс проводят гетерогенно с использованием химических веществ, которые могут деполимеризовать биополимер.

В качестве реагентов для химического депротеинирования применяется широкий спектр химических веществ, включая NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂, Na₂SO₃, NaHSO₃, CaHSO₃, Na₃PO₄ и Na₂S [48]. Условия реакции значительно варьируют в каждом исследовании. Предпочтение отдается NaOH, и его применяют в концентрации от 0,125 до 5,0 М, при различной температуре (до 160°C) и продолжительности обработки (от нескольких минут до нескольких дней) [48]. Помимо депротеинирования использование NaOH приводит к частичному деацетилированию хитина и гидролизу биополимера, что снижает его молекулярную массу.

Предпринимались попытки заменить химическое депротеинирование ферментативным [49,50], но они не позволяли полностью удалить белки.

Деминерализация проводится для удаления минералов, в первую очередь карбоната кальция. Эта стадия обычно включает кислотную обработку с использованием HCl, HNO₃, H₂SO₄, CH₃COOH и HCOOH [51,52]. Среди этих кислот предпочтение отдается разбавленной соляной кислоте.

Деминерализация часто является эмпирической и варьирует в зависимости от степени минерализации, времени экстракции, температуры, размера частиц, концентрации кислоты и соотношения растворенного вещества/растворителя. Последнее зависит от концентрации кислоты, так как для превращения одной молекулы карбоната кальция в хлорид кальция требуются две молекулы HCl. Чтобы реакция прошла полностью, количество кислоты должно быть равно или даже превышать стехиометрическое количество минералов [53]. Поскольку трудно удалить все минералы (из-за неоднородности твердого вещества), используется больший объем или более концентрированный раствор кислоты.

Деминерализация с использованием HCl обычно длится 2-3 ч при перемешивании [53]. Тем не менее, время реакции варьирует от 15 мин [52] до 48 ч в зависимости от применяемого метода. Более длительное время деминерализации, даже до нескольких дней, приводит к небольшому снижению содержания золы и также вызывает деградацию полимера [53,54]. Использование высокой температуры ускоряет реакцию деминерализации, способствуя проникновению

растворителя в хитиновую матрицу. Таким образом, некоторые реакции деминерализации проводились при более высокой температуре [55].

Разрушив кристаллическую решетку хитина, можно получать его в аморфной форме. Коллоидный раствор хитина получают путем осаждения этого биополимера из его растворов в минеральных кислотах (соляной, водной серной, фосфорной или метансульфоновой кислотах) [56]. Коллоидный раствор хитина используется как субстрат для определения активности хитинолитических ферментов и лизоцима.

Хитин играет важную роль в строении насекомых: рост и развитие насекомых строго зависят от способности реконструировать хитиновые структуры [57]. Этот биополимер присутствует в насекомых на всех стадиях онтогенеза. Хитин является основным компонентом кутикулы насекомого. Физико-химические анализы показывают, что содержание хитина составляет до 40% от сухой массы кутикулы в зависимости от вида насекомых и значительно варьирует в зависимости от типа кутикулы даже в одном организме [58]. Например, *Holotrichia parallela* содержит 15% хитина [59], *Bombyx mori* 15–20% [60] и цикада 36% [61]. Хитин обнаружен в экзо- и эндокутикуле, во вновь секретируемой, некротизированной прокутикуле, но не в эпикутикуле, внешней части покровов [62]. Он выполняет функцию легкого, но одновременно механически прочного каркасного материала и всегда связан с белками кутикулы, которые в большинстве случаев определяют механические свойства кутикулы.

Стоит отметить, что в насекомых, в отличие от ракообразных, хитин связан с меланином, а кроме того, исходное сырье может содержать большой процент жира. Эти особенности приводят к необходимости введения дополнительных стадий очистки при получении хитина. Несмотря на это, число исследований, посвященных получению из насекомых хитина и продуктов на его основе, в последнее время неуклонно растет. Причем это относится не только к насекомым, культивируемым в промышленных масштабах, но и достаточно экзотическим организмам, таким как цикада, пятиустка, зофобас и другим.

1.3. Меланины

Меланины (от греческого мелано, что означает темный или черный), несмотря на широкое распространение в природе, являются одними из наиболее загадочных биополимеров в биосфере [9]. Эти биополимеры синтезируются путем окисления и полимеризации фенольных/индольных предшественников. Степень пигментации в значительной степени определяется способностью специализированных клеток синтезировать коричнево-черный эумеланин и желто-красноватый феомеланин [63]. Эумеланин обычно считается гетерогенной макромолекулой 5,6-дигидроксииндола и его 2-карбоксилированной формы 5,6-дигидроксииндол-2-карбоновой кислоты (Рис. 2). Феомеланин происходит из серосодержащей цистеинилдопы и, как полагают, является гетерогенной макромолекулой.

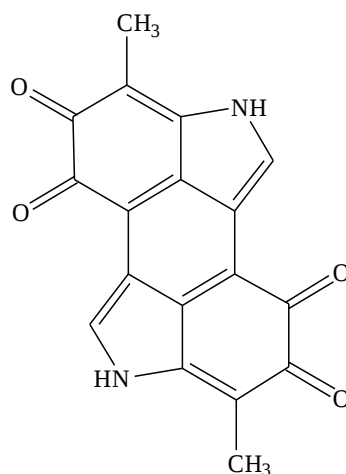


Рис. 2. Упрощенная модель структуры эумеланина.

В литературе описывается, что насекомые содержат меланины, отличные друг от друга и обладающие своими особенностями [8]. Экзокутикула насекомых окрашена за счет хинонов, которые образуются при окислении из катехинов [64]. Экзоскелеты насекомых укрепляются в результате процесса, называемого склеротизацией, который часто сопровождается меланизацией или загаром [65]. Меланин насекомых относится к особому классу эумеланинов, прекурсором которого является N-ацетилдопамин [66] (Рис. 3). Меланогенез насекомых также связан с врожденным иммунитетом и гомеостазом насекомых [67,68]. Можно

предположить, что присутствующий у насекомых эумеланин связан с хитозаном через частично дезацетилированные аминокетогруппы.

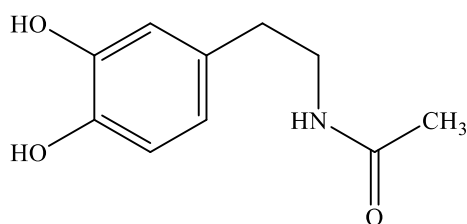


Рис. 3. Структура прекурсора меланина насекомых.

Очевидно, что функция меланинов определяется их физическими и химическими свойствами. Эти свойства – антиоксидантное и свободное поглощение радикалов, широкополосное ультрафиолетовое и видимое поглощение и сильная релаксация фото-возбужденных электронных состояний – определяются структурой молекулярного, супрамолекулярного и агрегатного уровней [69,70]. Важно отметить, что меланины характеризуются сильным отрицательным зарядом, высокой молекулярной массой и гидрофобной природой [71].

Считается, что меланин является фотозащитным пигментом. Защитное действие меланина связано с его высокой эффективностью поглощения и рассеяния фотонов, особенно фотонов с более высокой энергией от ультрафиолета и синей части солнечного спектра. В результате сверхбыстрой фотодинамики энергия поглощенных фотонов быстро и эффективно преобразуется в тепло [72]. Вероятно, что фотозащитные свойства меланина также обусловлены его способностью нейтрализовать возбужденные состояния определенных молекул и удалять активные формы кислорода, которые могут образовываться в пигментированных клетках. Кроме того, в различных модельных системах было показано, что меланин является мощным антиоксидантом [73].

В дополнение к значимости меланина для биологических организмов, этот биополимер имеет множество потенциальных применений в биофизике, материаловедении, косметике и здравоохранении [74,75]. Потенциал меланина связан не только с его химическим составом на молекулярном уровне, но и его универсальности как компонента надмолекулярной структуры в клеточной среде.

1.4. Получение хитина, хитозана и их меланиновых комплексов из насекомых

1.4.1. Пчела *Apis mellifera*

Еще с древних времен медоносная пчела широко культивировалась человеком. Помимо меда и воска, пчелы служат источником хитина и хитозана. Стоит отметить, что подмор пчел бывает трех видов, которые достаточно сильно отличаются по химическому составу: весенний (после зимовки), летний, собираемый возле ульев, и тела пчел, оставшиеся после лечения пчелоужалением. К сожалению, в работах авторы не указывают вид исследуемого подмора.

В работе [76] меланопротеиновые и хитин-меланиновые комплексы были выделены из подмора пчел. Перед обработкой подмор измельчали до размера частиц 0,5-2 мм. Меланопротеиновые комплексы экстрагировали 10% NaOH при 70°C в течение 2 ч при постоянном перемешивании. По завершению процесса экстракции суспензия была отфильтрована, а фильтрат обрабатывали петролевым эфиром для извлечения липидной фазы. Меланопротеиновый комплекс осаждали концентрированным HCl; pH раствора доводили до 2,0 для обеспечения более полного осаждения полимера. Полученный осадок отделяли центрифугированием, диализовали против воды до нейтрального pH и лиофильно высушивали. Осадок, оставшийся после экстракции, промывали дистиллированной водой до нейтрального pH и сушили при температуре не выше 50°C. Полученное вещество представляло хитин-меланиновый комплекс; его цвет варьировал от темно-коричневого до черного. Довольно высокое (5,8%) содержание азота в меланопротеиновом комплексе из подмора пчел позволило отнести его к подклассу эумеланинов.

В работе [77] первоначально подмор пчел дважды обрабатывали этанолом (2 л/100 г) для удаления поверхностного воска. Полученную материю измельчали и деминерализовали с использованием 1 М HCl (2 л/100 г) при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем деминерализованную материю отмывали на фильтре до нейтрального pH и высушивали в вакууме при 60°C. Стадию депротеинирования проводили в 1 М NaOH при 80°C без перемешивания с

отношением раствора к твердому веществу около 1,5 л/100 г. Время щелочной обработки составляло от 6 до 64 ч. Твердый осадок отделяли фильтрацией, промывали до нейтрального pH и сушили при 60°C при пониженном давлении.

Окончательная депигментация образцов, очищенных от белков и частично от меланина во время депротеинирования, проводилась в гетерогенных условиях с использованием окислительно-восстановительных реагентов. Разбавленные водные растворы KMnO_4 с концентрацией 1, 0,5 и 0,1% использовали при 20°C в качестве окислителя, а щавелевая кислота $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ с концентрацией 1% в воде – в качестве восстановителя. Полученную материю отфильтровывали, промывали дистиллированной водой до нейтрального pH и высушивали в вакууме при 60°C. Затем растворяли в ДМА/5% LiCl, отделяли фильтрацией нерастворимые компоненты, а хитин получали в виде пленок или путем осаждения водой. Выбор данного растворителя не случаен, так как в водных растворителях частично растворяется и хитин-меланиновый комплекс. В работе выход хитина составил 18%. Молекулярная масса была в пределах 318 и 424 кДа. Степень ацетилирования (СА) хитина составляла около 96%.

В работе [78] биомассу насекомых дважды обрабатывали 8%-ным раствором NaOH в течение часа при 90°C (процесс депротеинирования). Затем проводили деминерализацию с помощью 6,7% раствора HCl в течение 3 ч при 25°C. После этого конечный продукт отфильтровывали, промывали дистиллированной водой до нейтрального pH. Наконец, продукт обезжиривали 96% этанолом в экстракционном аппарате Сокслета в течение 18 ч, промывали дистиллированной водой и высушивали до постоянного веса при 50-60°C. Полученные образцы называли хитин-меланиновыми комплексами. Выход комплексов составлял 23%. Депигментацию хитин-меланиновых комплексов осуществляли путем обесцвечивания комплексов 33%-ным раствором H_2O_2 . Экстрагированные продукты были охарактеризованы с помощью Фурье-ИК-спектроскопии и элементного анализа. Было обнаружено, что доля хитиновой части больше, чем меланиновой.

В работах [79] и [80] описан способ получения хитозан-меланинового комплекса из подмора пчел. Способ включал предварительную сушку хитин-меланинового сырья до влажности 4-6%, обеспечивающую его крошимость, затем высушенную массу перетирали до порошкообразного состояния, депротеинировали 10% раствором щелочи NaOH при температуре 78-82°C в течение 1,5-2,0 ч. 50% раствор NaOH добавляли в реакционную смесь, таким образом доводя его концентрацию до 30% от исходной. Полученный хитин-меланиновый комплекс дезацетилировали при температуре 90-95°C в течение 1,5-2,0 ч, фильтровали, при этом отфильтрованную массу получали путем промывания массы дистиллированной водой до достижения pH 7. Из оставшегося после фильтрования раствора меланин осаждали воздействием концентрированной соляной кислоты до изменения pH среды обрабатываемого раствора в кислую область и выпадения хлопьевидного осадка, представляющего собой меланин. Меланин отделяли от жидкой фазы центрифугированием, промывали, отдельно сушили хитозан и меланин при температуре 50-60°C до влажности 8-10% и смешивали их для получения конечного продукта хитозан-меланинового комплекса. Важно отметить, что в данном способе хитозан и меланин получали отдельно, а комплексы – путем механического смешивания двух биополимеров.

Выход хитозан-меланинового комплекса составил около 24% по массе от исходного сырья. По данным авторов следует, из подмора пчел невозможно получать хитозан-меланиновые комплексы, в которых компоненты соединены ковалентной связью, так как при реакции дезацетилирования происходит разрушение такого комплекса.

Таким образом, несмотря на то, что в некоторых работах описывают способы экстракции хитин-меланиновых комплексов из пчел, хитозан-меланиновые комплексы получают путем механического смешивания этих биополимеров. Это свидетельствует о том, что при проведении реакции дезацетилирования меланин удаляется, и комплекс получают отдельно. Важно также отметить, что в большинстве вышеуказанных примеров не были определены примеси в конечных продуктах, что не подтверждает их чистоту.

1.4.2. Тутовый шелкопряд *Bombyx mori*

Куколки тутового шелкопряда – потенциальное сырье для получения хитина и хитозана, поскольку являются отходом при производстве шелка.

В работе [81] выделение хитина осуществлялось через ряд стадий. Для экстракции жира из куколок использовали ацетон или спирт, процесс экстракции происходил в аппарате Сокслета в течение 3-4 ч. Реакция депротеинирования проводилась в присутствии 5-7% NaOH при модуле 1:5 и температуре 95-100°C, деминерализация – с использованием 2% HCl. Промытый продукт высушивался и отбеливался 10% H₂O₂.

На первом этапе после экстракции выход продукта реакции составлял 80%, при этом процессе удалялись жиро-восковые вещества. После стадии депротеинирования выход снизился до 5,4%. При проведении деминерализации выход составил около 4,0%. На последнем этапе, отбеливании хитина, выход уменьшался до 3,6%. Авторы отмечают, что степень кристалличности исходных образцов хитина составила 76-86%.

В работе [60] хитин из кутикулы куколки шелкопряда выделяли обработкой 1 N HCl при 100°C в течение 20 мин и 1 N NaOH при 80°C в течение 36 или 24 ч и кипятили с обратным холодильником с 0,4% Na₂CO₃ в течение 20 ч. Остаток промывали дистиллированной водой и сушили на P₂O₅ в вакууме. Выход хитина составил 15-20%.

Образец хитина обрабатывали водным 40%-ым раствором NaOH, содержащем 0,1% NaBH₄ при 110°C в течение 4 ч. Продукт растворяли в водной 2%-ой уксусной кислоте, фильтровали, и раствор супернатанта был доведен до pH 8-9 с использованием 1 N NaOH. Выпавший осадок тщательно промывали дистиллированной водой и сушили, в результате чего получали 70–80% хитозана. При этом авторы работы не характеризуют полученный хитозан и не определяют СДА.

В работе [82] применялись два метода для сравнения выхода и чистоты хитина из куколок тутового шелкопряда. Извлечение хитина из куколок проводили с использованием закрытого реактора из тефлона. Этот реактор был помещен

внутри реактора из нержавеющей стали, перед нагревом в духовке. Для второго метода экстракция проводилась в открытой системе (стакане) с использованием нагревательной плитки.

Сначала высушенные куколки обрабатывали 1,0 М HCl в течение 20 мин при 100°C в закрытом реакторе. Деминерализация проводилась в пропорции 10 мл HCl/г сушеных куколок. Остаток фильтровали и несколько раз промывали деионизированной водой до нейтрального pH. Затем проводили обработку 1,0 М NaOH в течение 24 ч при 80°C, в той же пропорции, которая использовалась для кислоты. Горячий раствор фильтровали, и осадок промывали несколько раз деионизированной водой до нейтрального pH. Хитин несколько раз промывали 0,4% Na₂CO₃ и сушили при 80°C. Время обработки щелочью составляло 1-24 ч, температура 65-100°C, выход хитина варьировал от 2,6 до 4,2%. Реакцию дезацетилирования хитина проводили раствором NaOH с последующей обработкой NaBH₄. Время обработки щелочью составляло 1-6 ч, температура 100°C, выход хитозана (относительно хитина) варьировал в интервале 73-97% в зависимости от времени обработки.

В рассмотренных работах не были определены примеси на каждом этапе обработки сырья, что не гарантирует чистоту конечного продукта.

1.4.3. Муха черная львинка *Hermetia illucens*

Муха черная львинка *Hermetia illucens* обитает в богатых питательными веществами средах в западном полушарии. Личинки этих насекомых выращиваются на многих видах разлагающихся органических материалах и используются для компостирования, так как они могут превращать органические отходы в богатые питательными веществами удобрения. Личинки способны перерабатывать широкий спектр субстратов, например, побочные продукты сельского хозяйства и органические отходы животного или растительного происхождения [2]. Это открывает возможности для инновационной технологии переработки отходов насекомыми посредством биоконверсии [1]. Кроме того, личинки черной львинки являются хорошим источником жира и белка для кормления животных и производства биодизеля [83]. Сегодня в мире активно

развивается технология по переработке пищевых отходов и органических отходов сельского хозяйства с помощью личинок мух черная львинка. Лидерами в этом направлении являются ЮАР, Канада, США, Нидерланды, Китай, причем количество перерабатываемых отходов уже составляет сотни тысяч тонн. В настоящее время эта технология стала развиваться и в России.

Важно отметить, что насекомое черная львинка уникально, так как доступно на всех стадиях онтогенеза, в отличие от других промышленно выращиваемых насекомых, пчел и тутового шелкопряда. На более ранних стадиях, личинки *H. illucens* непигментированные, и из них можно получать хитин, а затем и хитозан. На более поздних стадиях развития – в предкуколках, куколках, подморе – насекомые накапливают меланин, что подтверждается визуально. Соответственно, они становятся источником как хитин-, так и хитозан-меланиновых комплексов. Кроме того, хитин и меланин в черной львинке связаны прочными ковалентными связями, что отличает их от подмора пчел, где комплексы получают путем механического смешивания биополимеров.

Известные способы получения хитина из черной львинки основаны на стандартном подходе, включающем последовательное удаление примесей из исходного сырья. В работе [84] образцы, состоящие из кутикулы куколок и подмора, были очищены, высушены до постоянного веса и размолоты в лабораторной мельнице. Деминерализация проводилась с использованием 1 М HCl в течение часа. Деминерализованный порошок промывали дистиллированной водой. Депротеинирование проводили с использованием 1 М NaOH в течение 24 ч при 80°C. Экстракт фильтровали и обесцвечивали с использованием 1% KMnO₄. Избыток KMnO₄ удаляли 4% щавелевой кислотой. Бело-серый конечный продукт затем фильтровали, промывали дистиллированной водой и сушили. Результаты элементного анализа представлены в Табл. 1.

Табл. 1. Элементный анализ кутикулы куколки и подмора *H. illucens* [84].

<i>H. illucens</i>	%C	%H	%N	C/N	CA%
Кутикула куколки	35,23	5,11	3,73	9,45	250
Подмор	32,09	4,80	3,9	8,23	179

Используемое в данной работе хитин-содержащее сырье является сильно пигментированным, и часть меланинов ковалентно связана с хитином. Поэтому была добавлена стадия обесцвечивания, проведенная в присутствии 1%-го раствора KMnO_4 . Однако такая обработка не позволяет удалить весь меланин. Кроме того, в работе не проводилось обезжиривание, и не определялись возможные примеси в полученном хитине (белок, липиды, меланин). Степень ацетилирования полученных образцов хитина, рассчитанная по эмпирической формуле на основе данных элементного анализа, составляла 250 и 179% при теоретически максимально возможных 100%. Это говорит о наличии в них примесей не хитиновой природы.

В работе [85] получение хитина из предкуколок черной львинки осуществлялось через ряд стадий. Исходное сырье содержало (по сухому весу) 32% белков, 37% жиров, 19% минеральных веществ, 9% хитина. Первая стадия, обезжиривание исходного сырья, проходила в два этапа с использованием петролейного эфира. Затем обезжиренное сырье подвергалось обработке 1 М раствором NaOH , а заключительная стадия деминерализации проводилась с использованием 2 N HCl . После центрифугирования осадок промывали водой и высушивали. В результате этого метода удалось фракционировать исходное сырье в три основных продукта – жир, белок и хитин. Выход хитина в данной работе варьировал от 11,7% до 14,6% в зависимости от степени ацетилирования. При этом в работе не приводятся данных, подтверждающих чистоту полученного хитина.

В работе [86] хитин экстрагировался из личинок через стадии промывки дистиллированной водой, депротенинирования 1 М раствором NaOH при 80°C в течение 1 ч (13 циклов, соотношение твердой материи к растворителю 1:50; в/в) и промывкой дистиллированной водой до нейтрального значения pH. Кислотный гидролиз проводили в жаростойких и устойчивых к давлению стеклянных банках.

К 50 мг сухих, измельченных и деминерализованных образцов добавляли 5 мл 6 N HCl. Реакция была выполнена в течение 2-16 ч при 110°C. Затем реакционную смесь центрифугировали для удаления остаточного нерастворенного материала с последующим фильтрованием. Исходя из описания метода, можно сделать вывод, что используются слишком жесткие условия для получения хитина, но при этом отсутствует стадия обезжиривания.

В работе [87] авторы описывают оптимальные условия для получения хитозана из личиночных экзоскелетов *H. illucens* и оценивают конечный продукт относительно крабового хитозана. Для проведения деминерализации использовалась муравьиная кислота (5 моль на кг личиночных экзоскелетов), и эффективность процесса составила 89%. Содержание минералов составило 8,8% по сухому весу. При малых объемах реакция депротеинирования проводилась в 1,9 M NaOH в течение 2,8 ч при 81°C; при больших объемах (10 л) концентрация щелочи составляла 2 M, время реакции 2 ч, температура 80°C. Влияние переменных депротеинирования было проанализировано с помощью линейной регрессии, содержание хитина в депротеинированном материале составило 83% в мелком масштабе и 87% в масштабе 10 л. Проводились два вида реакции дезацетилирования. Гетерогенное дезацетилирование при 120°C приводило к СДА 72% и максимальному выходу 43% по отношению к хитину. Гомогенное дезацетилирование при 4°C приводило к низкому выходу хитозана 13% и СДА 34%. Однако при растворении в уксусной кислоте хитозан демонстрировал превосходные пленкообразующие свойства и высокую вязкость. Результаты исследования показали, что хитозан из насекомых обладает сопоставимыми с хитозаном из отходов ракообразных свойствами, которые сильно зависят от применяемых для производства условий.

В работе [88] авторы сравнивают физико-химические свойства хитиновой матрицы, полученной на разных стадиях развития насекомых – личинки, предкуколки, куколки, имаго. Содержание хитина составляло 3,6%, 3,1%, 14,1% и 2,9% соответственно. Индекс кристалличности увеличивался от личинки до взрослой мухи: 33,1%, 35,1%, 68,4% и 87,9% соответственно. Тем не менее, авторы

не учитывают наличие меланина на более поздних стадиях развития насекомого, начиная с куколки.

Сначала образцы деминерализовали 2 М раствором HCl при 55°C в течение 1 ч. Затем депротеинировали 2 М раствором NaOH при 50°C в течение 18 ч при 200 об/мин. После фильтрования образец помещали в 3,6% раствор HCl и оставляли на 0,5 ч, далее добавляли раствор NaClO, разбавленного в 10 раз. Смешанный раствор нагревали на масляной бане при 80°C в течение 4 ч для удаления пигментов, полученные образцы высушивали. Важно заметить, что пигменты, меланины, невозможно полностью удалить из предкуколок, куколок и взрослых мух такой обработкой, так как меланины связаны с хитином прочными ковалентными связями.

В работе [89] личинки черной львинки обезжиривали в растворе гексана в течение 6 ч. Хитин экстрагировали по методу [64], но авторы не уточняют какой из двух методов (в открытой или закрытой системе) применялся в работе. Деминерализация проходила в 1 М HCl в течение 20 мин при 100°C, депротеинирование – в 1 М NaOH в течение 24 ч при 80°C. Затем образцы несколько раз обрабатывали 0,4% Na₂CO₃ и сушили. Хитин деацетилювали 40% раствором NaOH (в/в), с использованием NaBH₄ в качестве восстанавливающего агента. Авторы работы определяли примеси на каждом этапе обработки. Содержание белка в личинках было около 43,0%, хитина – 20,3%.

Можно сделать вывод, что черная львинка служит источником чистого хитина и хитозана только на ранних стадиях своего развития, включая личинки 5-го возраста. На более поздних стадиях онтогенеза (предкуколки, куколки, имаго) в насекомых образуется меланин, который соединен с хитином прочными ковалентными связями. Обесцвечивание такого комплекса не позволяет разорвать эти связи и полностью удалить меланин, поэтому чистый хитин на более поздних стадиях получить не удастся.

Получение хитозан-меланинового комплекса из *H. illucens* описывается в работе [90]. Тем не менее, авторы работы не описывают сам способ, а ссылаются на работу [80], что свидетельствует о том, что комплексы являются механической

смесью биополимеров. Идентификацию пигментов проводили на основании оценки их растворимости, спектральных и парамагнитных свойств, что также свидетельствует о том, что меланин получали отдельно, а затем добавляли к хитозану.

В другой работе [91] получали меланин и хитин-меланиновые комплексы из подмора *H. illucens*. Водорастворимый меланин экстрагировали с использованием 10% NaOH при комнатной температуре в течение 16 ч. Затем меланин осаждали концентрированной HCl, промывали дистиллированной водой до нейтрального pH, центрифугировали не менее 3 раз и сушили. Хитин-меланиновый комплекс получали через стадии кислотного гидролиза с 25% H₂SO₄ с обратным холодильником в течение 3 ч. Далее, гидролизат был охлажден до 40°C, отфильтрован, промыт дистиллированной водой и высушен. Выход комплекса составил около 28%. В конце проводили стадию обезжиривания как комплекса, так и подмора с использованием хлороформа. Тем не менее, авторы работы не приводят данные по содержанию белка и жира и не определяют чистоту конечного продукта.

В работе [92] авторы описывают получение как низко-, так и высокомолекулярного хитозана из непигментированного сырья – личинок черной львинки. Аморфный хитин получали с помощью метода прямой экстракции [93]. Сначала к обработанной на маслопрессе биомассе личинок добавляли 85% раствор H₃PO₄ и оставляли на 16 ч при комнатной температуре. Реакционную массу фильтровали через стеклянный пористый фильтр, осадок промывали 40% раствором H₃PO₄. Растворенный хитин высаживали добавлением дистиллированной воды при перемешивании, затем отмывали от избытка щелочи дистиллированной водой с помощью декантации до нейтрального pH. Полученную суспензию хитина лиофильно сушили. Выход аморфного хитина был 7%.

Реакцию деацетилирования аморфного хитина проводили в 50% (в/об) NaOH на водяной бане при 100°C в течение 1 ч с периодическим перемешиванием. После этого реакционную смесь разбавляли водой, а избыток щелочи удаляли с помощью катионообменной смолы. Затем раствор диализовали против воды для

удаления остатков щелочи и низкомолекулярных компонентов и лиофильно высушивали. Выход хитозана составлял 32%.

Для получения кристаллического хитина авторы добавляли стадию обезжиривания с помощью смеси $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (7:3). После проведения такой обработки выход составлял 93%. Деминерализацию проводили с помощью 2% HCl в течение 2 ч при 20°C. После данной стадии выход составлял 58%. Депротеинирование проводили обработкой 5% (в/в) NaOH на водяной бане в течение 2 ч при 50°C при периодическом перемешивании. Полученный хитин отделяли на пористом стеклянном фильтре, промывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH и лиофильно сушили. Выход хитина составил 46%.

Стадию деацетилирования проводили с использованием 50% (в/в) NaOH при 100°C в течение 2 ч, периодически перемешивая. Суспензию охлаждали, осадок отделяли на пористом стеклянном фильтре, промывали водой до нейтрального pH и лиофильно сушили. Далее хитозан доочищали путем растворения в 1% CH_3COOH . Раствор фильтровали на пористом стеклянном фильтре, добавляли 1 М NaOH до pH 10 и диализовали против воды для удаления избытка щелочи и соли и лиофильно высушивали. Выход хитозана составлял 80%.

В обоих случаях продукты были охарактеризованы с помощью методов ВЭЖХ, ПМР и кондуктометрического титрования. При деацетилировании аморфного хитина одновременно происходила и его деструкция, в результате чего получали низкомолекулярный хитозан ($M_w=15$ кДа, СДА=42-47%). Молекулярная масса хитозана, полученного вторым способом, составляла 160 кДа, СДА – 90%.

В работе [94] был разработан способ по получению хитин- и хитозан-меланиновых комплексов из подмора и кутикулы куколок *H. illucens*. Следует отметить, что хитин-содержащее сырье было охарактеризовано на каждой стадии обработки, было определено содержание примесей (протеина, жира), что в других работах ранее не встречалось. Более того, жир в подморе отличался из-за возможного присутствия воска, ввиду чего была введена стадия обезжиривания диэтиловым эфиром. Стадию деминерализации проводили с использованием 1% HCl в течение 2 ч при 20°C. После этого твердый остаток отделяли на пористом

стеклянном фильтре. Затем промывали дистиллированной водой до нейтральных значений pH и лиофильно высушивали. Хитин-меланиновый комплекс получали обработкой 50% (в/об) NaOH на водяной бане в течение 2 ч при 50°C при периодическом перемешивании. Затем полученный твердый остаток отделяли на пористом стеклянном фильтре, промывали водой до нейтрального pH и лиофильно сушили.

Хитозан-меланиновый комплекс получали обработкой 50% (в/в) NaOH на 100°C водяной бане в течение 2 ч, периодически перемешивая. Суспензию охлаждали, осадок отделяли на пористом стеклянном фильтре, промывали водой до нейтрального pH и лиофильно сушили.

Следует отметить, что ранее в литературе не было описано способов получения ковалентно связанных хитозан-меланиновых комплексов из мухи черной львинки и не было определено содержание примесей в этих комплексах.

1.4.4. Шмель *Bombus terrestris*

В работе [95] стадию деминерализации проводили путем обработки 1 М HCl при 100°C в течение 20 мин. После этого промывали дистиллированной водой до нейтрального pH. Депротеинирование проводилось с использованием 1 М раствора NaOH при 85°C. Эту обработку повторяли несколько раз в течение 24 ч. Продукт фильтровали и промывали дистиллированной водой до нейтрального pH. Пигмент удаляли с помощью мягкой окислительной обработки (H₂O₂/HCl 9:1, об/об). Наконец, слегка коричневый хитин был промыт дистиллированной водой и высушен. Степень ацетилирования составила 87,3%. Окрашенный продукт свидетельствует о низкой чистоте хитина и возможном содержании в нем меланина.

1.4.5. Цикада *Neotibicen linnei*

Хитин был получен из шкурок цикады [12] согласно методу, описанному в работе [60]. 30 г сушеных шкурок цикады обрабатывали 1 N HCl в течение 20 мин при 100°C и промывали дистиллированной водой до нейтрального pH. Затем твердый продукт обрабатывали 1 N NaOH при 80°C в течение 36 ч, фильтровали и перемешивали с 0,4% (в/об) раствором карбоната натрия в течение 12 ч и

промывали дистиллированной водой до нейтрального pH. Пигмент в этом продукте удаляли с использованием 6% гипохлорита натрия в качестве окислителя. В конце, хитин из шкурок цикады снова промывали дистиллированной водой и сушили в вакууме. Хитин очищали с помощью деминерализации HCl, депротеинирования NaOH и обесцвечивания гипохлоритом натрия. Выход очищенного хитина из шкурок цикады составил 36,6% [12]. Шкурки содержали 8,7% влаги, 11,7% золы, 2,7% липидов и липопротеинов, 39,8% белка и 36,6% хитина. Полученный хитин содержал 7,7% влаги и 8,4% золы. Было отмечено, что процентное содержание золы до деминерализации составило 11,7%, а после деминерализации уменьшилось на 3,2-8,4%. СДА составила 90,8% (метод PMP) и 96,8% (^{13}C CP/MAS ЯМР).

1.4.6. Пятиустка *Leiperia cincinnalis*

Образцы *L. cincinnalis* были обработаны 70% этанолом, промыты деионизированной водой и высушены при 50°C [96]. Для выделения хитина высушенные материалы были обработаны 2 М NaOH в течение 12 ч при комнатной температуре. Затем образцы обрабатывали в той же концентрации NaOH в течение 6 ч при 100°C и диализовали против воды до нейтрального pH. Образцы фильтровали и инкубировали в 0,5 М растворе HCl при комнатной температуре в течение 1 ч для деминерализации. Затем повторно диализовали до нейтрального pH, фильтровали и сушили в течение 24 ч при 40°C. В работе не показаны содержание примесей в конечном продукте и его выход.

1.4.7. Зофобас *Zophobas morio*

Обработанные личинки промывали проточной водопроводной водой для удаления примесей и сушили в конвекционной печи в течение ночи при 70°C [97]. Сначала образцы были деминерализованы 1,0 М раствором HCl в 35°C водяной бане в течение 30 мин, отфильтрованы и промыты дистиллированной водой до нейтрального pH. Затем деминерализованные образцы смешивали с тремя разными концентрациями раствора NaOH (0,5, 1,0 и 2,0 М). Депротеинирование было проведено на водяной бане в течение 20 ч при 80°C. Материю отфильтровывали и тщательно промывали дистиллированной водой до нейтрального pH. Для удаления органического пигмента образцы хитина были обработаны ледяным ацетоном в

течение 30 мин. Хитин был отфильтрован от ацетона, высушен в начале при комнатной температуре, а затем полностью высушен в конвекционной печи при 70°C.

Полученный хитин дезацетилювали с помощью 50% NaOH в течение 30 ч в 90°C водяной бане. Образцы были отфильтрованы и промыты дистиллированной водой до нейтрального pH. Затем образцы хитозана сушили в конвекционной печи в течение ночи при 70°C. Наибольший выход наблюдался в наименее концентрированной щелочи и составлял 5,5%. Выход хитозана составлял 65,8%, 70,9% и 75,5% из хитина, полученного в 0,5 М, 1,0 М и 2,0 М щелочи соответственно.

Степень ацетилирования хитина составляла 82,4%, 92,8% и 101,4%, в 0,5 М, 1,0 М и 2,0 М NaOH соответственно, а степень дезацетилирования хитозана – 81,1%, 64,8% и 74,1%. Степень ацетилирования, превышающая 100%, свидетельствует о содержании в хитине примесей.

1.4.8. Шершень *Vespa crabro*

Сначала образцы *V. crabro* (личинки, куколки и взрослые особи) были деминерализованы: каждый образец кипятили с обратным холодильником с 1 М раствором HCl в течение 6 ч при 50°C [98]. Деминерализованные образцы несколько раз отмывали на фильтре дистиллированной водой до нейтрального pH. При депротеинировании материю нагревали при 60°C в 1 М растворе NaOH в течение 16 ч. Экстракт фильтровали и несколько раз промывали дистиллированной водой до нейтрального pH. Выделенные образцы хитина были обесцвечены в растворе дистиллированной воды, метанола и хлороформа (4:2:1) при комнатной температуре для удаления пигментов и жиров. После фильтрации образцы отмывали в дистиллированной воде и сушили при 50°C в течение недели. Выход хитина составил 2,2, 6,2 и 10,3% из личинок, куколок и взрослых насекомых соответственно, степень ацетилирования хитина – 109,1%, 127,5% и 108,8%. Степень ацетилирования полученных образцов хитина, рассчитанная по эмпирической формуле на основе данных элементного анализа, превышала

теоретически возможные 100%. Это свидетельствует о наличии в них примесей не хитиновой природы.

1.4.9. Жук *Holotrichia parallela*

Измельченные в порошок сухие жуки деминерализовали 1 М раствором HCl в течение 30 мин при 100°C с промывкой дистиллированной водой до нейтрального pH [59]. Депротеинирование проводили, используя щелочную обработку 1 М раствором NaOH в течение 24 ч при 80°C, продукт промывали дистиллированной водой до нейтрального pH. Для обесцвечивания осадок дополнительно обрабатывали 1% раствором перманганата калия в течение часа. Наконец, слегка коричневый хитин промывали дистиллированной водой и сушили при 50°C в сухом тепловом стерилизаторе. Выход хитина составил 15%. Содержание золы в продукте – 2,2%, влаги – 7,1%, азота – 6,3%.

1.4.10. Колорадский жук *Leptinotarsa decemlineata*

Взрослые колорадские жуки и личинки были измельчены в порошок и высушены [99]. Высушенные образцы деминерализовали с использованием 2 М HCl в течение 2 ч при 65-75°C. Растворы фильтровали и промывали деионизированной водой. Депротеинирование осуществляли путем обработки 2 М NaOH в течение 16 ч при 80-90°C. Далее смесь была снова отфильтрована и промыта деионизированной водой. Отфильтрованные образцы хранились в растворе, содержащем хлороформ, метанол и воду (в соотношении 1:2:4) в течение 1 ч для обесцвечивания. Затем образцы были отфильтрованы, промыты дистиллированной водой и высушены при 60°C.

Образцы хитина, полученные из взрослых жуков и личинок, дезацетилировали путем обработки с 50% NaOH в течение 3 ч при 100°C, промывали деионизированной водой до нейтрального pH и высушивали в течение 24 ч при 40°C. Выход хитина из взрослых насекомых составил 20%, из личинок – 7%; хитозана – 72 и 67% соответственно. Средневязкостная молекулярная масса составила 2,72 кДа и 2,68 кДа соответственно.

1.4.11. Таракан *Periplaneta americana*

Стадию деминерализации проводили путем кипячения с обратным холодильником в 4 М растворе HCl в течение 2 ч при 75°C [100]. Затем смесь фильтровали и промывали дистиллированной водой до нейтрального pH. Для удаления протеинов фильтрат кипятили с обратным холодильником в 4 М растворе NaOH в течение 20 ч при 150°C. Затем смесь фильтровали и промывали дистиллированной водой до нейтрального pH. После этого экстракт перемешивали с раствором, содержащем воду, метанол и хлороформ (в соотношении 4:2:1) в течение 4 ч при 30°C. Экстракт фильтровали, снова промывали дистиллированной водой до нейтрального pH и сушили в печи в течение 2 дней при температуре 60°C.

Было установлено, что в крыльях *P. americana* содержится 18% хитина, в то время как содержание хитина в других частях организма составляло 13%.

Было замечено из литературных источников, что полученные продукты из насекомых, содержащие хитин или хитозан, в большинстве случаев называют хитином или хитозаном, без определения содержащихся в продуктах примесей. Это не гарантирует чистоту конечного продукта.

Заключение по обзору литературы

В литературном обзоре были рассмотрены насекомые в качестве нового источника для получения хитина, хитозана и их меланиновых комплексов.

Комплексообразование с хитозаном и его производными позволяет существенно усилить и расширить уникальные свойства меланинов, которые основаны на устойчивом свободнорадикальном состоянии этих пигментов. Хитин и хитозан являются биополимерами с рядом уникальных биологических свойств (радиопротекторы, антиоксиданты, бактерициды, фунгициды, хелаторы-комплексообразователи, гепатопротекторы и др.), дополняющих биологическую активность меланинов. Фото- и радиопротекторные свойства меланиновых пигментов, в сочетании с хитозаном, позволят получить композиты, обладающие новыми, усиленными биологическими свойствами, перспективными для практического применения.

Таким образом, можно сделать вывод, что получение и исследование хитина, хитозана и их меланиновых комплексов из насекомых является актуальной задачей с потенциальным спектром практических применений.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1. Объекты исследований, исходные материалы и химические реагенты

В качестве сырья в работе использовали:

- личинки 5-го возраста, кутикула куколок и подмор *H. illucens* (ООО «Энтопротэк», Россия);
- хитин креветки («Sigma-Aldrich», Германия);
- крабовый хитин (ООО «Биопрогресс», Россия);
- крабовый хитозан высокомолекулярный M_w 505 кДа, СДА 66% («Нерре», Германия).

В работе были использованы следующие коммерческие материалы:

- уксусная кислота («Fisher Chemical», Великобритания);
- соляная кислота (36%, ХЧ, ГОСТ 3118-77, «ЛенРеактив», Россия);
- натрия гидроксид («Fisher Chemical», Великобритания);
- азотная кислота (65,7%, ХЧ, «Химмед», Россия);
- фосфорная кислота (85%, ЧДА, «Химмед», Россия);
- диэтиловый эфир (ЧДА, «Кузбассоргхим», Россия);
- этанол (ХЧ, «Химмед», Россия);
- 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил («Sigma-Aldrich», Германия);
- нингидрин (ХЧ, «ЛенРеактив», Россия);
- однозамещенный фосфат натрия («Biochem», Франция);
- двузамещенный фосфат натрия (ЧДА, «ЛенРеактив», Россия);
- ацетонитрил (99,9%, «Panreac», Испания);
- ацетат натрия («Sigma-Aldrich», Германия);
- диализные трубки Spectra/Por Membrane с пределами пропускания 1000, 3500, 10000 и 14000 Да (Spectrum Laboratories Inc., США);
- картридж SEP-PAK C18 cartridge for rapid sample preparation («Millipore», США).

Хитозаназный препарат # 3-432.5, получен на основе штамма *P. verruculosum*, в геном которого клонирована хитозаназа Chi402 из *Myceliophthora thermophila* (18

семья гликозилгидролаз); хитиназный препарат # 3-458.1, получен на основе штамма *P. verruculosum*, в геном которого клонирована хитиназа Chi 418 *Trichoderma harzianum* (18 семья гликозил-гидролаз); а также хитиназный препарат # 3-544.Н, получен на основе штамма *P. verruculosum*, в геном которого клонирована хитиназа Chi426 (403) *M. thermophila* (18 семья гликозил-гидролаз) – любезно предоставленные «Лабораторией физико-химии ферментативной трансформации полимеров» Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

2.2 Лабораторное оборудование

- Пресс (RawMID, Россия);
- Электрическая плитка;
- Микроволновая печь МН-6346А («LG», Корея);
- УФ-спектрофотометр Shimadzu UV-1601 PC («Shimadzu», Япония);
- УФ-спектрофотометр Leki SS1207 UV («Mediora OY», Финляндия);
- Планшетный спектрофотометр Multiscan FC («Thermo Scientific», Финляндия);
- Спектрометр-радиометр «Quantulus 1220» («Perkin-Elmer», США);
- ИК-спектрометр 1420 («Perkin-Elmer», США);
- ПМР-спектрометр AMX 400 («Bruker», США);
- ЭПР-спектрометр EMX («Bruker», Германия);
- Охлаждающая ванна СВ 18-40 («Christ», Германия);
- Лиофильная сушка Alpha 1-4 LD («Christ», Германия);
- Весы аналитические ER-1821 («AND», Япония);
- Весы технические ЕК-610i («AND», Япония);
- Мембранный вакуумный насос KNF Lab Laboport («KNF», США);
- pH-метр HI 8314 («Hanna Instruments», Португалия);
- Магнитная мешалка («IKA», Германия);
- Магнитная мешалка с подогревом Heidolph MR Hei-Tec («Heidolph», Германия);
- Шейкер-инкубатор ES-20 («BioSan», Латвия);
- Шейкер для пробирок («Heidolph», Германия);

- Цифровой вискозиметр LVDV-I+ (Brookfield, США);
- Термостат («Huber», Германия);
- Центрифуга Sigma 4-16 K («Sigma», США);
- Центрифуга для микропробирок 5418 («Eppendorf», Германия);
- Кондуктометр Hanna Hi 8733 («Hanna Instruments», Румыния);
- Высокоэффективный жидкостной хроматограф S 2100 («Sykam», Германия) в комплекте с дегазатором K-5004 («Knauer», Германия), колоночным термостатом Jet Stream+ («Knauer», Германия) и рефлектометрическим детектором RI Detector K-2301 («Knauer», Германия);
- Высокоэффективный жидкостной хроматограф (ВЭЖХ) LC-20 Prominence («Shimadzu», Япония);
- Анализатор размеров частиц и дзета-потенциала ZetaPlusZeta Potential Analyzer («Brookhaven Instruments», США);
- CHNS анализатор Carlo Erba EA 1108 («Isomass», Канада);
- Микроскоп Bresser LCD MICRO 5MP («Bresser», Германия);
- Косметический аппарат для диагностики кожи и волос EH-900U («Auro», Китай).

2.3. Методы исследования

2.3.1. Технологические стадии

3000 г личинок *H. illucens* 5-го возраста были бланшированы. Личинки прошли обработку через пресс, в результате чего была удалена большая часть липидов, протеина и влаги. Затем обработанные таким образом личинки лиофильно высушивали и хранили в герметичных условиях. Полученный продукт содержал примерно 6% жира, 7% золы. Выход продукта составил 250 г (8%).

Получение аморфного хитина и его коллоидного раствора из личинок

К 25 г оболочек личинок добавляли 100 мл 85% раствора H_3PO_4 и оставляли на 16 ч при комнатной температуре. Реакционную массу фильтровали через стеклянный пористый фильтр, осадок промывали 50 мл 40% раствора H_3PO_4 . Растворенный хитин высаживали добавлением 2 л дистиллированной воды при перемешивании. Хитин отмывали от избытка щелочи дистиллированной водой с

помощью декантации до нейтрального pH. Полученную суспензию хитина лиофильно сушили. В результате было получено 1,75 г аморфного хитина (7%). Для получения коллоидного раствора высушивали лиофильно аликвоту (10 мл) для определения содержания хитина в суспензии. Оставшуюся суспензию разбавляли дистиллированной водой до конечной концентрации 10 мг хитина на 1 мл раствора. Аналогичным образом получали аморфный хитин и его коллоидный раствор из кристаллического крабового хитина.

Дезацетилирование аморфного хитина из личинок

К 1,0 г полученного аморфного хитина добавляли 15 мл 50% (в/об) NaOH. Реакцию проводили на водяной бане при 100°C в течение 1 ч с перемешиванием. После этого реакционную смесь разбавляли водой до 75 мл. Для удаления избытка щелочи использовали катионную ионообменную смолу Amberlite IRC-50 (Sigma, США) до pH 10, чтобы не допустить сорбции хитозана на смоле, так как это значение превышает изоэлектрическую точку глюкозамина. Затем остатки щелочи удаляли с помощью диализа в Spectra/Por Membrane MWCO:3,500 и лиофильно высушивали. Было получено 0,32 г хитозана (32%).

Получение кристаллического хитина из личинок

Деминерализация: к 100 г оболочек личинок добавляли 1 л 1% HCl и перемешивали 2 ч при комнатной температуре. После этого твердый остаток отделяли на пористом стеклянном фильтре. Затем промывали дистиллированной водой до нейтральных значений pH и высушивали в сушильном шкафу. Было получено 49,2 г материи (49%). Высушенную деминерализованную материю просеивали на ситах с диаметром отверстий 2 мм и работали с более крупной фракцией. Выход составил 44,9 г (45%).

Депротеинирование и обезжиривание: к 24 г деминерализованной биомассы добавляли 320 мл 30% (в/в) NaOH, выдерживали при комнатной температуре 30 мин и проводили реакцию на водяной бане в течение 2 ч при 100°C при перемешивании. Полученный хитин отделяли на пористом стеклянном фильтре, промывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH и высушивали в сушильном шкафу. Выход составил 4,8 г (20%).

Получение высокомолекулярного хитозана из личинок

Дезацетилирование: проводили с использованием 320 мл 50% (в/в) NaOH. Щелочной раствор добавляли к 8 г хитина и оставляли при комнатной температуре на 30 мин. Реакцию проводили при 100°C водяной бане в течение 2 ч, перемешивая. Реакционную массу охлаждали, осадок отделяли на пористом стеклянном фильтре, промывали водой до нейтрального pH и высушивали в сушильном шкафу. Выход составил 6,5 г (81%).

Очистка: 6,5 г хитозана растворяли в 650 мл 1% CH₃COOH. Раствор фильтровали на пористом стеклянном фильтре. Затем к раствору добавляли 1 М NaOH до pH 10. Суспензию хитозана диализовали против дистиллированной воды в Spectra/Por Dialysis Tubular Membrane MWCO:10,000 и лиофильно высушивали. Было получено 6,2 г хитозана (95%). Осадок собирали, высушивали и взвешивали. Выход осадка составил 0,26 г (4%).

Получение хитин-меланиновых комплексов из кутикул куколок

Деминерализация: к 100 г кутикул куколок добавляли 1 л 1% HCl и перемешивали 2 ч при 20°C. После этого твердый остаток отделяли на пористом стеклянном фильтре. Затем промывали дистиллированной водой до нейтральных значений pH и лиофильно высушивали. Было получено 74 г материи (74%).

Депротеинирование и обезжиривание: к 30 г деминерализованной биомассы добавляли 300 мл 30% (в/в) NaOH и проводили реакцию на водяной бане в течение 2 ч при 100°C при перемешивании. Полученный твердый остаток отделяли на пористом стеклянном фильтре, промывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH и лиофильно сушили. Выход составлял 9 г (30%).

Получение хитозан-меланиновых комплексов из кутикул куколок

Дезацетилирование проводили с использованием 80 мл 50% (в/в) NaOH. Щелочной раствор добавляли к 4 г хитин-меланинового комплекса и оставляли при комнатной температуре на 30 мин. Реакцию проводили при 100°C на водяной бане в течение 2 ч, перемешивая. Суспензию охлаждали, осадок отделяли на пористом стеклянном фильтре, промывали дистиллированной водой до нейтрального pH и лиофильно сушили. Было получено 3,8 г хитозан-меланинового комплекса (95%).

Получение хитин-меланиновых комплексов из подмора

Обезжиривание: проводили в Аппарате Сокслета с использованием $(C_2H_5)_2O$.

Деминерализация: к 100 г подмора добавляли 1 л 1% HCl и перемешивали 2 ч при 20°C. После этого твердый остаток отделяли на пористом стеклянном фильтре. Затем промывали дистиллированной водой до нейтральных значений pH и лиофильно высушивали. Было получено 87 г материи (87%).

Депротеинирование: к 30 г деминерализованной биомассы добавляли 300 мл 30% (в/в) NaOH и проводили реакцию на водяной бане в течение 2 ч при 100°C при перемешивании. Полученный твердый остаток отделяли на пористом стеклянном фильтре, промывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH и лиофильно сушили. Выход составлял 2,7 г (9%). Полученные комплексы разделяли на различные фракции – более 5 мм, 2-5 мм и менее 2 мм.

Получение хитозан-меланиновых комплексов из подмора

Деацетилирование проводили с использованием 160 мл 50% (в/в) NaOH. Щелочной раствор добавляли к 4 г хитин-меланинового комплекса и оставляли при комнатной температуре на 30 мин. Реакцию проводили при 100°C на водяной бане в течение 2 ч, перемешивая. Суспензию охлаждали, осадок отделяли на пористом стеклянном фильтре, промывали дистиллированной водой до нейтрального pH и лиофильно сушили. Было получено 3,6 г хитозан-меланинового комплекса (90%).

Получение водорастворимого хитозан-меланинового комплекса

3,3 г комплекса растворяли в 400 мл 0,5% CH_3COOH и оставляли на ночь при 20°C. Затем отфильтровывали нерастворимую материю. Раствор диализовали против воды в Spectra/Por Membrane MWCO:14000 для удаления избыточных солей и лиофильно высушивали. Получали 2,7 г конечного продукта (выход = 80%).

Кислотный гидролиз

Кислотный гидролиз проводили по разработанной и запатентованной в лаборатории инженерии биополимеров ФИЦ Биотехнологии РАН методике [101]. К 0,9 г хитозана, полученного из личинок, с M_w 570 кДа и СДА 91% добавляли 20 мл смеси 65,7% азотной кислоты и дистиллированной воды в соотношениях 1:19, 2:18, 3:17, 4:16 и 5:15. Реакционную массу перемешивали в течение 7 ч при 70°C,

далее смесь оставляли на ночь при комнатной температуре. Образовавшийся осадок отфильтровывали на стеклянном фильтре №4 и суспендировали в 40 мл дистиллированной воды. Далее суспензию нагревали на водяной бане до полного растворения (70-80°C) и пропускали через стеклянный фильтр №4 для удаления механических примесей. Хитозан высаживали из раствора, используя 5% (в/об) NaOH. Затем суспензию хитозана диализовали против воды в Spectra/Por Membrane MWCO:14,000 и лиофильно высушивали. Было получено 0,14, 0,46, 0,55, 0,56 и 0,54 г (15, 51, 61, 63 и 60%) низкомолекулярного хитозана для соотношений 1:19, 2:18, 3:17, 4:16 и 5:15 (кислота:вода) соответственно. В полученных образцах хитозана определяли M_w и СДА.

Ферментативный гидролиз

Гидролиз хитозанов из краба (M_w 505 кДа, СДА 66%) и черной львинки (M_w 502 кДа, СДА 88%) проводили ферментными хитиназными и хитозаназными препаратами.

Препараты:

- 1) #3-432.5 Chi 402 – Хитозаназа *Myceliophthora thermophila*, 18 семья;
- 2) #3-458.1 Chi 418 – Хитиназа *Trichoderma harzianum*, 18 семья;
- 3) #3-544.H Chi 426 (403) – Хитиназа *M. thermophila*, 18 семья.

Субстраты:

- 1) Хитозан из краба, 10 г/л, pH 5,0 (0,1 М натрий-ацетатный буфер);
- 2) Хитозан из львинки, 10 г/л, pH 5,0 (0,1 М натрий-ацетатный буфер).

Условия гидролиза:

Гидролиз проводили в стеклянных стаканах на 50 мл при 40°C, pH 5 и постоянном перемешивании 250 об/мин на приборе Environmental Shaker Incubator ES-20.

Исходный объем реакционной смеси составлял 30 мл. Реакционная смесь содержала хитозан (10 г/л) и ферментный препарат (дозировка 5 мг белка на 1 г субстрата). Отдельно ставили холостой опыт без добавления фермента.

В ходе гидролиза (через 1, 2, 6, 24 и 48 ч) из реакционной смеси отбирали пробы объемом 10 мл и кипятили в фальконах (на 15 мл) 10 мин для остановки реакции.

Глубину гидролиза определяли по накоплению восстанавливающих сахаров методом Шомоди-Нельсона [102,103].

Очистку растворов хитозана после гидролиза проводили с использованием картриджа SEP-PAK C₁₈ cartridge for rapid sample preparation. После инкубации раствор пропускали через катридж и промывали 50 мл воды. Затем объединяли пропущенные растворы и промывку. Катриджи регенерировали промыванием 20 мл 60% ацетонитрила и 20 мл воды. Добавляли 5% (в/в) NaOH до pH 9,5-10, диализовали против воды в Spectra/Por Membrane MWCO:1,000, лиофильно высушивали и определяли M_w.

2.3.2. Методы анализа

2.3.2.1. Физико-химические методы

Массовую долю золы определяли гравиметрически после сжигания образца (0,5-6,0 г) в муфельной печи при 650°C в течение не менее 4 ч. Значение золы рассчитывали как отношение массы остатка к массе образца по следующему уравнению (1):

$$\% \text{золы} = \left(\frac{m_2}{m_1} \right) \times 100, \quad (1)$$

где m_1 и m_2 – массы исходного образца и остатка, соответственно [104].

Определение **массовой доли жира** в образце проводили в аппарате Сокслета. Массовую долю жира в образце вычисляли по формуле (2):

$$\% \text{жира} = \left(\frac{m_1 - m_2}{m_1} \right) \times 100, \quad (2)$$

где m_1 – исходная масса образца, m_2 – масса образца после растворения в диэтиловом эфире.

Степень дезацетилирования хитозана определяли методом кондуктометрического титрования [105]. Для этого навеску образца хитозана (50-100 мг), предварительно высушенную до постоянного веса в микроволновой печи, суспендировали в 5 мл 0,1 н HCl и 25 мл дистиллированной воды. Полученный

раствор титровали 0,1 М NaOH, добавляя его порциями по 0,1 мл через каждые 30 с, при постоянном перемешивании. Количество щелочи в мл, необходимое для титрования свободных аминогрупп, определяли из графика зависимости электропроводности раствора от объема щелочи, рассчитывая «плато» на двоякоизломанной кривой титрования. Расчет СДА вели по формуле (3):

$$\% \text{СДА} = \frac{M_x \times V \times N}{p + (M_x - M_{xm}) \times V \times N} \times 100\% = \frac{203 \times V \times N}{p + 42 \times V \times N} \times 100\%, \quad (3)$$

где M_x – молекулярная масса звена хитина;

M_{xm} – молекулярная масса звена хитозана;

V – разница объемов NaOH («плато»), определяемая из графика, мл;

N – нормальность NaOH;

p – навеска хитозана, мг.

Измерение динамической вязкости растворов хитозана и хитозан-меланинового комплекса проводили в цифровом вискозиметре по ГОСТ 1929-97 при 25°C. В его основе лежит стандартный принцип ротационной вискозиметрии: измерение вязкости осуществляется посредством пересчета крутящего момента, необходимого для вращения шпинделя прибора с постоянной скоростью при погружении его в исследуемую среду.

Измерение размера частиц хитозана и хитозан-меланиновых комплексов проводилось методом динамического светорассеяния с использованием анализатора ZetaPlus Zeta Potential Analyzer. Анализ автокорреляционной функции производился в приближении сферических частиц, результат усреднялся по 10 измерениям. Измерения размеров частиц проводилось в пластиковых кюветах с сечением 1×1 см.

Измерение электрофоретической подвижности и дзета-потенциала хитозана и хитозан-меланинового комплекса проводилось с использованием анализатора ZetaPlus Zeta Potential Analyzer методом лазерного микроэлектрофореза. Результат усреднялся по 10 измерениям. Измерения проводились в пластиковых кюветах с сечением 1×1 см.

Измерение содержания **свободных аминокрупп** в хитине проводили реакцией с нингидрином, по методу, описанному в работе [106].

Определение **общего содержания аминокислот** (свободных и связанных) проводили методом ионообменной хроматографии с постколоночной дериватизацией проб нингидрином. Для подготовки проб использовали кислотный гидролиз (за исключением триптофана) в растворе 6 М HCl, с добавлением норлейцина в качестве внутреннего стандарта. Гидролиз выполняли при 110°C в течение 24 ч. Для определения цистина и метионина пробы окисляли 50% раствором надмуравьиной кислоты (HCOOH).

Для определения триптофана использовали щелочной гидролиз в растворе Ba(OH)₂, с добавлением норлейцина в качестве внутреннего стандарта при 110°C в течении 20 ч.

Анализ выполняли на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии, с реакционным модулем для пост-колоночной дериватизации нингидрином АРМ-1000 («Sevko&Co», Россия), оснащенный абсорбционным детектором ($\lambda_{\text{abs}} = 440 \text{ нм}, 570 \text{ нм}$) и колонкой с ионообменной смолой 4,6 x 150 мм («Sevko&Co», Россия). Использовали готовые буферные растворы («Sevko&Co», Россия).

Расчет концентрации выполняли по стандартному образцу аминокислот (Sykam, Германия).

Определение **элементного состава** проводили стандартным методом путем термического разложения веществ [107]. Содержание азота измеряли после разложения при 380°C в присутствии сульфата ртути. Определение содержания С и Н проводили путем сжигания образцов в токе кислорода с последующим вымораживанием образующихся углекислого газа и воды. Определение проводили на CHNS анализаторе. Погрешность измерения составляла 0,3%.

Активность ферментных препаратов хитиназы и хитозаназы по отношению к коллоидному раствору хитина определяли при концентрации субстрата 10 г/л при 50°C и pH 5,0, время реакции составило 30 мин. Одна единица активности соответствует образованию 1 мкмоль продукта за 1 мин при действии

ферментного препарата на соответствующий субстрат. В качестве продуктов определяли восстанавливающие сахара методом Шомоди-Нельсона [102,103].

Молекулярную массу хитозана определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Средневесовую молекулярную массу, среднечисловую молекулярную массу и значения полидисперсности полученных хитозанов определяли при температуре 30°C использованием колонки PSS NOVEMA Max analytical 1000 A («PSS», Германия), в системе 0,1 М NH₄ 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_w =342, 1260, 6600, 9900, 23000, 48800, 113000, 200000, 348000 и 805000 Да) («PSS», Германия).

ИК-спектры регистрировали на спектрометре в диапазоне частот 4000-400 см⁻¹.

Протонные спектры хитозана регистрировали на спектрометре с рабочей частотой по протону 400 МГц при температуре 32°C. Образцы были приготовлены в дейтерированной воде. В качестве стандарта использовали 4,4-диметил-4-силапентан-сульфоновую кислоту. Сигнал растворителя подавляли селективными импульсами с использованием градиентов. Для расчета степени дезацетилирования использовали формулы расчета из работы [108].

Исследование электронного парамагнитного резонанса проводили на ЭПР спектрометре. 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 (СВЧ) 0,2 мВт; постоянная времени 100 мс. Контрольный образец ультрадисперсионного алмаза (УДА) № 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. ДОФА-меланин был получен в результате окислительной полимеризации диоксифенилаланина в слабощелочной среде и очищен по методике [109].

Альфа- и бета-радиометрические измерения осуществляли на спектрометре-радиометре с использованием стандартных безкалиевых кювет и жидкого сцинтиллятора «HiSafe 3» («Perkin-Elmer», США) [110].

2.3.2.2. Изучение физико-химических и биологических свойств полученных веществ

Сорбцию радионуклидов сорбентом, являющимся полимерным хитин-меланиновым комплексом из подмора *H. illucens* с размером частиц 2-5 мм, проводили в статических условиях. Концентрация ^{233}U , ^{90}Sr в экспериментах составляла 10^{-5} моль/л.

Эксперименты по сорбции проводили путем непрерывного перемешивания навески сорбента с раствором заданной концентрации, содержащим радионуклиды, в течение необходимого времени при постоянном контроле pH раствора. Соотношение V/m находилось в диапазоне 100-1000. Разделение сорбента и раствора осуществляли центрифугированием. Для удаления следов раствора сорбент промывали водным раствором, подкисленным до pH 5. Содержание радионуклидов в сорбенте определяли по изменению активности исследуемого раствора до и после сорбции. Для этого из раствора отбирали пробы объёмом 1 мл, которые подвергали α , β радиометрическому анализу.

Коэффициенты распределения (K_d) рассчитывали по формуле (4):

$$K_d = \frac{(C_0 - C) \times V}{C \times m} = \frac{(A_0 - A) \times V}{A \times m}, \quad (4)$$

где C_0 – исходная концентрация раствора, моль/л;

C – концентрация анализируемого раствора после сорбции, моль/л;

V – объём анализируемого раствора, мл;

m – масса сухого сорбента, г;

A_0 – исходная активность раствора радионуклида, Бк;

A – активность раствора после сорбции, Бк.

Фотопротекторную активность хитозана, меланина и хитозан-меланинового комплекса, выделенных из *H. illucens*, оценивали методом абсорбционной спектроскопии. Был изучен весь спектр УФ-излучения, включая длины волн УФ-А, УФ-В и УФ-С, от 160 до 390 нм. Концентрация образцов по отношению к меланину была равна 5 мг/мл.

Антиоксидантная активность образцов хитозана, меланина, хитозан-меланинового комплекса *H. illucens* и крабового хитозана исследовалась по методу [111]. В качестве метода оценки антиоксидантной активности использовалась колориметрия свободных радикалов, основанная на реакции 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ), растворенного в этаноле, с образцом антиоксиданта.

В результате восстановления ДФПГ антиоксидантом снижается пурпурно-синяя окраска ДФПГ в этаноле, а реакция контролируется по изменению оптической плотности обычными методами спектрометрии.

Экстракцию меланина проводили по методике [91] осаждением концентрированной соляной кислотой. Полученный меланин лиофилизировали. 1 мл исследуемых образцов различной концентрации (0, 0,125, 0,25, 0,5 и 1 мг/мл) добавляли к 4 мл 0,2 мМ раствора ДФПГ в абсолютном этиловом спирте (99,9%). Смесь выдерживали при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин. Поглощение остаточного радикала ДФПГ измеряли против дистиллированной воды при 517 нм. Измерения для каждой концентрации образца проводились в трех повторностях, и эффект улавливания рассчитывался по следующему уравнению (5):

$$\text{Поглощение радикалов ДФПГ(\%)} = \left[\frac{A_c - A_s}{A_c} \right] \times 100, \quad (5)$$

где A_c и A_s – значения оптической плотности для контрольного и испытуемого раствора соответственно.

Определение антибактериальной активности

Опыт проводился по методике, представленной в статье [112]. Использовались штаммы *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Staphylococcus epidermidis* 33 GISK, депонированные в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ) Федерального государственного бюджетного учреждения “Научный центр экспертизы лекарственных средств” Министерства здравоохранения Российской Федерации. Бактериальные культуры культивировали в среде LA при температуре 4°C. Для приготовления инокулята единичную бактериальную колонию переносили в 20 мл среды бульон LB и

инкубировали в течение 18 ч при 37°C на качалке при 150 об/мин. Минимальную ингибирующую концентрацию низкомолекулярных образцов хитозана определяли путем последовательных разведений в жидкой среде. Опыт проводили в 96-луночной пластине с закругленным дном. Хитозан растворяли в 0,5%-ной уксусной кислоте в концентрации 1 мг/мл. Для определения концентрационной зависимости делали серию двукратных разведений, диапазон концентраций составил 3,9–500 мкг хитозана/мл среды. В итоге, микробная нагрузка составляла 10^5 клеток/мл. Стерильная питательная среда (контроль чистоты среды), суспензия тест-культур в жидкой питательной среде без хитозана (контроль роста) и 0,5% уксусная кислота (растворитель хитозана) были экспериментальными контролями. Планшеты инкубировали в течение 24 ч при 36°C. Результаты оценивали визуально, сравнивая рост культуры в присутствии препарата с “отрицательным контролем”, содержащим инокулят. Минимальная концентрация вещества, которая полностью подавляла рост культуры, была определена как минимальная ингибирующая концентрация (МИК).

Проводился анализ влияния M_w на антибактериальную активность хитозана. Характеристики субстратов, полученных после ферментативного гидролиза и применяемых в методе, приведены в Табл. 2.

Табл. 2. Субстраты, используемые в опыте: хитозан из личинок *H. illucens* (Хтз), хитозан из панциря краба (Хтз (кр)).

Шифр	Образец	M_w , кДа	Фермент
1	Хтз	6,86	# 3-432.5 Chi 402 – Хитозаназа <i>M. thermophila</i>
2	Хтз (кр)	6,78	
3	Хтз	21,36	
4	Хтз (кр)	16,15	
5	Хтз	19,64	# 3-544.H Chi 426(403) – Хитиназа <i>M. thermophila</i>
6	Хтз (кр)	10,66	

Определение метаболической активности

Эксперимент проводился по методике, описанной в статье [113]. В опытах по определению метаболической активности использовали грибы *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* ВКМ F-1182. Штаммы грибов хранили на среде КГА. Исследуемыми пробами хитозанов послужили те же образцы, представленные в Табл. 2.

Метаболическую активность грибов при добавлении в питательную среду образцов хитозана исследовали в жидкой среде КГА при pH 5,5–5,7 с использованием модифицированного тетразолиевого метода (МТТ-тест). Опыт проводили в 96-луночном планшете с плоским дном. Для получения конидий в пробирку с семисуточными культурами на картофельно-глюкозном агаре вносили 10 мл жидкой питательной среды и готовили суспензию, содержащую конидии и мицелий гриба. Суспензию фильтровали через стерильную вату для удаления остатков мицелия. Хитозан растворяли в 0,5%-ной уксусной кислоте в концентрации 15 мг/мл. Для определения концентрационной зависимости делали серию двукратных разведений, диапазон концентраций составил 0,234–1,875 мг хитозана/мл среды. Добавляли суспензию конидий в питательной среде, при этом концентрация конидий в лунке составляла $2,5 \times 10^4$ конидий/мл. Культуры выращивали 24 ч при 25°C. Затем в каждую лунку добавляли по 10 мкл раствора хлорида йодонитротетразолия (10 мг/мл красителя, растворенного в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4) в присутствии 4 мг/мл 1-метокси-феназин-метосульфата и инкубировали в течение 4 ч при 37°C. Затем удаляли надосадочную жидкость, после чего кристаллы формазана растворяли в 150 мкл ДМСО в течение 16 ч при 37°C при перемешивании (100 об/мин). После, измеряли оптическую плотность при 530 нм на планшетном спектрофотометре. Данные представляли в виде МА, подсчитанной по формуле (6):

$$МА = \frac{ОП_{опыта}}{ОП_{контроля}} \times 100\%, \quad (6)$$

где ОП_{опыта} и ОП_{контроля} среднеарифметическая величина показаний оптической плотности в опытном и контрольном образцах, соответственно.

Считается, что вещество ингибирует МА фитопатогенов, если МА составляет не более 50%.

2.3.2.3. Получение и исследование кремов с хитозан-меланиновым комплексом

Получение крема

Эмульсионные системы масло/вода готовились способом «горячий/горячий». В отдельном стакане смешивались компоненты масляной фазы и нагревались до 75-80°C до получения однородного расплава. В другом стакане в расчетном количестве воды изначально растворялся хитозан-меланиновый комплекс, затем добавлялись остальные компоненты водной фазы. Она нагревалась до этой же температуры +5°C. Стакан с масляной фазой помещался на мешалку с подогревом и устанавливался на смеситель. При перемешивании добавлялась водная фаза. Перемешивание проводилось верхнеприводной мешалкой при 1100 об/мин около 10 мин. В процессе перемешивания эмульсионная система охлаждалась. После охлаждения добавляли отдушку и консервант.

Определение водородного показателя pH

Водородный показатель pH является практически значимым параметром косметических композиций. Измерение pH кремов проводилось потенциометрическим методом на pH метре в соответствии с ГОСТ 31460-2012.

Готовился водный раствор с содержанием 10% масс. крема, в который опускался электрод pH-метра. Значение pH фиксировалось по индикатору прибора.

Определение коллоидной стабильности

Метод основан на делении эмульсии на жировую и водную фазы при центрифугировании [114]. Две пробирки заполнялись на 2/3 объема анализируемой эмульсией и взвешивались. Результат записывался до второго десятичного знака. Разница массы пробирок вместе с эмульсией не должна превысить 0,2 г. Пробирки ставились в водяную баню на 20 мин при температуре 42-45°C, далее вынимались, сухо вытирались с наружной стороны и ставились в гнезда центрифуги. Центрифугирование выполнялось в течение 5 мин при частоте вращения 100 с⁻¹, после чего визуально устанавливалась стабильность композиции. Эмульсия

стабильная, если после центрифугирования в пробирках замечено выделение не больше капли водной фазы или не больше 0,5 см слоя масляной фазы.

Определение термостабильности крема

Метод основан на разделении эмульсии на жировую и водную фазы при повышенной температуре [114]. Три пробирки диаметром 14 мм высотой 120 (100) мм вместительностью 25 см³ заполнялись на 2/3 объема апробируемой эмульсией, наблюдая за тем, чтобы в эмульсии не было пузырьков воздуха, закрывались пробками и помещались в термостат с температурой 40-42°C. Эмульсии находились в термостате 24 ч, после чего устанавливалась стабильность. Эмульсию принимают стабильной, если после термостатирования в пробирках не отмечено выделения водной фазы, разрешается выделение слоя масляной фазы не больше 0,5 см.

Микроскопические исследования

Микроструктура крема изучалась методом оптической микроскопии на микроскопе Bresser LCD MICRO 5MP. В данном микроскопе присутствуют два источника освещения. Измерения можно проводить в трех режимах: в проходящем свете для прозрачных объектов; в отраженном свете для непрозрачных объектов; с участием двух источников освещения для наблюдения полупрозрачных объектов.

Небольшое количество крема помещалось на предметное стекло, а сверху на препарат располагалось покровное стекло. Эта система помещалась на предметный столик и фиксировалась держателем. Устанавливалась кратность окуляра. Получить увеличение в 100 раз дает объектив 10х, в 400 раз – объектив 40х. С помощью кнопки Snap можно сделать снимок полученного изображения.

Анализ параметров кожи

Параметры кожи после применения кремов с хитозан-меланиновым комплексом определялись с помощью косметического аппарата для диагностики кожи и волос EH-900U.

Косметический аппарат для диагностики кожи и волос EH-900U – многофункциональный прибор с всесторонними вспомогательными функциями. Все изображения можно перевести в формат 3D. Изображения можно

проанализировать также с произвольных углов. Прибор позволяет определить жирность, эластичность и влажность кожи.

Подбор оптимальных концентраций фотопротекторных компонентов

Для выявления оптимальных концентраций фотопротекторных компонентов, которые смогут обеспечить ожидаемое значение солнцезащитного фактора и совместимость с другими компонентами композиции, использовался инструмент моделирования Sunscreen Simulator BASF, который позволяет *in silico* вычислить защитную эффективность средства от загара в приближении к тонкопленочной модели. Данный алгоритм-имитатор солнцезащитного средства учитывает спектральные характеристики индивидуальных молекул-фильтров, а также возможную неравномерность защитного слоя для приближения к реальной ситуации практического применения.

Глава 3. Результаты и обсуждение¹

3.1. Получение и исследование хитина и хитозана из личинок *H. illucens*

3.1.1. Получение аморфного хитина и низкомолекулярного хитозана

Черная львинка *Hermetia illucens* является потенциальным источником хитина и хитозана. Однако в отличие от традиционных источников биополимеров (панцири ракообразных), данный объект исследования имеет ряд особенностей. Во-первых, высокое содержание жира (липидов), что требует предварительной стадии обезжиривания. Во-вторых, наличие пигментации на поздних стадиях онтогенеза, обусловленное меланином, ковалентно связанным с хитином. Полностью разрушить такой комплекс без деструкции хитина невозможно. Поэтому для получения хитина и хитозана необходимо использовать слабо пигментированное сырье, например, оболочки личинок черной львинки пятого возраста. Перечисленные особенности учитывались при разработке технологической схемы получения хитина, хитозана и их меланиновых комплексов из *H. illucens*.

Все ранее описанные в литературе способы получения хитина из личинок черной львинки направлены на последовательное удаление примесных компонентов из хитин-содержащего сырья [84,85]. Такой подход является многостадийным и не гарантирует получения чистого продукта. С целью преодоления перечисленных недостатков было предложено для получения хитина использование непосредственной экстракции целевого продукта. Известно, что хитин растворим в концентрированных минеральных кислотах, таких как соляная, серная, фосфорная и т.п. Тем не менее, это свойство биополимера ранее не

¹ В данной главе изложены результаты, опубликованные в следующих научных статьях автора:

1. **Хайрова А.Ш.**, Лопатин С.А., Сеницына О.А., Сеницын А.П., Варламов В.П. Получение хитина из черной львинки *Hermetia illucens* путем прямой экстракции // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. №3 (2). С. 84–88.
2. **Khayrova A.**, Lopatin S., Varlamov V. Black Soldier Fly *Hermetia illucens* as a Novel Source of Chitin and Chitosan // International Journal of Sciences. 2019. №8 (4). P. 81–86.
3. **Khayrova A.**, Lopatin S., Varlamov V. Obtaining Chitin/Chitosan-Melanin Complexes from Black Soldier Fly *Hermetia Illucens* // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 2020. №809 (1). P. 012020.
4. **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. №1942. P. 012003.
5. **Хайрова А.Ш.**, Лопатин С.А., Варламов В.П., Богданова С.А., Шигабиева Ю.А., Князев А.А. Хитозан-меланиновый полимерный комплекс – перспективный ингредиент эмульсионных композиций // Все материалы. Энциклопедический справочник. 2021. №10. С. 35–40.
6. **Khayrova A.**, Lopatin S., Shagdarova B., Sinitsyna O., Sinitsyn A., Varlamov V. Evaluation of Antibacterial and Antifungal Properties of Low Molecular Weight Chitosan Extracted from *Hermetia illucens* Relative to Crab Chitosan // Molecules. 2022. №27. P. 577.

применялось для его выделения из неочищенной материи. Для получения хитина использовали фосфорную кислоту, так как она, в отличие от соляной и серной, практически не деструктурирует хитин при его растворении. Предложенный способ получения хитина не требует стадии обезжиривания, которая осуществляется обработкой сырья органическими растворителями или раствором щелочи при высокой температуре. Кроме того, хитин, получаемый через стадию растворения, является не кристаллическим, а аморфным. На основе такого хитина можно получать коллоидные растворы, используемые, например, в качестве субстрата при определении хитиназной активности хитинолитических ферментов. Полученный продукт представляет собой белый порошок, нерастворимый в воде (Рис. 4). Оставшиеся после экстракции хитина фрагменты оболочек личинок после отмывки или нейтрализации фосфорной кислоты могут быть использованы в качестве кормовой добавки, а нейтрализованная фосфорная кислота в качестве удобрения.

Чистота получаемого хитина подтверждается данными элементного анализа, ИК-спектроскопии и титрованием свободных аминогрупп в сравнении с аналогичными параметрами переосажденного хитина из панциря краба. ИК-спектры (Рис. 5) практически идентичны, что подтверждает высокую чистоту полученного хитина.

Значения элементного анализа хитина, включая содержание углерода (С), азота (N), фосфора (P) и водорода (H) показаны в Табл. 3. Расчетные значения отличаются от теоретически рассчитанных. Однако необходимо учитывать, что биополимеры содержат 10-12% связанной воды. С учетом этой поправки полученные результаты попадают в допустимый интервал погрешности метода измерения.

Было установлено, что содержание свободных аминогрупп в полученном хитине составляет 4,0%, что совпадает с соответствующими значениями крабового хитина и хитина креветки. Также было определено суммарное содержание белка с помощью аминокислотного анализа (4,3%) (Табл. 4) и золы (3%). Однако, если

проводить экстракцию хитина из деминерализованного сырья, то содержание белка удастся снизить до 1%, а золы – до 0,2%.

Следует отметить, что при использовании необработанных через пресс личинок, как просто обездвиженных, так и высушенных с помощью СВЧ-печи, не происходит экстракции хитина. Это связано, скорее всего, с высоким содержанием жира в личинках, который препятствует взаимодействию фосфорной кислоты с клеточными стенками за счет гидрофобного отталкивания. Кроме того, была исследована возможность экстракции хитина фосфорной кислотой из подмора черной львинки. Было показано, что из такого сильно пигментированного сырья хитин экстрагировать не удастся. Это вероятно связано с тем, что в подморе хитин не находится в свободном состоянии, а прочно связан с меланином, и такой комплекс не растворим в кислоте.

Табл. 3. Данные элементного анализа аморфного хитина из *H. illucens*.

	%C	%H	%N	%P
Рассчитано	46,38	6,28	6,76	1,93
Найдено	41,84	6,74	5,96	1,67



Рис. 4. Фото сухих личинок *H. illucens* 5-го возраста (левый нижний угол) и полученного аморфного хитина (правый верхний угол).

Коллоидные растворы хитина чёрной львинки были использованы для определения активностей рекомбинантных ферментных препаратов, содержащих

хитиназы и хитозаназы, полученных при клонировании генов соответствующих ферментов с использованием реципиентного штамма *Penicillium verruculosum* (Табл. 5). Для сравнения был использован коллоидный крабовый хитин, полученный переосаждением кристаллического хитина.

Табл. 4. Данные аминокислотного анализа аморфного хитина из *H. illucens*.

Аминокислота	Содержание аминокислоты в образце, г/100 г
Аспарагиновая кислота (Asp+Asn)	0,47
Треонин (Thr)	0,17
Серин (Ser)	0,18
Глутаминовая кислота (Glu+Gln)	0,45
Глицин (Gly)	0,21
Аланин (Ala)	0,23
Цистин + цистеин (Cys)	0,07
Валин (Val)	0,33
Метионин (Me)t	0,05
Изолейцин (Ile)	0,31
Лейцин (Leu)	0,42
Тирозин (Tyr)	0,33
Фенилаланин (Phe)	0,18
Гистидин (His)	-
Лизин (Lys)	0,37
Аргинин (Arg)	0,19
Пролин (Pro)	0,34

$\Sigma = 4,3$ г

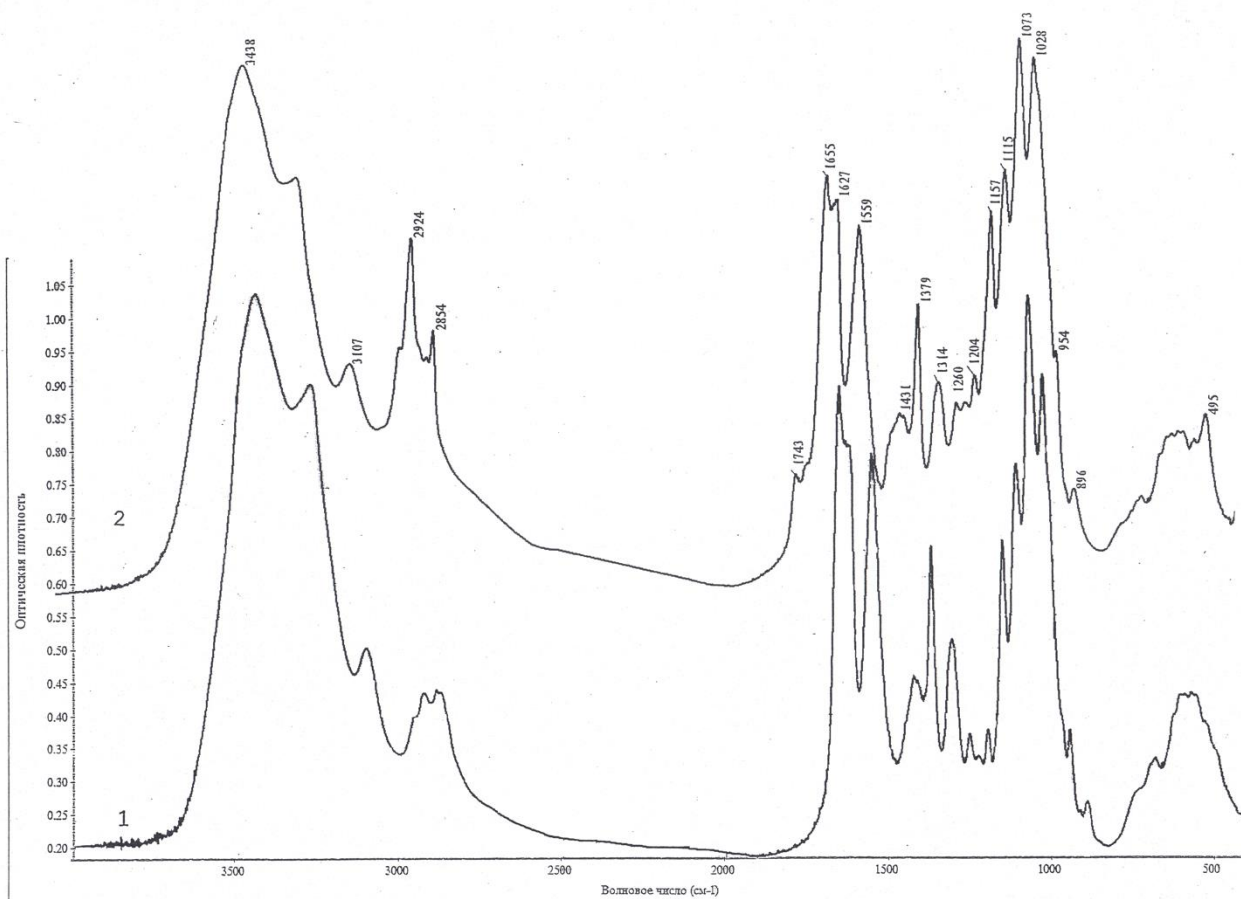


Рис. 5. ИК-спектры: 1 – переосажденного хитина из панциря краба, 2 - хитина, полученного из личинок черной львинки *Hermetia illucens*.

При концентрации обоих типов хитина в реакционной смеси 10 г/л измеряемая активность возрастала, причём в случае хитина чёрной львинки величина измеряемой активности была выше, чем для крабового хитина. Измеряемая хитозаназная активность с использованием хитина чёрной львинки была существенно выше, чем для крабового хитина. В целом полученные данные позволяют сделать вывод о возможности использования хитина чёрной львинки, полученного по разработанному методу, в качестве субстрата для определения активности хитинолитических ферментов; очевидно, что в дальнейшем требуется более детальное изучение нового субстрата с точки зрения определения различий в каталитических константах его ферментативной конверсии (максимальная скорость реакции V_m и Константа Михаэлиса K_m) по сравнению с крабовым хитином.

Табл. 5. Активность рекомбинантных ферментов, определённая с помощью коллоидного хитина краба и чёрной львинки (ед/г).

Фермент	Хитин краба (10 мг/мл)	Хитин <i>H. illucens</i> (10 мг/мл)
Хитиназа <i>M. thermophila</i>	240±10	710±20
Хитозаназа <i>M. thermophila</i>	26±1	330±10

Известно, что хитозан получают с помощью реакции дезацетилирования, которая включает удаление ацетильных групп из молекулы хитина. Поскольку структура аморфного хитина содержит ацетильные группы менее стерически затрудненные, чем в кристаллическом хитине, предполагалось, что эти функциональные группы могут быть удалены в более мягких условиях. Обработка хитина проводилась 10, 20, 30, 40 и 50% (в/об) растворами NaOH в течение часа при 100°C. По окончании реакции образцы промывали водой на пористом фильтре и высушивали. Оказалось, что в первых четырех случаях полученные вещества не растворялись в 1% уксусной кислоте, что говорит о том, что реакция дезацетилирования не проходила в полной мере.

После обработки 50% раствором NaOH полученная материя при промывке водой растворялась. Полученная материя имела растворимость в широком диапазоне pH, что свидетельствует о том, что полученный хитозан имеет степень дезацетилирования около 50%. Для того, чтобы его охарактеризовать, разработали схему его выделения. По данным ВЭЖХ в образце до диализа присутствовали два пика: первый соответствует $M_w \sim 13-18$ кДа, а индекс полидисперсности равен 1,3-1,5, а второй – $M_w \sim 370$ Да и I_p равен 1,1, что соответствует димеру хитозана. После проведения диализа большую часть низкомолекулярной фракции, по данным хроматографии, была удалена. Для сравнения были получены аморфные формы хитина из крабового хитина и хитина креветки, свободных от этих примесей, путем растворения в концентрированных фосфорной или соляной кислотах. Полученные образцы были гидролизованы в 50% (в/об) NaOH. СДА была определена с

помощью кондуктометрического титрования и ПМР. Найденная СДА была в диапазоне 42-47%, что соответствует точности этих методов определения.

Показано, что источник хитина и используемая кислота не влияют на характеристики конечного продукта. Таким образом, можно утверждать, что гидролиз хитина при дезацетилировании определяется его аморфным состоянием, т.е. отсутствием упорядоченности в его структуре.

3.1.2. Получение кристаллического хитина и высокомолекулярного хитозана

Принципиальная схема получения кристаллического хитина из личинок *H. illucens* достаточно стандартная и включает в себя стадии деминерализации и депротеинирования. После деминерализации сырье фракционировали на ситах и разделяли на различные фракции – более 5 мм, 2-5 мм и менее 2 мм. Количества хитина во фракциях определяли по отдельности: выход составлял 30, 14 и 2% соответственно. Это свидетельствует об очень низком содержании хитина в малой фракции, которая не подвергалась дальнейшей обработке ввиду экономической нецелесообразности, однако она может быть использована в качестве кормовой добавки. Как вещество хитин не охарактеризовывался и использовался для последующего получения хитозана. Для получения хитозана проводили стадию дезацетилирования уже с объединенным сырьем (более 5 и 2-5 мм).

После проведения стадий деминерализации, депротеинирования и дезацетилирования не удалось полностью удалить примеси. Полученная материя содержала около 4% нерастворимой в уксусной кислоте фракции. Вероятно, это свидетельствует о присутствии в экзо- и эпикутикулах насекомых связанного с хитином белка «кутикулина» [115] (Рис. 6). Исходя из литературных источников, кутикулин содержит жирный или восковой компонент и является более стойким и трудно гидролизуется при проведении реакции дезацетилирования. Было выявлено, что данный кутикулин не растворяется в концентрированной фосфорной кислоте и, следовательно, не может содержаться в получаемом по нашей методике аморфном хитине. Помимо этого, в районе рта личинок хитин (и в дальнейшем хитозан) находится в виде комплекса с меланином, что хорошо видно визуально, и

этот комплекс является нерастворимым в органических и минеральных кислотах. Вероятно, хитин-меланиновый комплекс является более твердым по сравнению с чистым хитином, что облегчает процесс перетирания пищи личинками. Во всяком случае, наличие пигментации в районе рта у личинок наблюдается с самого раннего возраста.

Полученный таким образом хитозан требует доочистки путем переосаждения из раствора в уксусной кислоте.

Полученный хитозан был охарактеризован с помощью ВЭЖХ. M_w была равна 480-570 кДа, а I_p – 1,6-2,1. СДА хитозана рассчитывали с использованием метода кондуктометрического титрования и ПМР (Рис. 7), и она составила 87-92%. При проведении повторной стадии деацетилирования удалось практически полностью удалить нерастворимые примеси (до 0,64%), при этом СДА повысилась до 97%, но M_w снизилась до 350 кДа.

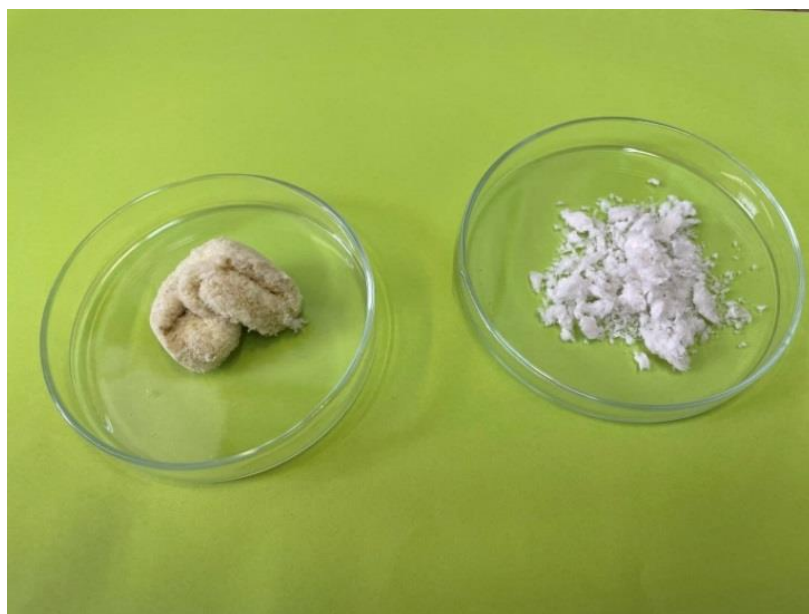


Рис. 6. Фото осадка «кутикулина» (слева) и переосажденного хитозана (справа).

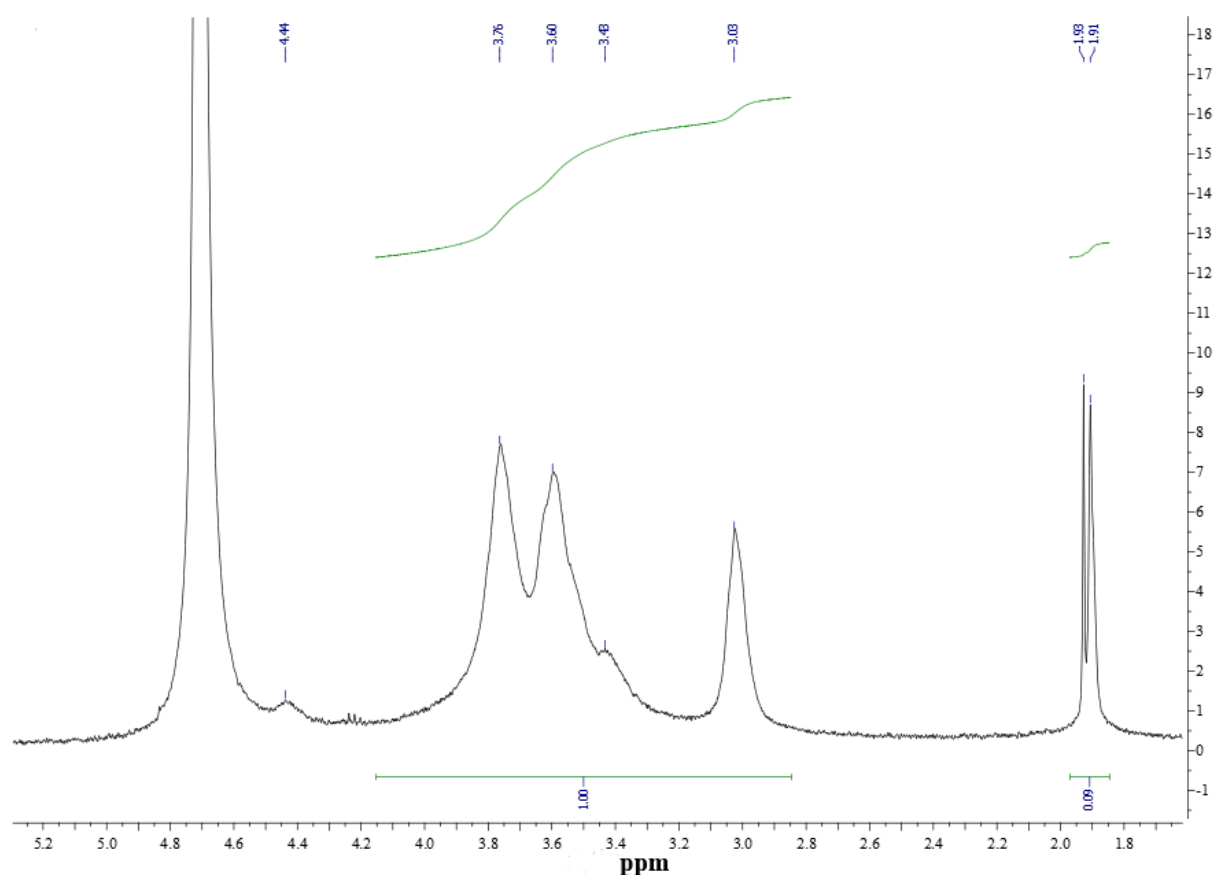


Рис. 7. ПМР спектр хитозана из личинок *H. illucens*.

3.1.3. Кислотный гидролиз

Известно, что чем ниже молекулярная масса хитозана, тем выше его растворимость в воде и тем легче адаптировать его свойства для желаемых областей применения. Было показано, что уменьшение M_w хитозана до 4-10 кДа увеличивает при этом все полезные свойства, такие как антимикробная и противоопухолевая активности, а также улучшение иммунитета у животных [116].

Проведение реакции гидролиза позволяет снизить молекулярную массу биополимера, улучшить растворимость и гомогенизировать хитозан по размеру, способствуя образованию более селективных и контролируемых комплексов [117]. Процесс гидролиза может быть запущен либо с использованием веществ (например, кислоты, ферменты, перекись водорода), либо с применением таких методов, как ультразвук и радиация [118]. Среди них наиболее широко используется кислотный гидролиз, поскольку это экономичный и простой процесс, который может применяться в большом количестве условий [119].

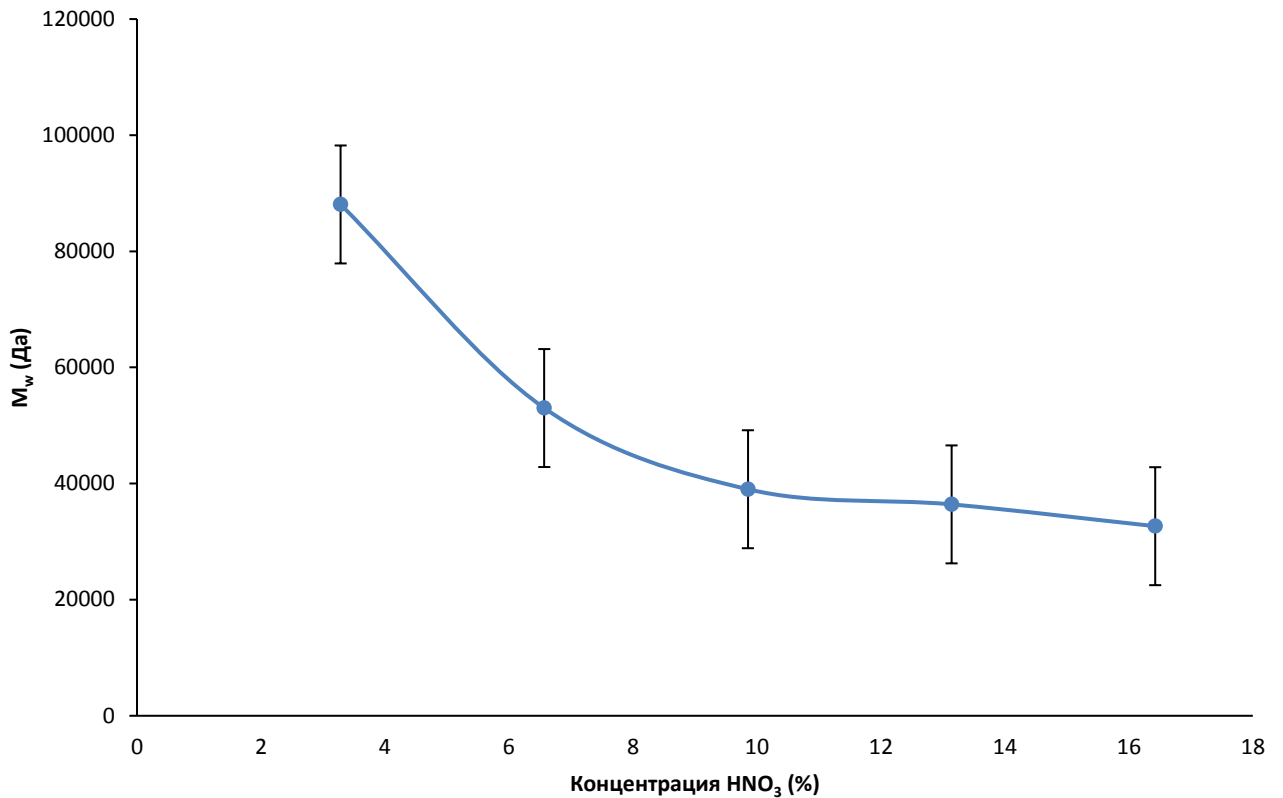


Рис. 8. Снижение молекулярной массы хитозана из личинок *H. illucens* при кислотном гидролизе.

Для проведения химического гидролиза хитозана, полученного из личинок черной львинки, применялась азотная кислота различной концентрации – 3,3, 6,6, 9,9, 13,1 и 16,4%. С увеличением концентрации кислоты происходило увеличение СДА: 92, 95, 97, 97 и 98% соответственно. Значения молекулярной массы сначала падают с увеличением концентрации азотной кислоты, но затем выходят на плато и не опускаются ниже 32 кДа, поэтому для получения хитозана с меньшими молекулярными массами применялся ферментативный гидролиз (Рис. 8).

3.1.4. Ферментативный гидролиз

Из-за жестких параметров процесса (рН и температура) химический гидролиз может привести к изменениям в продукте и оказывать негативное влияние на окружающую среду [120,121]. Ввиду этого, ферментативный гидролиз представляет потенциальную альтернативу, обеспечивая высокий выход продукции при относительно низкой стоимости. Кроме того, используются более мягкие условия процесса, и ферменты действуют более специфично по сравнению

с кислотами, облегчая контроль реакции, связанный со степенью полимеризации получаемых олигомеров, и уменьшая образование отходов [117]. Таким образом, использование ферментов может стать экологически чистой технологией, которая нацелена на постепенную замену промышленных химических процессов, минимизируя экологические проблемы и обеспечивая высокое качество получаемых продуктов [118,122,123].

Известно, что в природе хитин и хитозан разрушаются под действием таких специфических ферментов, как хитиназы, хитозаназы и глюкоаминидазы. Целью данного эксперимента являлось исследование продуктов гидролиза хитозана, выделенного из личинок *H. illucens*, в сравнении с гидролизатами крабового хитозана с помощью трех новых, созданных в результате совместной работы НИЛ Биотехнологии ферментов ФИЦ Биотехнологии РАН и НИЛ Физико-химии ферментативной трансформации полимеров Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова различных ферментных препаратов, обладающих хитинолитической активностью: хитозаназа *Myceliophthora thermophila*, хитиназа *Trichoderma harzianum* и хитиназа *M. thermophila*.

На Рис. 9 и 10 показано, что при обработке хитозанов из краба и мухи черная львинка ферментными препаратами хитозаназа *Myceliophthora thermophila* и хитиназа *M. thermophila* полученные гидролизаты имеют сопоставимые M_w , в то время как при гидролизе ферментным препаратом хитиназа *Trichoderma harzianum* полученные в одинаковых условиях хитозаны отличаются по M_w почти в 1,5 раза. Это подтверждает тот факт, что хитозаны из разных источников отличаются по своим свойствам, поэтому разработка способов получения хитозана из насекомых является актуальной задачей. Результаты анализа молекулярно-массовых характеристик гидролизатов хитозана показывают, что во всех случаях при данных соотношениях хитозана к ферменту уже за 24 ч инкубации ферментативные реакции выходят на плато, и дальнейшее термостатирование не приводит к заметным изменениям данных параметров.

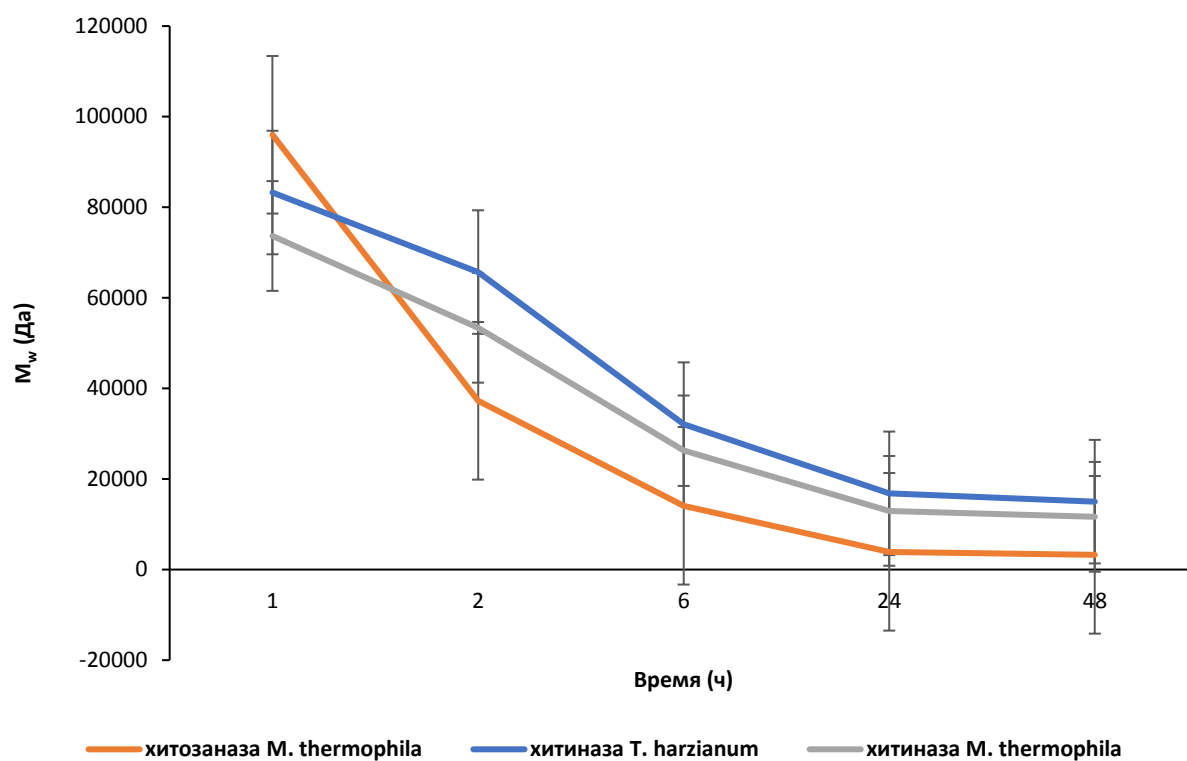


Рис. 9. Динамика ферментативного гидролиза хитозана из личинок *H. illucens*.

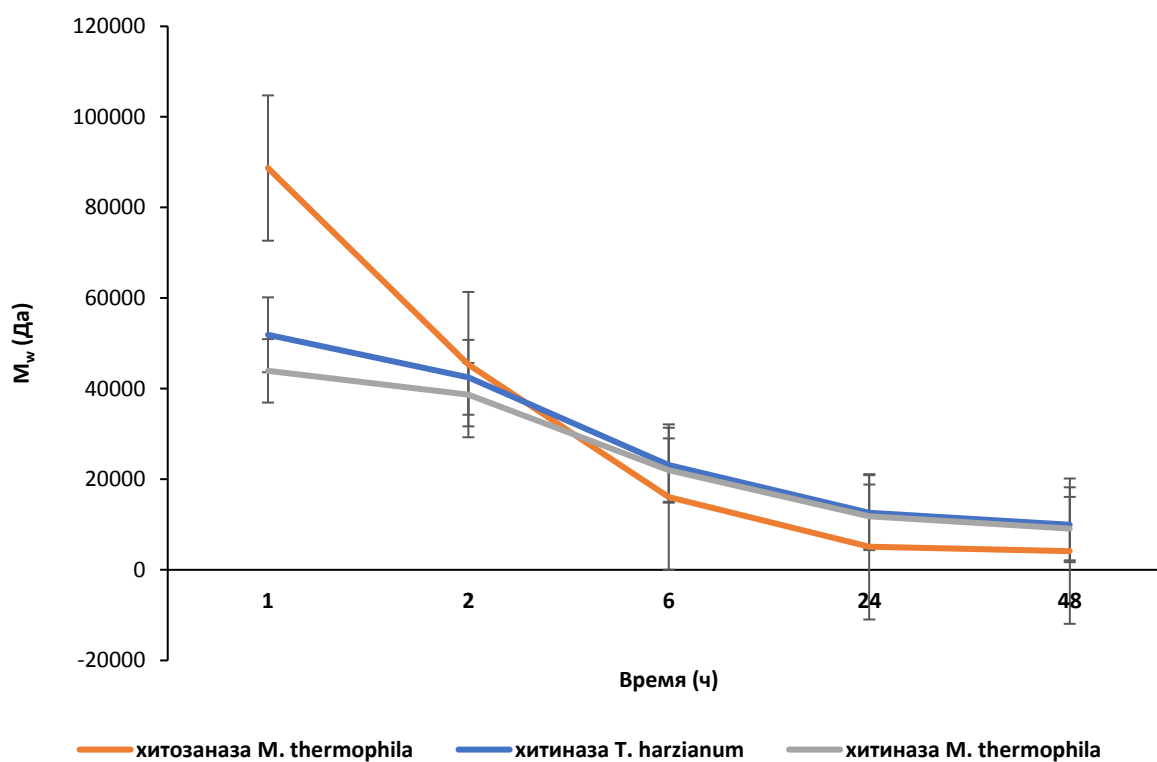


Рис. 10. Динамика ферментативного гидролиза крабового хитозана.

Таким образом, с помощью ферментативного гидролиза можно получать низкомолекулярные образцы хитозанов с заданными M_w (6-21 кДа), перспективные

для исследования их биологической активности. Чистота полученных олигохитозанов была подтверждена с помощью элементного (Табл. 6) и ПМР (Рис. 11) анализов.

Табл. 6. Данные элементного анализа деполимеризованных образцов хитозана, полученных из личинок *H. illucens* (6,86 кДа) и панцирей краба (6,78 кДа).

Источник	%C	%H	%N
Краб	39,48	6,91	6,67
<i>H. illucens</i>	41,28	6,87	7,09

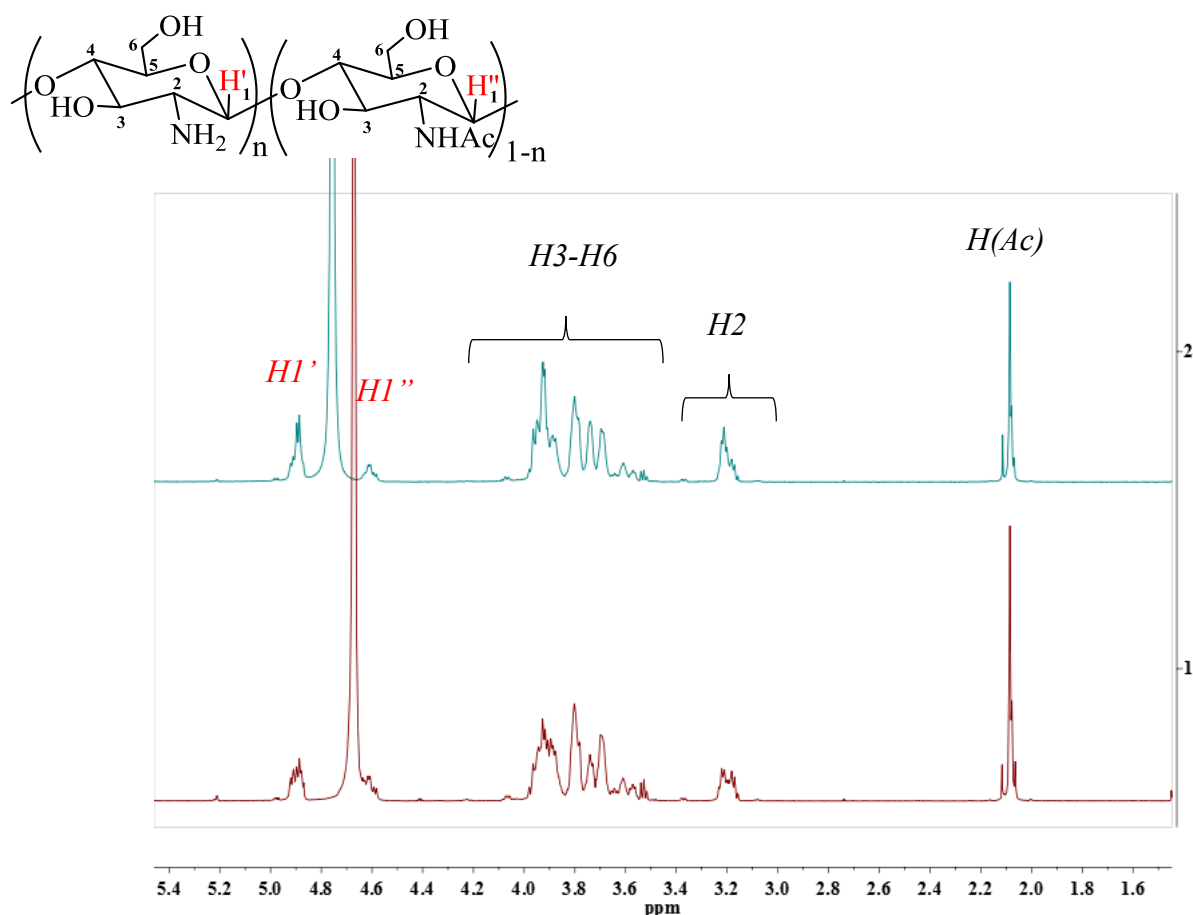


Рис. 11. ПМР спектры деполимеризованных образцов хитозана, полученных из личинок *H. illucens* (6,86 кДа) (сверху) и панцирей краба (6,78 кДа) (снизу).

3.1.5. Исследование антибактериальной и противогрибной активностей

Ранее отмечалось, что хитозан и его производные обладают антимикробной активностью против ряда грибов [124–128], бактерий [129–131] и вирусов [132–135]. Антибактериальная и противогрибная активности хитозана могут расширить

применение данного полимера, например, для защиты множества растительных продуктов от плесневения, развития гнили и обеспечения их более длительного хранения, а также в пищевой отрасли – изготовление плёнок и упаковочного материала. Известно его применение в композиции с консервантами для сохранения рыбы и икры. В медицине — для профилактики и лечения некоторых заболеваний. Например, гликоконъюгат на основе хитозана с глоботриозным фрагментом можно использовать для нейтрализации токсинов бактерий, а именно для эффективного связывания шига-токсина *E. coli*, способствующего развитию инфекционных болезней. Предпосылкой наблюдаемого эффекта возможно служит снижение адгезивных свойств условно-патогенных бактерий [136].

Антибактериальная активность хитозана обусловлена ионными взаимодействиями на поверхности и внутри бактериальных клеток [137]. Положительный заряд хитозана ионизирует отрицательно заряженные молекулы на поверхности бактериальных клеток [137]. Кроме того, хитозан способен проникать внутрь бактериальных клеток, подавляя синтез белка благодаря своей способности взаимодействовать с отрицательно заряженной мРНК и блокировать ее [138].

Антибактериальное действие образцов хитозана было изучено на двух культурах бактерий – *E. coli* и *S. epidermidis*.

Наиболее чувствительным микроорганизмом оказался *S. epidermidis*, для образцов низкомолекулярного хитозана, полученного из личинок черной львинки, МИК составила 62,5 мкг/мл. Зависимости от молекулярной массы хитозана выявлено не было. В экспериментах с *E. coli* МИК составляет более 500 мкг/мл.

Результаты опыта с *S. epidermidis*, представлены в Табл. 7.

Табл. 7. Результаты определения МИК, относительно *S. epidermidis*.

Шифр	Хз, 6,86 кДа	Хз (кр), 6,78 кДа	Хз, 21,36 кДа	Хз (кр), 16,15 кДа	Хз, 19,64 кДа	Хз (кр), 10,66 кДа
МИК, мкг/мл	62,5	125	62,5	62,5	62,5	62,5

Противогрибное действие было изучено посредством определения влияния хитозанов на метаболическую активность фитопатогенов. Действие образцов хитозана было исследовано на двух основных фитопатогенах *B. cinerea* и *F. oxysporum* в концентрациях 0,11, 0,23, 0,45, 0,90 и 1,80 мг/мл. *B. cinerea* – это анаморфный гриб, возбудитель серой гнили для множества растений [139]. *F. oxysporum* – это несовершенный, почвенный, фитопатогенный гриб, являющийся возбудителем корневой гнили и фузариозного увядания [140].

Метаболическая активность *F. oxysporum* приведена на Рис. 12 и 13. При оценке МА отталкивались от понятия IC_{50} , концентрации полумаксимального ингибирования, вызывающей 50%-ное подавление роста микроорганизма. Хитозаны, полученные из личинок черной львинки, подавляют метаболическую активность *F. oxysporum* <50% при меньшей концентрации, чем хитозан из панцирей краба. Образцы хитозана из личинок черной львинки подавляют МА на 85-88% при концентрациях 0,23 мг/мл, в то время как образцы хитозана из панцирей крабов оказывают подобный эффект при концентрации в 2 раза выше (0,45 мг/мл).

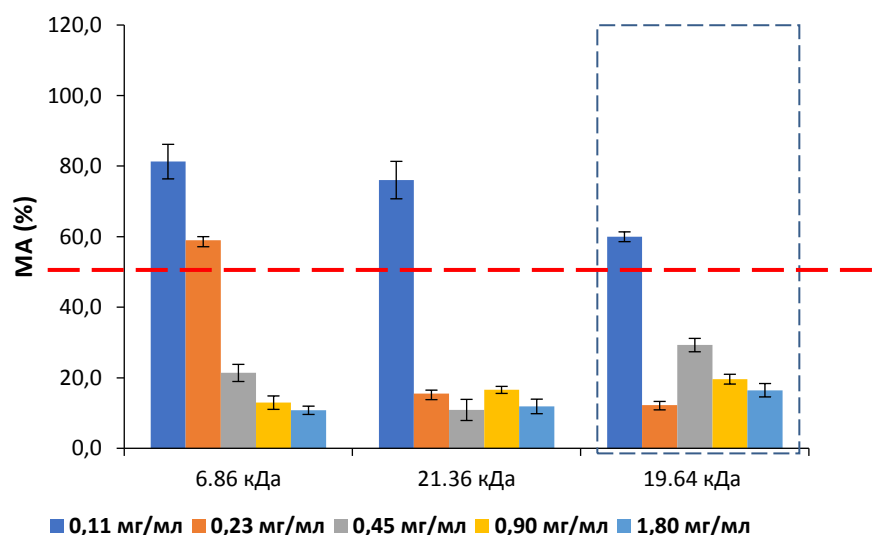


Рис. 12. Влияние M_w и концентраций образцов хитозана, полученного из личинок черной львинки, на МА *F. oxysporum*.

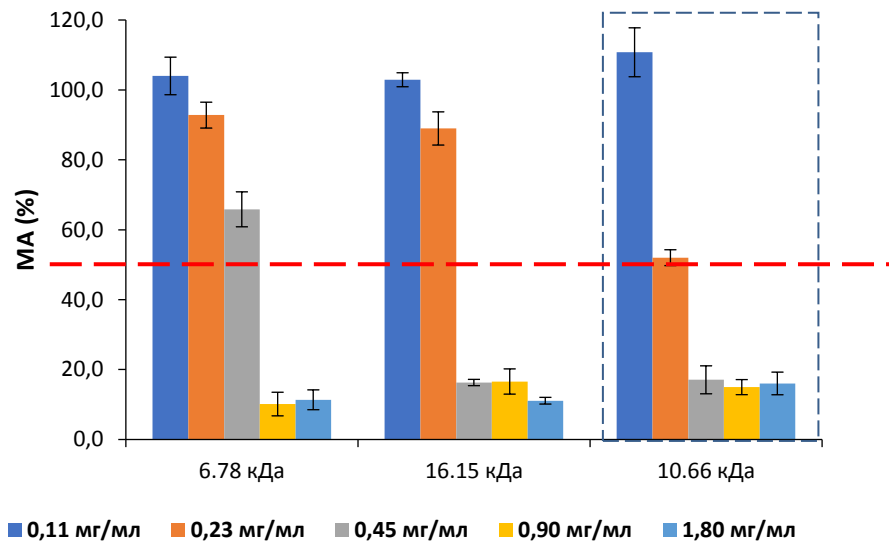


Рис. 13. Влияние M_w и концентраций образцов хитозана, полученного из панцирей крабов, на МА *F. oxysporum*.

В изучаемых концентрациях метаболическая активность *B. cinerea* была больше или равна 50%.

3.2. Получение и исследование хитин- и хитозан-меланиновых комплексов из кутикулы куколок и подмора *H. illucens*

3.2.1. Получение хитин- и хитозан-меланиновых комплексов

Кутикулу куколок и подмор *H. illucens* подвергали стадиям деминерализации, депротенинирования/обезжиривания и дезацетилирования. Результаты физико-химических анализов представлены в Табл. 8. Важно отметить, что ранее в литературе не были определены примеси в хитин- и хитозан-меланиновых комплексах [84].

Предполагалось, что для удаления белка и жира из кутикулы куколок и подмора подойдут условия (1-10% NaOH (в/в)), ранее используемые для ракообразных и подмора пчел [76]. Первоначально, после проведения стадии деминерализации в 1% HCl применялись две концентрации гидроксида натрия – 5 и 10%.

Тем не менее, такой обработки оказалось недостаточно, чтобы удалить белок и жир из хитин-меланиновых комплексов, и концентрация щелочи была увеличена до 30 и 50%. В частности, это было наиболее ярко выражено в случае с подмором,

в котором оставшееся содержание жира было 21-27%. Это можно объяснить тем, что липидный состав в подморе отличается и содержит воск, не гидролизующийся щелочью. В связи с этим при работе для подмора потребовалась дополнительная стадия обезжиривания органическим растворителем. В результате обработки диэтиловым эфиром жир из хитозан-меланинового комплекса был удален. Ранее было показано, что обработка хитина из черной львинки 50% щелочью позволяет получать хитозан со СДА в диапазоне 87-92%, в то время как обработка более слабой щелочью, 30%, не приводит к деацетилированию хитина. Из-за содержания в кутикуле куколок и подморе меланина определение СДА и M_w является не вполне корректным, поэтому по аналогии получали хитин-меланиновый комплекс при обработке 30% NaOH, а хитозан-меланиновый – 50% щелочью. Было замечено, что при увеличении концентрации NaOH, содержание белка в подморе возрастало. Это можно объяснить тем, что более концентрированная щелочь более плотная и вязкая, что не позволяет ей эффективно смачивать материю и проникать в нее. Исходя из этого, целесообразно получать хитозан-меланиновый комплекс из хитин-меланинового комплекса, а не из деминерализованного сырья. (Табл. 8).

Табл. 8. Эффективность удаления примесей на разных стадиях обработки.

No.	Стадия обработки	Кутикула куколок			Подмор		
		%жира	%золы	%белка	%жира	%золы	%белка
1	Исходный материал	8,9	10,5	Н/О*	27,1	5,2	Н/О
2	Деминерализация (1% HCl)	11,3	0,7	Н/О	26,6	0,7	Н/О
3a	Депротенирование (5%-NaOH)	10,9	<0,7	21,8	21,2	<0,7	19,9
3b	Депротенирование (10%-NaOH)	5,5	<0,7	11,6	26,6	<0,7	11,5
3c	Депротенирование (30%-NaOH)	0,4	<0,7	1,7	7,8	<0,7	3,8
4	Деацетилирование (50%-NaOH)	0	<0,7	0,8	5,4	<0,7	1,2

*Н/О – не определено

Было сделано важное наблюдение, что кутикула куколки имеет двухслойную структуру. Внутренний белый слой содержит преимущественно хитин, а внешний темный – хитин-меланиновый комплекс. (Рис. 14) Внутренний хитиновый слой

можно выделить ранее описанным методом прямой экстракции с использованием фосфорной кислоты.



Рис. 14. Кутикулы куколок *H. illucens* (слева), экстрагированный из них хитин (в правом нижнем углу), хитин-меланиновый комплекс (в правом верхнем углу).

Известно, что свободные радикалы присутствуют в структуре меланина и в твердом состоянии, и в суспензии [141]. Это свидетельствует о том, что для определения количественного содержания меланина может применяться электронный парамагнитный резонанс. В Табл. 9 представлены данные ЭПР анализа. Регистрация ЭПР-сигнала в кутикуле куколок, подморе, хитин- и хитозан-меланиновых комплексах, полученных из кутикулы куколок и подмора черной львинки, подтверждает присутствие пигмента, ковалентно связанного с полисахаридом. Этот факт демонстрируется и при визуальном рассмотрении: образцы имели темно-коричневый цвет. Наличие стабильного парамагнитного поглощения и регистрация сигнала ЭПР с g -фактором близким к величине g -фактора свободного электрона (2,0023) и шириной линии (ΔB_{pp}) 5-7 Гс является одной из идентификационных характеристик меланиновых пигментов [142]. Из данных, приведенных в таблице, видно, что во всех меланинсодержащих продуктах регистрировался сигнал с g -фактором в пределах 2,0022-2,0046 и шириной линии 5,4-6,1 Гс, что в свою очередь подтверждало бензосемихинонную структуру меланина, описанную в литературе для эумеланинов [142].

Основной оценкой ЭПР сигнала является количество парамагнитных центров, которое влияет на физико-химические и биологические свойства меланинсодержащих комплексов. В таблице показано, что максимальное количество парамагнитных центров содержалось в хитин- и хитозан-меланиновых комплексах из подмора черной львинки и составляло $5,7 \times 10^{17}$ спин на грамм сухого вещества. Высокие концентрации свободных радикалов важны для их химической активности. Свободные радикалы – это активные парамагнитные молекулы с неспаренными электронами, которые способны взаимодействовать с ионами металлов или лигандами. Ранее было установлено, что меланин связывается с лекарственными препаратами за счет электростатических и Ван-дер-Ваальсовых сил или путем простой передачи заряда [143]. Следовательно, меланин в хитин- и хитозан-меланиновом комплексе из подмора *H. illucens* будет лучше взаимодействовать с активными компонентами фармацевтических и косметических средств.

Данные ЭПР анализа демонстрируют, что содержание меланина как в хитин-, так и в хитозан-меланиновых комплексах, полученных из подмора, одинаковое и составляет более 14%. Это уникальное свойство черной львинки и не наблюдается у других видов насекомых. Например, хитозан-меланиновые комплексы из подмора пчел получают путем механического смешивания двух биополимеров, поскольку меланин удаляется во время реакции деацетилирования [79].

Табл. 9. Содержание меланина в комплексах по данным ЭПР анализа.

Образец	Кутикула куколки	Хитин-меланиновый комплекс из кутикулы куколки	Хитозан-меланиновый комплекс из кутикулы куколки	Подмор	Хитин-меланиновый комплекс из подмора	Хитозан-меланиновый комплекс из подмора
g-фактор	2,0040	2,0046	2,0045	2,0022	2,0043	2,0043
ΔB_{pp}	6,1	5,9	5,8	6,0	5,5	5,4
$N \times 10^{-17}$, спин/г	2,9	1,5	0,75	4,7	5,7	5,7
%, меланин	6,7	3,8	1,9	10,9	14,3	14,3

Значение динамической вязкости для 1% раствора хитозан-меланинового комплекса, выделенного из кутикулы куколок, в 1% уксусной кислоте соответствовало $149-153 \pm 1,53$ сП, а для хитозан-меланинового комплекса, выделенного из подмора, $92-93 \pm 0,93$ сП. Возможно, снижение вязкости связано с присутствием большего количества меланина в комплексе, полученном из подмора, что подтверждает вышеописанные данные ЭПР анализа.

Дзета-потенциал и размер частиц являются ключевыми показателями стабильности коллоидной системы, поскольку размер частиц препятствует явлениям флокуляции и коалесценции [144]. Известно, что в дисперсных системах на поверхности частиц возникает двойной электрический слой, представляющий собой слой ионов на поверхности частицы. В хитозане дзета-потенциал отражает электрический потенциал на его поверхности и образуется за счет наличия протонированных аминогрупп. Дзета-потенциал хитозана ($c=0,0625\%$) был равен $+52,36 \pm 3,45$ мВ, для хитозан-меланинового комплекса ($c=0,008-0,01\%$) это значение соответствовало $+56,13 \pm 2,06$ мВ, что в обоих случаях соответствует стабильным частицам. Размер частиц хитозана был равен 800 ± 50 нм, а хитозан-меланинового комплекса оценивался в диапазоне от 1,0 до 1,5 мкм, что может подтверждать присутствие меланина в комплексе.

3.2.2. Исследование свойств хитин- и хитозан-меланиновых комплексов

Хитин-меланиновый комплекс нерастворим и представляет интерес в качестве потенциального сорбента тяжелых металлов и радионуклидов. В отличие от меланина, который растворим в щелочных условиях, хитозан-меланиновый комплекс растворим в слабокислых и водных средах и служит объектом для исследования фотопротекторной и антиоксидантной активностей. Таким образом, получение двух комплексов в совокупности расширяет не только область растворимости, но и их взаимный спектр применения.

3.2.2.1. Сорбционные свойства хитин-меланинового комплекса

Ранние исследования показали [145], что сорбция на хитин-меланин-глюкановом комплексе Микотон (Институт клеточной биологии и генетической инженерии, Киев, Украина) [145] по отношению к радионуклидам урана и

стронция в ионной форме $^{233}\text{UO}_2^{2+}$ и $^{90}\text{Sr}^{2+}$ оказывается существенно выше, чем для чистого хитина или хитозана. Было установлено [145–148], что одной из основных причин увеличения эффективности сорбентов из грибов является то, что они представляют собой не чистый хитин, а комплекс биополимеров клеточной стенки. Показано влияние состава комплексов, особенно меланиновой составляющей, на сорбционные свойства природных полимеров, содержащих хитин и меланин.

При сорбции $^{233}\text{UO}_2^{2+}$ (pH=6) и $^{90}\text{Sr}^{2+}$ (pH=9,5) из раствора 5 г/л NaNO_3 и $V/m=100$ мл/г для чистого хитина, полученного из гаммаруса (Институт Гипрорыбфлот, Санкт-Петербург, Россия) (хитин 99%), значения коэффициентов распределения составили $2,35 \times 10^3$ и $2,0 \times 10^2$ мл/г, для хитин-меланин-глюканового комплекса Микотон [145] (хитин – 60-95%, меланин – 10%) – $4,8 \times 10^3$ и $1,2 \times 10^3$ мл/г, а для пчелиного подмора (ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Компания «Тенториум», Пермь) [149] (хитин – 60%, меланин – 40%) – $8,1 \times 10^3$ и $6,3 \times 10^2$ соответственно.

Анализ этих данных показал, что материалы, в состав которых входит меланин, отличаются высокой сорбционной активностью по отношению к $^{233}\text{UO}_2^{2+}$, а эффективность сорбции зависит от содержания меланина. Аналогичное поведение обнаружено и для ионов $^{90}\text{Sr}^{2+}$.

Кроме того, влияние меланиновой составляющей на взаимодействие с $^{233}\text{UO}_2^{2+}$ и $^{90}\text{Sr}^{2+}$ была изучена на примере хитин-меланинового комплекса из подмора пчел (*Apis mellifera*) различной степени очистки перекисью водорода и перекисью водорода и соляной кислотой. Обменное равновесие устанавливалось быстро за 10 мин, независимо от типа образца. В условиях равновесия в растворах 5 г/л NaNO_3 , $V/m=100$ мл/г при pH=5 для ^{233}U и pH=9,5 для ^{90}Sr у хитин-меланинового комплекса найдены максимальные значения коэффициентов распределения, составившие $5,1 \times 10^3$ и $6,4 \times 10^2$ соответственно. Следует отметить, что в случае хитин-меланинового комплекса, обработанного H_2O_2 , и комплекса, обработанного смесью H_2O_2 с HCl , сорбционные характеристики снижались на порядок, что являлось дополнительным свидетельством влияния меланина на сорбцию радионуклидов. Таким образом, дополнительная обработка комплексов

осветляющими агентами приводила к снижению сорбционных свойств получаемых продуктов [149].

В данной работе исследованы сорбционные характеристики комплекса хитина и меланина, выделенного из подмора черной львинки. Сорбционное равновесие оценивали при сравнимых условиях (5 г/л NaNO_3 , $V/m=100$ мл/г при $\text{pH}=5$ для ^{233}U и $\text{pH}=9,5$ для ^{90}Sr). Установлено, что среди выделенных природных полимерных комплексов хитин-меланиновый, выделенный из *H. illucens*, обладает наивысшими сорбционными характеристиками. Так для $^{233}\text{UO}_2^{2+}$ при $\text{pH}=4$ коэффициент распределения составил $1,03 \times 10^4$ мл/г, а для $^{90}\text{Sr}^{2+}$ при $\text{pH}=9,5$ – $1,0 \times 10^4$ мл/г. Следует отметить, что кинетическая зависимость при установлении равновесия носит экстремальный характер. Радионуклиды извлекаются практически полностью в течение первой минуты после приведения в контакт твердой и жидкой фазы. При этом значения равновесных коэффициентов распределения оставались порядка 10^4 и 10^3 мл/г для урана и стронция соответственно.

Стоит подчеркнуть, что поскольку хитин-меланиновый комплекс полностью природный и не подвергается химическим модификациям, его состав стабильно воспроизводим, в отличие от препарата Микотон.

3.2.2.2. Фотопротекторные и антиоксидантные свойства хитозан-меланинового комплекса

Фотопротекторная активность хитозана, меланина и хитозан-меланиновых комплексов, выделенных из *H. illucens*, оценивалась методом абсорбционной спектроскопии. Исследовался весь спектр УФ-излучения: коротковолновый УФ-С – 200-280 нм, средневолновый УФ-В – 280-315 нм и длинноволновый УФ-А – 315-400 нм. Наибольшее внимание уделяется УФ лучам типа В, которые составляют всего 5-10%, но наиболее опасные для человека. Помимо фотостарения кожи, эти лучи способны вызвать фотоповреждение ДНК клеток, мутации, гибель клеток, приводить к образованию злокачественных заболеваний кожи. Из Рис. 15 видно, что образцы поглощали свет практически на всем диапазоне УФ-спектра, включая интересующую область длин волн $\lambda=280-315$ нм (УФ-В). Хитозан практически не

обладает фотопротекторной активностью и поэтому использовался в качестве контроля. Концентрация образцов по меланину была одинаковой и составляла 5 мг/мл. На Рис. 15 видно, что значения поглощения хитозан-меланинового комплекса выше по сравнению с хитозаном и меланином по отдельности, что свидетельствует о синергической активности биополимеров в комплексе.

Антиоксидантные свойства хитозан-меланинового комплекса сравнивали со свойствами биополимеров по отдельности. Экстракцию меланина проводили по методике [91] осаждением концентрированной соляной кислотой. Полученный меланин лиофильно высушивали. Антиоксидантную активность оценивали путем определения способности образцов улавливать свободные радикалы посредством ингибирования окисления 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила.

На Рис. 16 показана поглощающая способность меланина, хитозана и хитозан-меланинового комплекса из *H. illucens*, а также крабового хитозана в отношении радикалов ДФПГ. Меланин и хитозан представляют собой полимерные соединения, которые способны взаимодействовать со свободными радикалами ДФПГ посредством процесса переноса электрона, таким образом нейтрализуя свободные радикалы [150]. Первоначально активность хитозан-меланинового комплекса по поглощению ДФПГ была выше по сравнению с хитозаном, но ниже относительно меланина. Однако после того, как концентрация меланина в хитозан-меланиновом комплексе соответствовала меланину, активность комплекса по поглощению ДФПГ была самой высокой среди тестируемых образцов. Как показано на Рис. 16, меланин в сочетании с хитозаном усиливают антиоксидантную активность друг друга, что доказывает синергический эффект этих биополимеров. Комплекс хитозан-меланин с улучшенной антиоксидантной активностью имеет высокий потенциал для использования в косметических и биомедицинских областях для предотвращения повреждений или потерь, вызванных активными формами кислорода.

Исходя из результатов исследования фотопротекторной и антирадикальной активностей, можно сделать вывод о том, что меланин в комплексе с хитозаном

усиливают активность друг друга, что доказывает синергический эффект этих биополимеров.

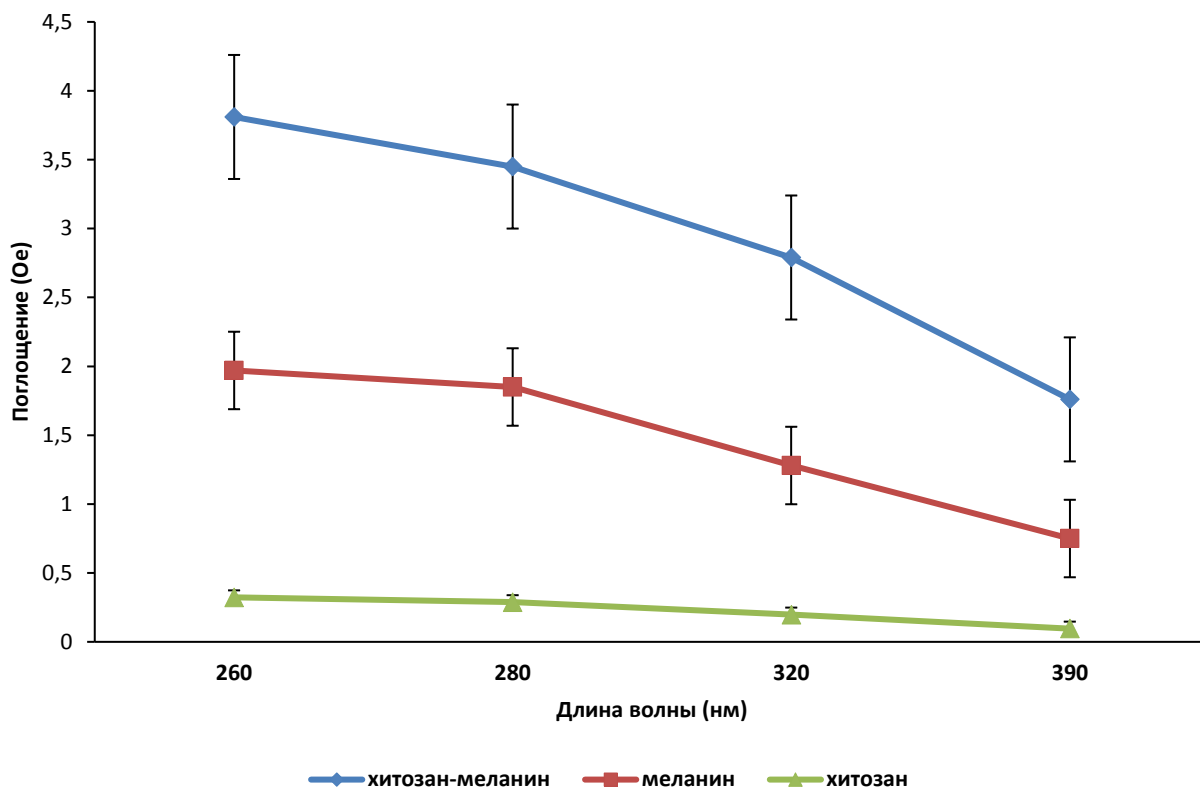


Рис. 15. Сравнение фотопротекторной активности для разных биополимеров.

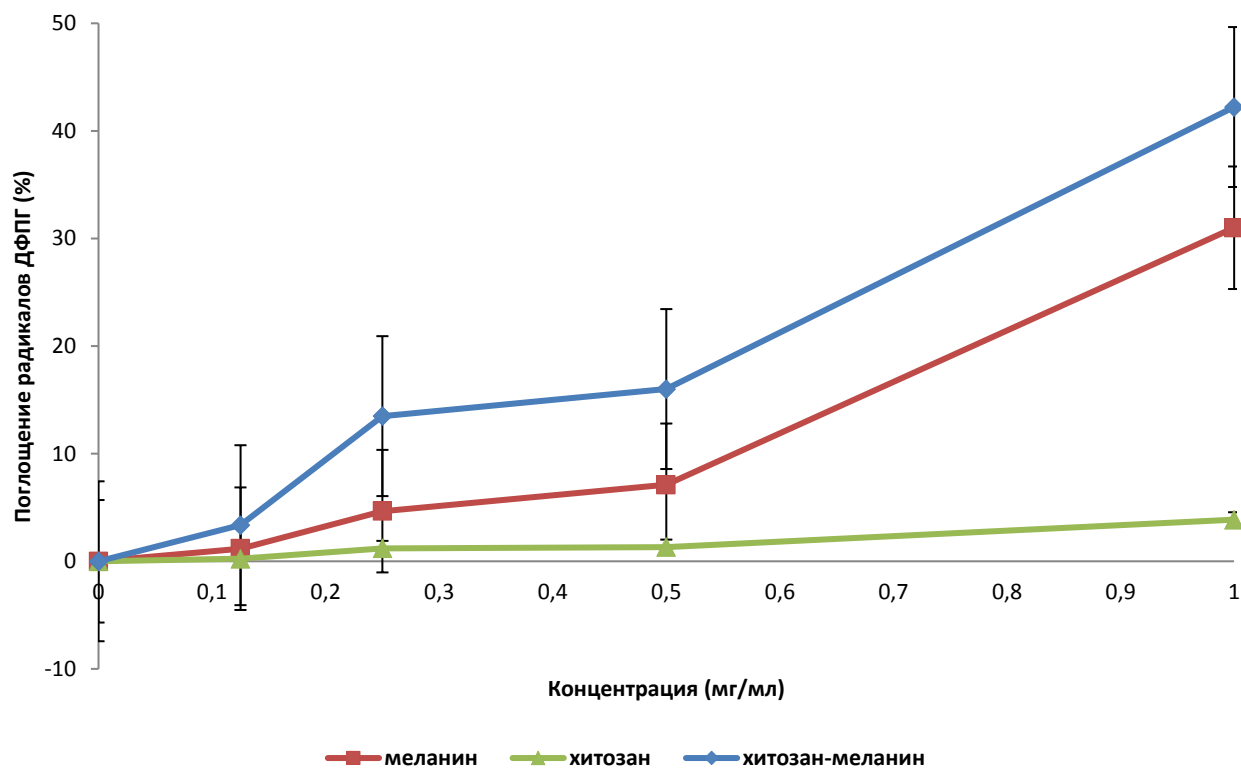


Рис. 16. Сравнение антиоксидантной активности для разных биополимеров.

3.2.3. Получение и исследование эмульсионных систем с хитозан-меланиновым комплексом

3.2.3.1. Создание рецептуры солнцезащитного крема

В результате исследований фотопротекторных и антиоксидантных свойств хитозан-меланинового комплекса был показан усиленный эффект двух биополимеров в комплексе. Также известно, что пленкообразующие свойства хитозана могут снижать трансэпидермическую потерю воды в результате использования косметического крема и повышать эффективность действия УФ-фильтров [114]. Таким действием, очевидно, обладает и хитозан, входящий в данный комплекс. Поэтому представляется, что хитозан-меланиновый комплекс может оказывать положительное биологически активное действие при введении его в солнцезащитные эмульсионные системы и проявлять синергический эффект с традиционными УФ-фильтрами.

Наилучшими формами для создания фотопротекторных средств являются эмульсии – кремы или лосьоны. В настоящее время именно эмульсионные косметические средства являются наиболее распространенными на косметическом рынке, что обусловлено высокой эффективностью и рентабельностью данной группы изделий. Эмульсионные системы формируют на коже универсальную, плотную, непрозрачную пленку, обеспечивающую высокую защиту от УФ-излучения. Недостатком таких многокомпонентных продуктов является сложность их стабилизации [151].

Эффективность солнцезащитной композиции оценивается с помощью солнцезащитного фактора, выражающегося отношением минимальной эритемной дозы (minimal erythema dose, MED) излучения, необходимой для появления покраснения (эритемы) на защищенной коже (с солнцезащитным кремом в фиксированной дозе 2 мг/см²), и MED незащищенной кожи по следующему уравнению (7):

$$\text{Sun protection factor/солнцезащитный фактор (SPF) = MED} \\ \text{защищенной кожи / MED незащищенной кожи} \quad (7)$$

SPF в значительной степени является мерой защиты от УФ-В излучения, поскольку оно почти в 1000 раз более эритемогенно по сравнению с УФ-А. Система оценок для SPF варьируется от низкой до высокой: низкая – SPF 2-15, средняя – SPF 15-30, высокая – SPF 30-50, максимальная – SPF>50 [152]. Например, продукт с SPF 20 позволяет человеку оставаться на солнце до 20 раз дольше без солнечного ожога по сравнению с незащищенной кожей.

Основная задача разработчиков солнцезащитных средств – повышение SPF-фактора. Это возможно при использовании явлений синергизма физических и химических УФ-фильтров, применения новых органических соединений и высоких технологий получения косметических средств. Значение солнцезащитного фактора в основном определяется с использованием подходов *in vivo*, но могут также использоваться спектрофотометрические методы *in vitro*, а также *in silico*, которые используют компьютерные модели для прогнозирования значения SPF.

На первом этапе был разработан солнцезащитный крем с SPF=20, включающий синергическую комбинацию коммерческих УФ-фильтров и хитозан-меланинового комплекса. Сложность разработки данной эмульсионной системы заключалась в выявлении оптимальных концентраций фотопротекторных компонентов, которые смогут обеспечить ожидаемое значение солнцезащитного фактора и совместимость с другими компонентами композиции.

С помощью инструмента моделирования *in silico* были вычислены оптимальные концентрации УФ-фильтров для достижения SPF=20 (Рис. 17).

BASF Sunscreen Simulator

FILTER SELECTION

Region: All filters

Application Amount: 2.0 mg/cm²

UV Filter composition

INCI name	USAN name	Abbreviation	Amount
Butyl Methoxydibenzoylmethane	Avobenzene	BMDBM	3 %
Ethylhexyl Methoxycinnamate	Octinoxate	EHMC	5 %
Ethylhexyl Salicylate	Octisalate	EHS	4 %
Octocrylene	Octocrylene	OCR	4 %

Total: 16 %

SPF (Sun Protection Factor)

SPF: 20.5

Rating*: 20

Filter efficiency: 1.3 (SPF/% UV Filter)

■ Simulation of the sun protection factor in vivo (SPF, ISO 24444) is performed. A description of the calculations is given in: „In Silico Determination of Topical Sun Protection“, Bernd Herzog & Uli Osterwalder, Pure & Appl Chem 87 (2015) 937 - 951

■ According to ISO 24444 a sunscreen application amount of 2mg/cm² is required

■ The UV Filter efficiency is the ratio of SPF and total UV Filter concentration (in %). The higher this value, the less Filter is required to achieve a certain SPF. This means a higher degree of freedom in the choice of other ingredients in a sunscreen formulation.

* according to European Commission recommendation on the efficacy of sunscreens

Рис. 17. Концентрации УФ-фильтров для достижения SPF=20.

В соответствии с рекомендациями Европейской комиссии, при разработке солнцезащитной косметики также важна оценка промежуточной защиты в УФ-А области. Должны выполняться следующие условия:

- 1) критическая длина волны составляет не менее 370 нм,
- 2) отношение UVA-PF/SPF не менее 0,33.

Результаты Рис. 18 указывают на соответствие исследуемой комбинации УФ-фильтров вышеназванным критериям: $\lambda_{кр}=374$ нм, а отношение UVA-PF/SPF = 0,35.

UVA-METRICS			
REGION/COUNTRY	IN VITRO	IN VIVO	RATING
EU AUS MERCOSUR	UVA-PF (ISO 24443): 7.3 UVA-PF/SPF: 0.35 Critical wavelength: 374.0 nm	UVA-PF (PPD, ISO 24442): 6.5 UVA-PF/SPF: 0.32	
GB	UVA protection according to Boots Star Rating UVA/UVB ratio: 0.67		
ASIA		UVA-PF (ISO 24442): 6.5	PA++
USA	FDA Final Rule Critical wavelength: 373.0 nm		decreases the risk of skin cancer and early skin aging caused by the sun

Рис. 18. Характеристики исследуемой комбинации фильтров в отношении защиты от УФ-А лучей.

Данные Табл. 10 иллюстрируют необходимое содержание УФ-фильтров.

Табл. 10. Содержание УФ-фильтров в креме для достижения SPF=20.

Наименование УФ-фильтра	Концентрация, % масс.
Этилгексилсалицилат	4,0
Этилгексилметаксидиннамат	5,0
Октокрилен	4,0
Авобензон	3,0

Разработка солнцезащитного крема для ухода за кожей базировалась на принципе полифункциональности. В качестве биологически активных добавок выбирались те, которые могут обеспечить кондиционирование кожи (смягчение и восстановление), обладают противовоспалительным, ранозаживляющим и фотопротекторным действием. Среди растительных масел было выявлено масло зародышей пшеницы, характеризующееся высокими значениями SPF фактора [153], а также увлажняющими, регенерирующими и смягчающими свойствами. Масло ши оказывает выраженный кондиционирующий эффект рогового слоя кожи. Экстракты календулы и липы оказывают противовоспалительное действие на кожу; увлажняют, смягчают и успокаивают кожу. Витамин Е – антиоксидант, который также может защищать кожу от возникновения солнечной эритемы. Гидратантом в эмульсионной системе являлся глицерин. В качестве консерванта применялся современный представитель Euxyl – смесь этилгексилглицерина и феноксэтанола. Возможность хитозана в комплексе с меланином усиливать действие УФ-фильтров является несомненной его перспективностью.

Темный цвет данного комплекса ограничивает предел его ввода в косметические средства. Было выявлено его максимально допустимое содержание в составе эмульсионной композиции – 0,5% масс. Активный компонент в больших концентрациях окрашивает водный раствор в темно-коричневый цвет, а крем – в грязно-серый, что приводит к потере внешней привлекательности готового продукта.

При разработке композиций с использованием комплекса также учитывалось низкое значение pH его водного раствора (при C=0,1% масс., pH=4,03). Поскольку

pH косметических кремов – важный и нормируемый параметр, и по ГОСТ 31460-2012 он должен лежать в пределах от 5 до 9, высокие концентрации комплекса в эмульсионном креме нежелательны.

В Табл. 11 представлена рецептура солнцезащитного крема с SPF=20, включающий коммерческие УФ-фильтры и хитозан-меланиновый комплекс.

Табл. 11. Рецептура фотопротекторного крема с коммерческими УФ-фильтрами и хитозан-меланиновым комплексом (SPF=20).

Ингредиенты	Содержание, % масс.
Масляная фаза	
Масло зародышей пшеницы	2,0
Масло ши	2,0
Изопропилмиристат	3,0
Этилгексилсалицилат	4,0
Этилгексилметоксициннамат	5,0
Октокрилен	4,0
Авобензон	3,0
Цетеарет-20	3,0
Цетеариловый спирт	4,0
Глицерилстеарат	3,0
Каприлик/каприк триглицерид	5,0
Циклометикон	1,0
Витамин Е	0,2
Отдушка	0,4
Водная фаза	
Хитозан-меланиновый комплекс	0,1
Глицерин	2,0
Экстракт календулы	0,5
Экстракт липы	0,5
Этилгексилглицерин + феноксэтанола	1,0
Вода	До 100,0

Крем обладал хорошей консистенцией и запахом, кремового цвета, приятный при нанесении. При нанесении отсутствовал эффект «беления», кожа становилась более мягкой (Рис.19).



Рис. 19. Внешний вид и применение солнцезащитного крема с хитозан-меланиновым комплексом.

Характеристики крема

Далее оценивалось соответствие полученной композиции требованиям ГОСТ 31460-2012 для данного вида косметического продукта (Табл. 12).

Табл. 12. Органолептические и физико-химические показатели крема.

Наименование показателя	Характеристика	
1	2	3
	Норма по ГОСТ	Исследуемый образец
Внешний вид	Однородная масса, не содержащая посторонних примесей	Однородная масса, не содержащая посторонних примесей
Цвет	Свойственный цвету данного крема	Кремовый цвет
Запах	Свойственный запаху данного крема	Свойственный запаху парфюмерной композиции
Водородный показатель pH	5,0-9,0	5,5
Коллоидная стабильность	Стабилен	Стабилен
Термостабильность	Стабилен	Стабилен

Методом оптической микроскопии была оценена структура полученной эмульсионной системы при увеличении в 400 раз (Рис. 20).

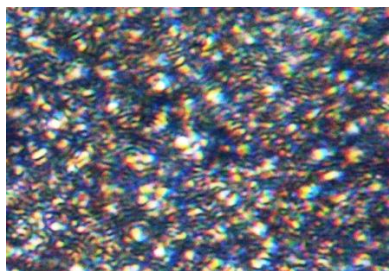


Рис. 20. Микрофотография крема (40х).

Из данных Табл. 12 видно, что солнцезащитный крем с хитозан-меланиновым комплексом удовлетворяет требованиям ГОСТ и обладает оптимальной вязкостью. Он также характеризуется однородностью структуры и низкой полидисперсностью, что необходимо для получения устойчивой композиции (Рис. 20).

Эффективность разработанного крема оценивалась по влиянию на основные параметры кожного покрова – гидратацию, жирность и эластичность. Краткосрочные измерения проводили *in vivo* в течение 60 мин после нанесения композиции на поверхность кожи с помощью multifunctional analyzer.

Как видно из Рис. 21, после нанесения солнцезащитного крема на кожу наблюдалось увеличение ее увлажнения. Это говорит о высокой кондиционирующей эффективности композиции. Жирность кожи при этом не менялась в течение всего промежутка времени.

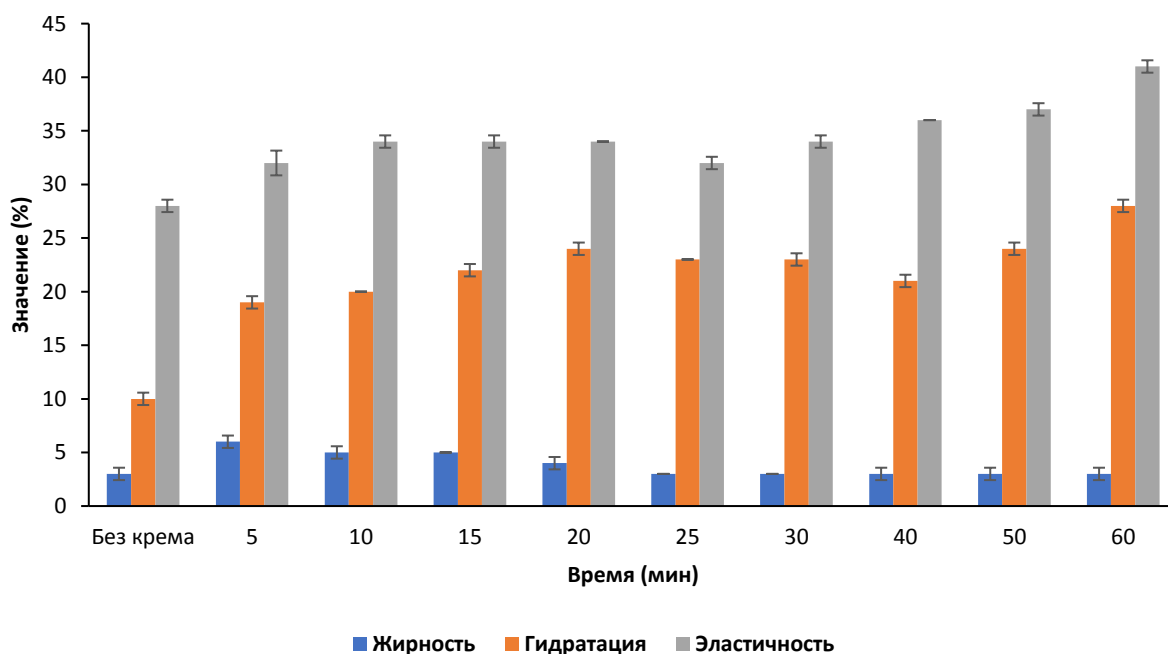
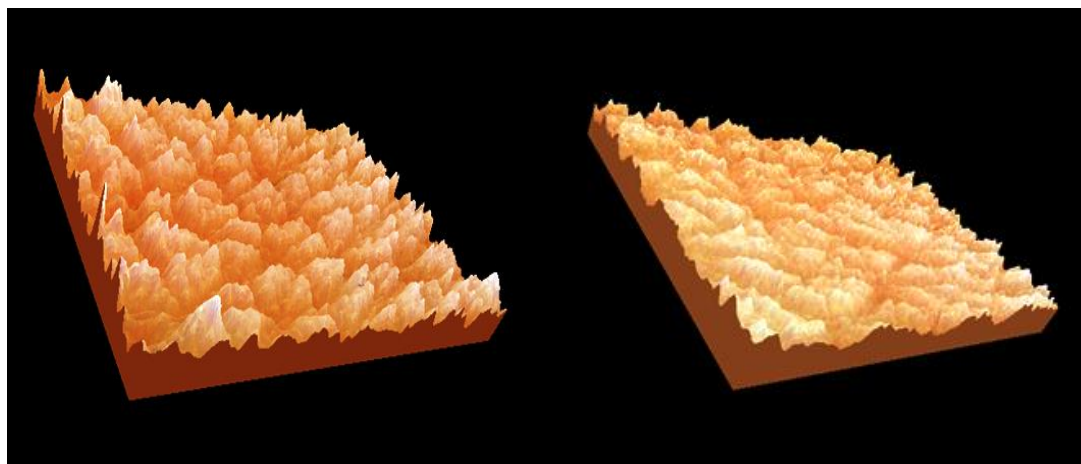


Рис. 21. Влияние нанесения солнцезащитного крема на параметры кожи.

Ниже приведены фотографии, которые показывают, как рельеф кожи становится более гладким (Рис. 22).



до нанесения

после нанесения

Рис. 22. Рельеф кожи при применении крема.

Таким образом, была разработана рецептура солнцезащитного крема на основе комбинации химических УФ-фильтров и хитозан-меланинового комплекса. Данная эмульсионная система агрегативно устойчива, характеризуется равномерной структурой, низкой полидисперсностью и выраженным гидратантным действием.

3.2.3.2. Создание рецептуры крема антиоксидантного действия

Актуальной тенденцией в технологиях производства косметических средств является создание anti-age косметики, препятствующей процессам старения вследствие включения в состав антиоксидантных добавок. В данном направлении был осуществлен подбор ингредиентов рецептуры крема с хитозан-меланиновым комплексом.

Масло абрикосовой косточки оказывает противовоспалительное, регенерирующее, тонизирующее действие, увлажняет и питает кожу, делает ее более упругой и эластичной. Оно нетоксично, поэтому его рекомендуют для ухода за чувствительной кожей. Миндальное масло обладает регенерирующим, противовоспалительным и тонизирующим эффектом. Экстракт граната и экстракт персика – яркие представители антиоксидантных добавок. Они борются со свободными радикалами, являющимися главными причинами старения кожи.

Гидролат розмарина увлажняет и освежает кожу, сужает поры, снимает отечность и раздражения, устраняет сухость и подтягивает, стимулирует кровообращение, усиливает защитные свойства кожи, способствует уничтожению на ее поверхности патогенной флоры, обладает антиоксидантным действием.

С целью сохранения потребительской привлекательности композиции максимальное содержание хитозан-меланинового комплекса в рецептуре составляло 0,5% масс. (Табл. 13).

Разработанный крем обладал хорошей консистенцией и приятным ароматом, сливочным цветом, отсутствием «белящего» эффекта при нанесении и выраженным увлажняющим действием (Рис. 23).

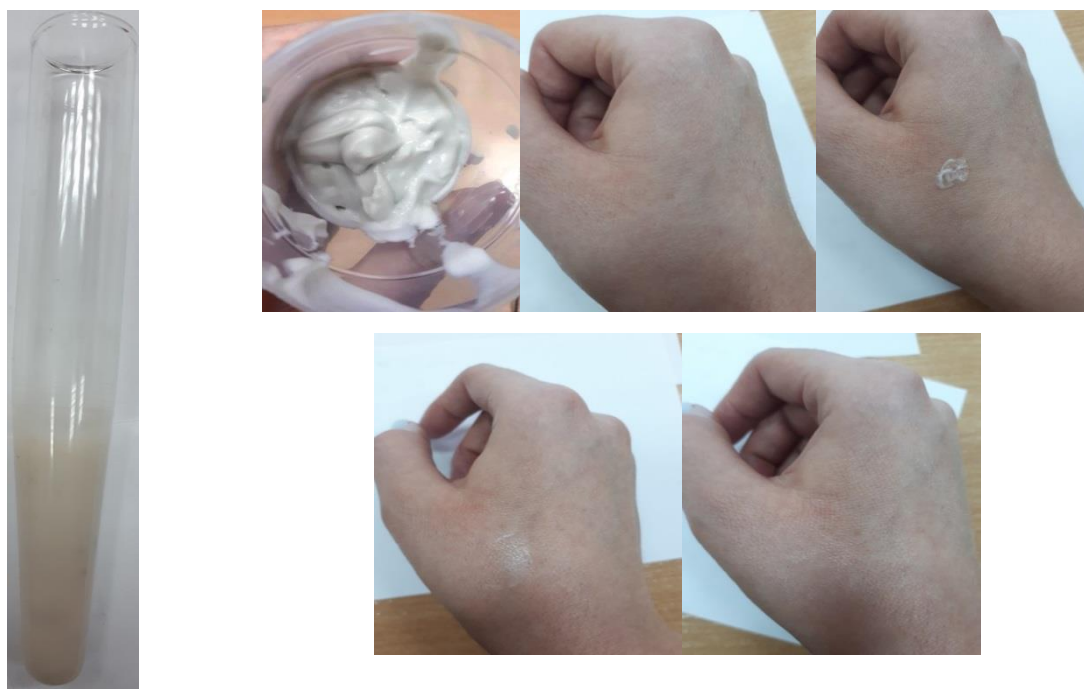


Рис. 23. Внешний вид и применение крема с хитозан-меланиновым комплексом антиоксидантного действия.

Табл. 13. Рецепттура крема с хитозан-меланиновым комплексом антиоксидантного действия.

Ингредиенты	Содержание, % масс.
Масляная фаза	
Масло абрикосовой косточки	2,0
Миндальное масло	2,0
Масло ши	2,0
Изопропилмиристат	3,0
Цетеарет-20	3,0
Цетеариловый спирт	3,0
Глицерилстеарат	3,0
Стеарат сахарозы	1,5
Каприлик/каприк триглицерид	5,0
Циклометикон	1,0
Витамин Е	0,2
Отдушка	0,4
Водная фаза	
Хитозан-меланиновый комплекс	0,5
Глицерин	2,0
Экстракт персика	0,5
Экстракт граната	0,5
Гидролат розмарина	5,0
Этилгексилглицерин+ феноксиэтанол	1,0
Вода	До 100,0

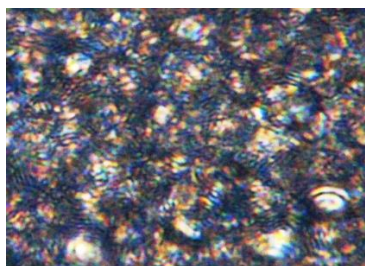
Характеристики крема

Далее оценивалось соответствие полученной композиции требованиям ГОСТ 31460-2012 для данного вида косметического продукта (Табл. 14).

Табл. 14. Органолептические и физико-химические показатели крема.

Наименование показателя	Характеристика	
1	2	3
	Норма по ГОСТ	Исследуемый образец
Внешний вид	Однородная масса, не содержащая посторонних примесей	Однородная масса, не содержащая посторонних примесей
Цвет	Свойственный цвету данного крема	Насыщенный сливочный цвет
Запах	Свойственный запаху данного крема	Свойственный запаху парфюмерной композиции
Водородный показатель pH	5,0-9,0	5,95
Коллоидная стабильность	Стабилен	Стабилен
Термостабильность	Стабилен	Стабилен

На Рис. 24 приведена микрофотография разработанной композиции при увеличении в 400 раз. Данные рисунка указывают на принадлежность крема к эмульсионным системам типа масло/вода. Размер его капель немного превышает таковые солнцезащитного крема.

**Рис. 24.** Микрофотография крема (40х).

Далее было проведено исследование крема, в составе которого присутствовал хитозан-меланиновый комплекс, и определение его влияния на влажность, жирность и эластичность кожи (Рис. 25).

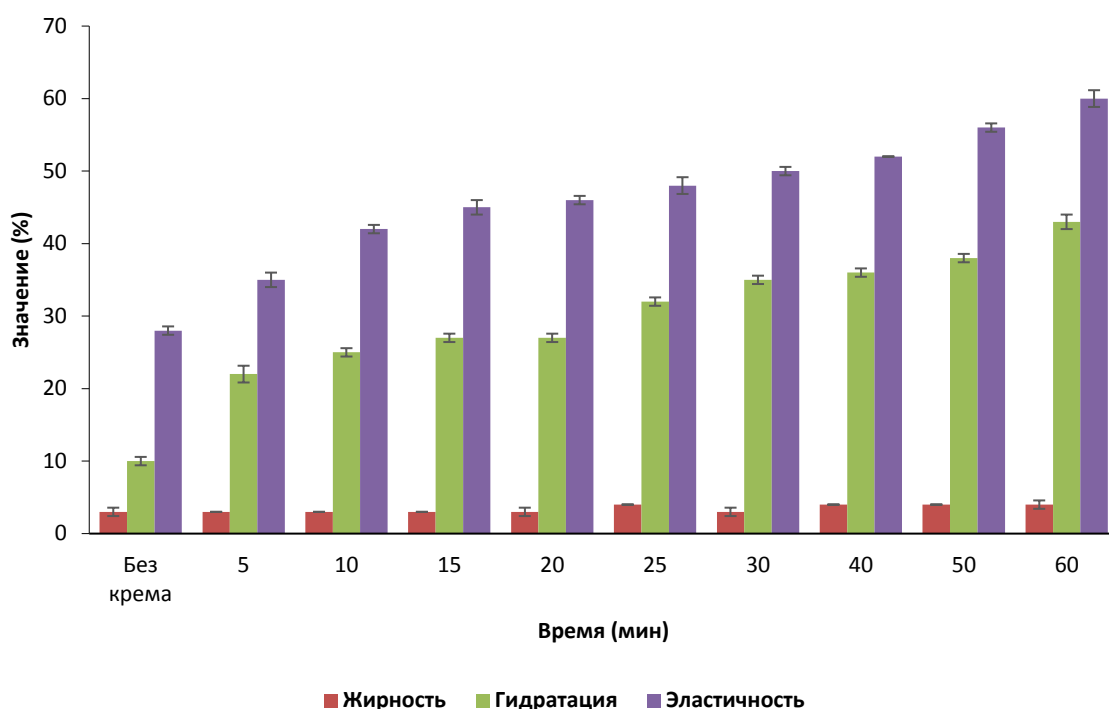
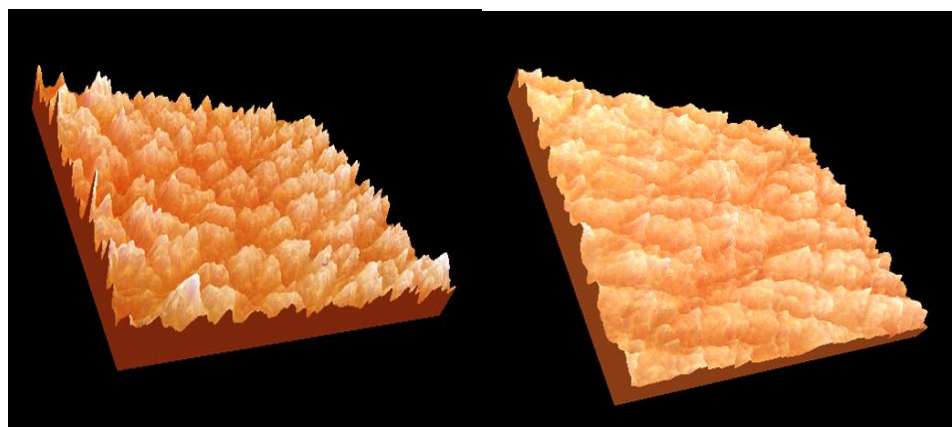


Рис. 25. Влияние нанесения крема с хитозан-меланиновым комплексом антиоксидантного действия на параметры кожи.

Оценивая совокупно данные Рис. 25 и 26, можно сделать вывод, что применение разработанного крема с хитозан-меланиновым комплексом антиоксидантного действия оказывает увлажняющее и смягчающее действие без жирной и липкой пленки на поверхности кожи. Спустя 60 мин после нанесения композиции эластичность кожи возрастает в 2 раза по сравнению с необработанной поверхностью, а гидратация – в 4 раза. При этом наблюдается разглаживание рельефа кожи.



до нанесения

после нанесения

Рис. 26. Рельеф кожи при применении крема.

3.3. Технология переработки мухи черная львинка на разных стадиях онтогенеза насекомого

На основании проведенных исследований были определены оптимальные условия для каждого этапа технологического процесса переработки черной львинки на разных стадиях онтогенеза. Учитывая особенности сырья, были предложены технологические схемы переработки личинок и подмора с получением таких веществ, как хитин и высокомолекулярный хитозан, а также хитин- и хитозан-меланиновые комплексы.

Следует отметить, что, варьируя параметрами технологического процесса, можно изменять физико-химические свойства продуктов в зависимости от целей использования. Ниже приведены технологические схемы переработки черной львинки на разных стадиях развития (Рис. 27 и 28). Предлагаемые подходы могут быть реализованы на профильных предприятиях без использования специализированного оборудования.

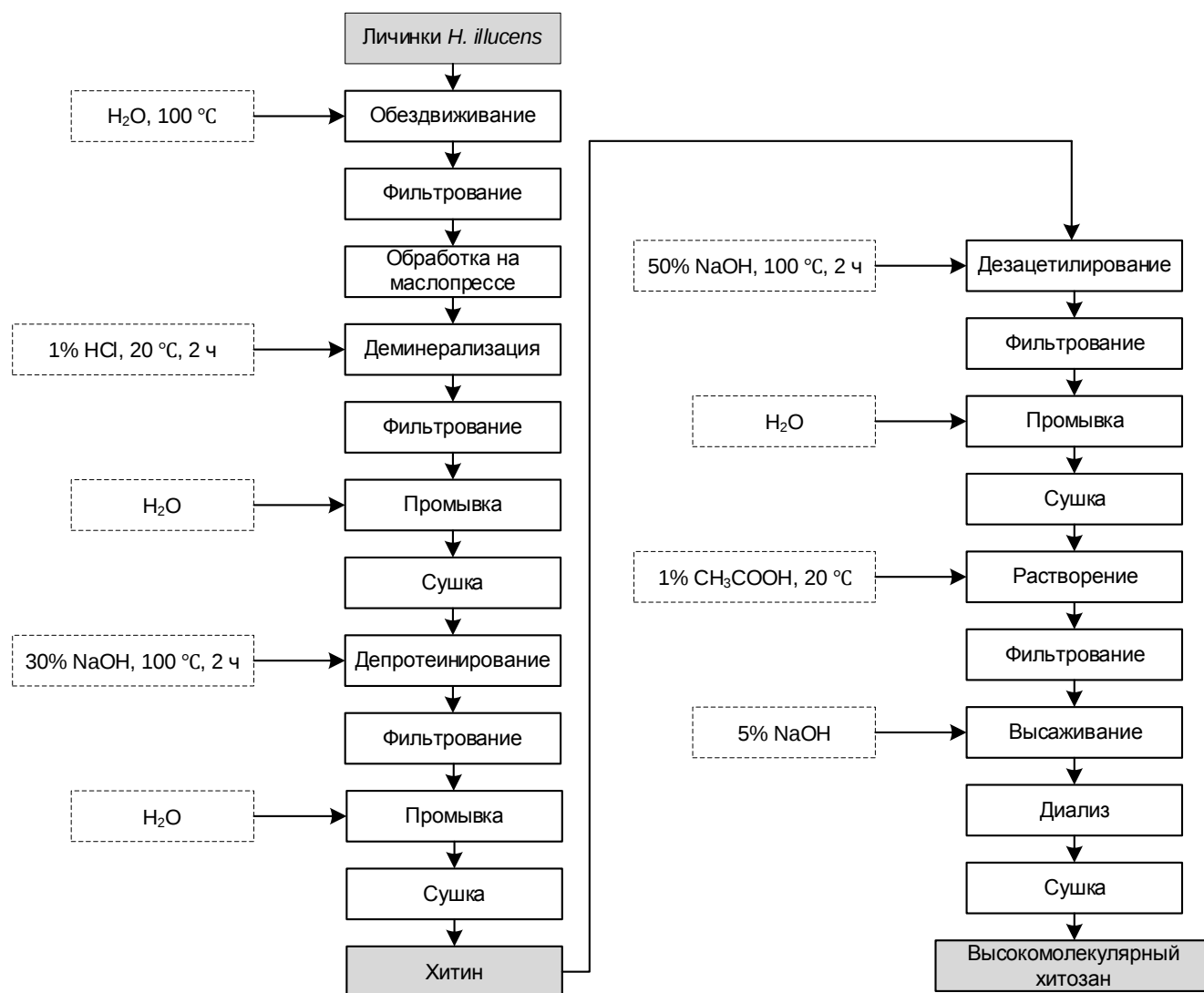


Рис. 27. Технологическая схема получения высокомолекулярного хитозана из личинок *H.illucens*.

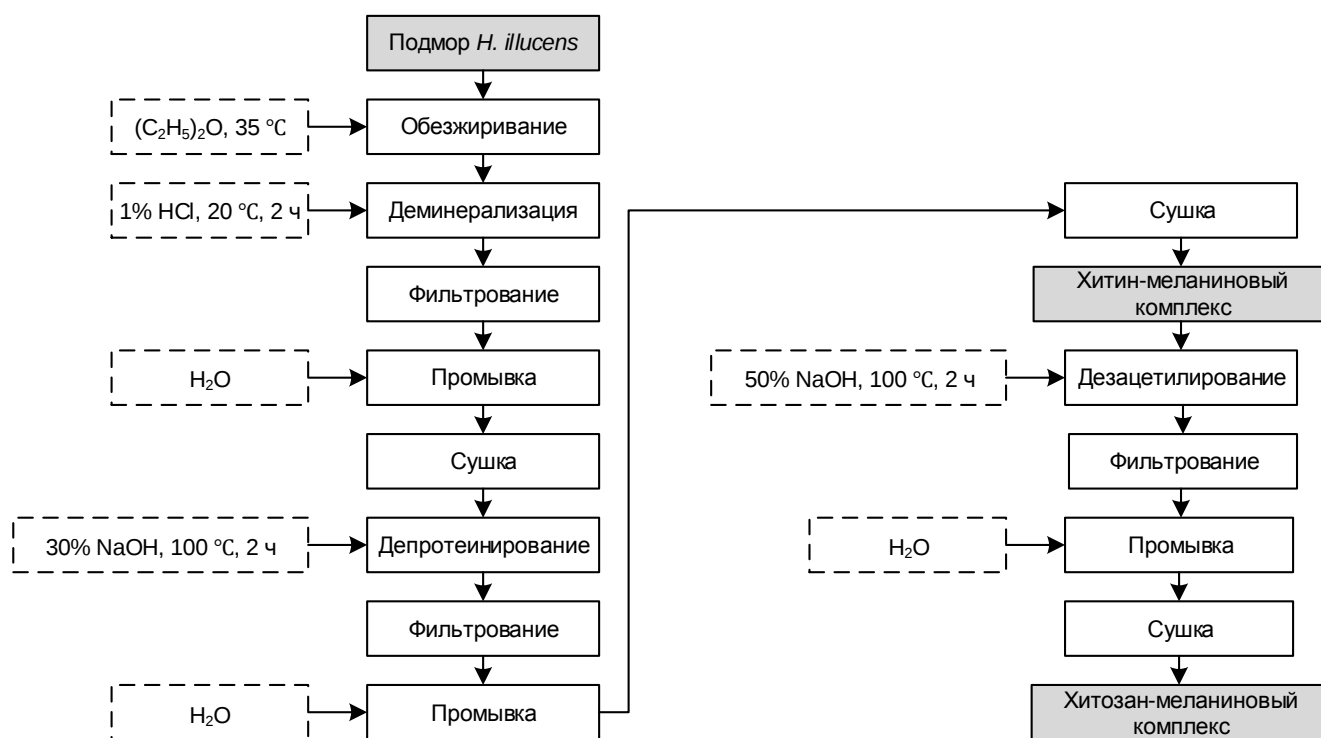


Рис. 28. Технологическая схема получения хитозан-меланинового комплекса из подмора *H. illucens*.

3.3.1. Экономическая модель производства

В настоящее время производство хитин- и хитозан-меланиновых комплексов предлагаемым способом на территории России не осуществляется. Технологическая особенность позволяет наладить промышленное производство в короткие сроки. Инвестиции на осуществление данного проекта составят не более 550 тыс. руб. при производстве до 460 кг хитозан-меланинового комплекса в год. Основными потенциальными партнерами реализации проекта являются ООО «Биогенезис» и ООО «Энтопротэк». Особенностью привлечения инвестиций в данном направлении является то, что в настоящее время партнерами на опытно-промышленном производстве налажено промышленное производство необходимого сырья, есть возможность контролировать производственный процесс и изменять качественные и количественные показатели при необходимости. Коммерческим партнером для создания и выпуска косметических средств на основе хитозан-меланинового комплекса выступит АО «Свобода».

Экономическая модель производства хитозан-меланиновых комплексов из подмора при переработке 15 т отходов в сутки представлена в Табл. 15.

Основной экономический эффект от реализации проекта заключается в получении высокомаржинальных продуктов в связи с отсутствием аналогов производства как на отечественном, так и зарубежном рынке. В дальнейшем проект планируется масштабировать и получать не менее 3 т хитозан-меланиновых комплексов в год, что позволит наладить экспорт продуктов за рубеж.

Главный социальный эффект от реализации проекта состоит в решении вопроса переработки органических отходов, сокращении выброса парниковых газов в атмосферу и популяризации темы охраны окружающей среды в нашей стране. Потенциальный риск масштабирования технологии существует, но будет минимизирован при поэтапном увеличении объемов производства.

Табл. 15. Экономическая модель производства хитозан-меланиновых комплексов в год на производственной площадке ООО «Биогенезис».

Выход готовой продукции	Единица измерения	Значение
Подмор	кг	5,330
Хитозан-меланиновый комплекс	кг	460
Расходы на растворение	тыс. руб.	2,877
Диэтиловый эфир (петролейный)	л	13,325
1% HCl	л	37,310
30% NaOH	л	32,460
50% NaOH	л	2,434.48
Себестоимость хитозан-меланинового комплекса	тыс руб/кг	9
Расходы капитального характера	тыс. руб. с НДС	550
Лаборатория	тыс. руб. с НДС	150
Оборудование	тыс. руб. с НДС	400

Продолжение Табл. 15

Выход готовой продукции	Единица измерения	Значение
<i>Амортизация в среднем</i>	<i>тыс. руб.</i>	72
Расходы	тыс. руб.	3,647
Доходы	тыс. руб.	3,920
Хитозан-меланиновый комплекс	тыс. руб.	1,972
Прибыль без учета кап. затрат	тыс. руб.	272
Рентабельность	%	7
Маржинальность	%	7
Процент по кредиту	%	12
Прибыль после уплаты % по кредитам	тыс. руб.	214
Окупаемость проекта	год	2,18
Реализация		
Хитозан-меланиновый комплекс	руб/кг	9,000

Выводы

1. Разработаны основы технологии получения хитина, хитозана и их меланиновых комплексов на разных стадиях развития насекомого черная львинка *Hermetia illucens*.
2. Определены структура и подтверждена чистота биополимеров – хитина, хитозана и их меланиновых комплексов, выделяемых из *H. illucens*.
3. Установлено, что чувствительность коллоидного раствора хитина из личинок львинки при использовании его в качестве субстрата для хитинолитических ферментов превышает аналогичные образцы из ракообразных в 2-13 раз.

4. Получены хитозаны с заданными молекулярными массами с помощью рекомбинантных штаммов продуцентов хитинолитических ферментов.
5. Установлена высокая противогрибная активность низкомолекулярного хитозана из черной львинки, превышающая аналогичную активность хитозана, получаемого из панцирей ракообразных.
6. Установлено, что подмор *H. illucens* является уникальным сырьем для получения ковалентно связанных хитин- и хитозан-меланиновых комплексов в промышленных масштабах.
7. Показана эффективность хитин-меланинового комплекса при сорбции радионуклидов (^{233}U и ^{90}S), а также усиленные фотопротекторные и антиоксидантные свойства хитозан-меланинового комплекса.
8. Показана совместимость хитозан-меланинового комплекса с рецептурами солнцезащитных и антивозрастных кремов, что делает возможность включения хитозан-меланинового комплекса в соответствующие рецептуры.

Заключение

В ходе диссертационного исследования получены и изучены физико-химические свойства хитина, хитозана, а также их меланиновых комплексов из мухи черная львинка на разных стадиях развития насекомого.

Разработаны технологические схемы по выделению данных биополимеров. Изучены антибактериальная и противогрибная активности образцов низкомолекулярного хитозана из *H. illucens*, полученных в результате деполимеризации новыми ферментными препаратами. Впервые охарактеризованы ковалентно связанные хитин- и хитозан-меланиновые комплексы и изучен ряд свойств – сорбционных для радионуклидов в первом случае, фотопротекторных и антиоксидантных – во втором. Предложено практическое применение хитозан-меланинового комплекса в косметической сфере: разработаны рецептуры кремов, обладающих солнцезащитными и антивозрастными свойствами.

Все исследуемые биополимеры являются экологически безопасными материалами.

Список сокращений

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДОФА – диоксифенилаланин

ДФПГ – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил

ИК – инфракрасный

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

ПМР – протонный магнитный резонанс

СА – степень ацетилирования

СВЧ – сверхвысокая частота

СДА – степень дезацетилирования

УФ – ультрафиолет

Хтз – хитозан из *H. illucens*

Хтз (кр) – хитозан из краба

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

I_p – индекс полидисперсности

SPF – sun protection factor/солнцезащитный фактор

MED – minimal erythema dose/минимальная эритемная доза

M_n – среднечисленная молекулярная масса

M_w – среднемассовая (средневесовая) молекулярная масса

Список литературы

1. Čičková H. et al. The use of fly larvae for organic waste treatment // *Waste Manag.* 2015. V. 35. P. 68–80.
2. Нос В. et al. Optimization of black soldier fly (*Hermetia illucens*) artificial reproduction // *PLoS One*. 2019. V. 14, № 4. P. 1–13.
3. Kumari S. et al. Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method // *Environ. Technol. Innov.* 2015. V. 3. P. 77–85.
4. Bastiaens L. et al. Sources of Chitin and Chitosan and their Isolation // *Chitin and Chitosan*. John Wiley & Sons, Ltd, 2019. P. 1–34.
5. Хитозан / Ред. К.Г. Скрябин, С.Н. Михайлов, В.П. Варламов. М.: Центр “Биоинженерия” РАН. 2013. 591 с.
6. Kumar M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications // *React. Funct. Polym.* 2000. V. 46. P. 1–27.
7. El Knidri H. et al. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 120. P. 1181–1189.
8. Solano F. Melanins: Skin Pigments and Much More—Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes // *New J. Sci.* 2014. V. 2014. P. 1–28.
9. Blumenberg M. Introductory Chapter: Melanin, a Versatile Guardian // *Melanin* / Ed.: Blumenberg M. Rijeka: IntechOpen, 2017.
10. Elieh-Ali-Komi D., Hamblin M.R. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials // *Int. J. Adv. Res.* 2016. V. 4, № 3. P. 411–427.
11. Croisier F., Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering // *Eur. Polym. J.* 2013. V. 49, № 4. P. 780–792.
12. Gonil P., Sajomsang W. Applications of magnetic resonance spectroscopy to chitin

- from insect cuticles // *Int. J. Biol. Macromol.* 2012. V. 51, № 4. P. 514–522.
13. Ramos Berger L.R. et al. Chitosan produced from *Mucorales* fungi using agroindustrial by-products and its efficacy to inhibit *Colletotrichum* species // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 108. P. 635–641.
 14. Kannan M. et al. Production and Characterization of Mushroom Chitosan Under Solid-State Fermentation Conditions // *Adv. Biol. Res. (Rennes)*. 2010. V. 4, № 1. P. 10–13.
 15. Kumirska J. et al. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan // *Mar. Drugs*. 2010. V. 8, № 5. P. 1567–1636.
 16. Bajaj M., Winter J., Gallert C. Effect of deproteination and deacetylation conditions on viscosity of chitin and chitosan extracted from *Crangon crangon* shrimp waste // *Biochem. Eng. J.* 2011. V. 56, № 1–2. P. 51–62.
 17. Hong Y., Ying T. Characterization of a chitin-glucan complex from the fruiting body of *Termitomyces albuminosus* (Berk.) Heim // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 134. P. 131–138.
 18. Abdou E.S., Nagy K.S.A., Elsabee M.Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources // *Bioresour. Technol.* 2008. V. 99, № 5. P. 1359–1367.
 19. Wang J., Chen C. Chitosan-based biosorbents: Modification and application for biosorption of heavy metals and radionuclides // *Bioresour. Technol.* 2014. V. 160. P. 129–141.
 20. Birolli W.G., Delezuk J.A.D.M., Campana-Filho S.P. Ultrasound-assisted conversion of alpha-chitin into chitosan // *Appl. Acoust.* 2016. V. 103. P. 239–242.
 21. Liao J., Huang H. A fungal chitin derived from *Herichium erinaceus* residue: Dissolution, gelation and characterization // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 152. P. 456–464.

22. Prasad K. et al. Weak gel of chitin with ionic liquid, 1-allyl-3-methylimidazolium bromide // *Int. J. Biol. Macromol.* 2009. V. 45, № 3. P. 221–225.
23. Mukesh C. et al. Choline chloride-thiourea, a deep eutectic solvent for the production of chitin nanofibers // *Carbohydr. Polym.* 2014. V. 103, № 1. P. 466–471.
24. Hu X. et al. Rheological behaviour of chitin in NaOH/urea aqueous solution // *Carbohydr. Polym.* 2011. V. 83, № 3. P. 1128–1133.
25. Huang L. et al. Preparation and characterization of chitosan from crab shell (*Portunus trituberculatus*) by NaOH/urea solution freeze-thaw pretreatment procedure // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 147. P. 931–936.
26. Wang Y. et al. Synthesis of chitosan molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction of methandrostenolone // *Carbohydr. Polym.* 2014. V. 101, № 1. P. 517–523.
27. Al-Manhel A.J., Al-Hilphy A.R.S., Niamah A.K. Extraction of chitosan, characterisation and its use for water purification // *J. Saudi Soc. Agric. Sci. King Saud University & Saudi Society of Agricultural Sciences*, 2018. V. 17, № 2. P. 186–190.
28. Shajahan A. et al. Comparative studies of chitosan and its nanoparticles for the adsorption efficiency of various dyes // *Int. J. Biol. Macromol.* 2017. V. 104. P. 1449–1458.
29. Bonilla J. et al. Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol-chitosan biodegradable films // *Food Hydrocoll.* 2014. V. 35. P. 463–470.
30. Niederhofer A., Müller B.W. A method for direct preparation of chitosan with low molecular weight from fungi // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004. V. 57, № 1. P. 101–105.
31. Zahra J. Chitosan: a brief review on structure and tissue engineering application //

- J. Appl. Tissue Eng. 2014. V. 1, № 1. P. 3–7.
32. Hijazi N. et al. Chitosan nanoparticles generation using CO₂ assisted processes // J. Supercrit. Fluids. 2014. V. 95. P. 118–128.
 33. Muxika A. et al. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications // Int. J. Biol. Macromol. 2017. V. 105. P. 1358–1368.
 34. Bano I. et al. Chitosan: A potential biopolymer for wound management // Int. J. Biol. Macromol. 2017. V. 102. P. 380–383.
 35. Luo Y., Wang Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery // Int. J. Biol. Macromol. 2014. V. 64. P. 353–367.
 36. Hu Q. et al. Chitosan-caseinate-dextran ternary complex nanoparticles for potential oral delivery of astaxanthin with significantly improved bioactivity // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 151. P. 747–756.
 37. Lunkov A. et al. Synthesis of silver nanoparticles using gallic acid-conjugated chitosan derivatives // Carbohydr. Polym. 2020. V. 234. P. 115916.
 38. Ma D. et al. Immobilized Ag NPs on chitosan-biguanidine coated magnetic nanoparticles for synthesis of propargylamines and treatment of human lung cancer // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 165. P. 767–775.
 39. Del Prado-Audelo M.L. et al. Chitosan-decorated nanoparticles for drug delivery // J. Drug Deliv. Sci. Technol. 2020. V. 59. P. 101896.
 40. Saraf S. et al. Lipopolysaccharide derived alginate coated Hepatitis B antigen loaded chitosan nanoparticles for oral mucosal immunization // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 154. P. 466–476.
 41. Rashki S. et al. Chitosan-based nanoparticles against bacterial infections // Carbohydr. Polym. 2021. V. 251. P. 117108.

42. Qu B., Luo Y. Chitosan-based hydrogel beads: Preparations, modifications and applications in food and agriculture sectors – A review // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 152. P. 437–448.
43. Ahmed M.E.S. et al. Sustainable antimicrobial modified chitosan and its nanoparticles hydrogels: Synthesis and characterization // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 162. P. 1388–1397.
44. Beer B. et al. Controlled enzymatic hydrolysis and synthesis of lignin cross-linked chitosan functional hydrogels // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 161. P. 1440–1446.
45. Li Y. et al. Anticoagulant chitosan-kappa-carrageenan composite hydrogel sorbent for simultaneous endotoxin and bacteria cleansing in septic blood // *Carbohydr. Polym.* 2020. V. 243. P. 116470.
46. Liu Q. et al. Rapid gelling, self-healing, and fluorescence-responsive chitosan hydrogels formed by dynamic covalent crosslinking // *Carbohydr. Polym.* 2020. V. 246. P. 116586.
47. Deng A. et al. Preparation of a recombinant collagen-peptide (RHC)-conjugated chitosan thermosensitive hydrogel for wound healing // *Mater. Sci. Eng. C.* 2021. V. 119. P. 111555.
48. Younes I., Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications // *Mar. Drugs.* 2015. V. 13, № 3. P. 1133–1174.
49. Duong N.T.H., Nghia N.D. Kinetics and Optimization of the Deproteinization by Pepsin in Chitin Extraction from White Shrimp Shell // *J. Chitin Chitosan Sci.* 2014. V. 2, № 1. P. 21–28.
50. Guo N. et al. Recovery of Chitin and Protein from Shrimp Head Waste by Endogenous Enzyme Autolysis and Fermentation // *J. Ocean Univ. China.* 2019. V. 18, № 3. P. 719–726.

51. No H.K., Hur E.Y. Control of Foam Formation by Antifoam during Demineralization of Crustacean Shell in Preparation of Chitin // *J. Agric. Food Chem.* 1998. V. 46, № 9. P. 3844–3846.
52. Percot A., Viton C., Domard A. Optimization of chitin extraction from shrimp shells // *Biomacromolecules*. 2003. V. 4, № 1. P. 12–18.
53. Roberts G.A.F. Preparation of Chitin and Chitosan // *Chitin Chemistry*. London: Macmillan Education UK, 1992. P. 54–84.
54. Okafor N. Isolation of Chitin from the Shell of the Cuttlefish // *Biochim. Biophys. Acta*. 1965. V. 101. P. 193–200.
55. Truong T.O. et al. Valorisation des résidus industriels de pêches pour la transformation de chitosane par technique hydrothermo-chimique The valorization of industrial fishery waste through the hydrothermal-chemical transformation of chitosan // *Rev. des Sci. l'eau*. 2007. V. 20, № 3. P. 253.
56. St. Leger R.J., Cooper R.M., Charnley A.K. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Regulation of production of chitinolytic enzymes // *J. Gen. Microbiol.* 1986. V. 132, № 6. P. 1509–1517.
57. Merzendorfer H., Zimoch L. Chitin metabolism in insects: Structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases // *J. Exp. Biol.* 2003. V. 206, № 24. P. 4393–4412.
58. Kramer K.J., Hopkins T.L., Schaefer J. Applications of solids NMR to the analysis of insect sclerotized structures // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1995. V. 25, № 10. P. 1067–1080.
59. Liu S. et al. Extraction and characterization of chitin from the beetle *Holotrichia parallela motschulsky* // *Molecules*. 2012. V. 17, № 4. P. 4604–4611.
60. Zhang M. et al. Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia // *Int. J. Biol. Macromol.* 2000. V. 27, № 1.

P. 99–105.

61. Sajomsang W., Gonil P. Preparation and characterization of α -chitin from cicada sloughs // *Mater. Sci. Eng. C*. 2010. V. 30, № 3. P. 357–363.
62. Andersen S.O. Biochemistry of Insect Cuticle // *Annu. Rev. Entomol.* 1979. V. 24, № 1. P. 29–59.
63. Meredith P., Sarna T. The physical and chemical properties of eumelanin // *Pigment Cell Res.* 2006. V. 19, № 6. P. 572–594.
64. Wigglesworth V.B. The Insect Cuticle // *Biol. Rev.* 1948. V. 23, № 4. P. 408–451.
65. Sugumaran M. Unified Mechanism for Sclerotization of Insect Cuticle / Ed.: Evans P.D. Academic Press, 1998. V. 27. P. 229–334.
66. Sugumaran M. Comparative Biochemistry of Eumelanogenesis and the Protective Roles of Phenoloxidase and Melanin in Insects // *Pigment Cell Res.* 2002. V. 15, № 1. P. 2–9.
67. Nappi A.J., Christensen B.M. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2005. V. 35, № 5. P. 443–459.
68. Eleftherianos I., Revenis C. Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis // *J. Innate Immun.* 2011. V. 3, № 1. P. 28–33.
69. Riesz J., Gilmore J., Meredith P. Quantitative scattering of melanin solutions // *Biophys. J.* 2006. V. 90, № 11. P. 4137–4144.
70. Cordero R.J.B. et al. Impact of Yeast Pigmentation on Heat Capture and Latitudinal Distribution // *Curr. Biol.* 2018. V. 28, № 16. P. 2657–2664.
71. White L.P. Melanin: A naturally occurring cation exchange material // *Nature*. 1958. V. 182, № 4647. P. 1427–1428.
72. Ye T., Simon J.D. Comparison of the ultrafast absorption dynamics of eumelanin

- and pheomelanin // J. Phys. Chem. B. 2003. V. 107, № 40. P. 11240–11244.
73. Sarna T., Swartz H.A. The Physical Properties of Melanins // The Pigmentary System. John Wiley & Sons, Ltd, 2006. P. 311–341.
 74. d'Ischia M. et al. Chemical and Structural Diversity in Eumelanins: Unexplored Bio-Optoelectronic Materials // Angew. Chemie Int. Ed. 2009. V. 48, № 22. P. 3914–3921.
 75. Panzella L. et al. The late stages of melanogenesis: Exploring the chemical facets and the application opportunities // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19, № 6. P. 1753.
 76. Kurchenko V.P. et al. Physicochemical properties of chitin-melanin and melanoprotein complexes from bee corpses // Appl. Biochem. Microbiol. 2006. V. 42, № 3. P. 331–334.
 77. Draczynski Z. Honeybee Corpses as an Available Source of Chitin // J. Appl. Polym. Sci. 2008. V. 109. P. 1974–1981.
 78. Kovaleva E. et al. Characterization of chitin and its complexes extracted from natural raw sources // AIP Conf. Proc. 2016. V. 1772. P. 050007.
 79. Селионова М.И., Погарская Н.В. Патент РФ № 2382051 от 20.02.2010. Способ получения хитозан-меланинового комплекса из подмора пчел. Бюл. № 5.
 80. Погарская Н.В., Селионова М.И., Бинатова В.В. Получение хитозан-меланинового комплекса из подмора пчел и определение его физико-химических и биологических характеристик // Веткорм. 2008. Т. 6. С. 28–29.
 81. Вохидова Н.Р. и др. Фунгицидные Свойства Наносистем Хитозана Bombyx Mori с Ионами Меди // Микробиология. 2014. Т. 83, № 6. С. 653–655.
 82. Paulino A.T. et al. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides // Carbohydr. Polym. 2006. V. 64, № 1. P. 98–103.
 83. Li Q. et al. From organic waste to biodiesel: Black soldier fly, *Hermetia illucens*,

- makes it feasible // *Fuel*. 2011. V. 90, № 4. P. 1545–1548.
84. Waśko A. et al. The first report of the physicochemical structure of chitin isolated from *Hermetia illucens* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2016. V. 92. P. 316–320.
 85. Caligiani A. et al. Composition of black soldier fly prepupae and systematic approaches for extraction and fractionation of proteins, lipids and chitin // *Food Res. Int.* 2018. V. 105. P. 812–820.
 86. D'Hondt E. et al. Simplified determination of the content and average degree of acetylation of chitin in crude black soldier fly larvae samples // *Carbohydr. Res.* 2020. V. 488. P. 107899.
 87. Hahn T. et al. Chitosan production with larval exoskeletons derived from the insect protein production // *J. Biotechnol.* 2020. V. 310. P. 62–67.
 88. Wang H. et al. Physicochemical structure of chitin in the developing stages of black soldier fly // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 149. P. 901–907.
 89. Nafisah A. et al. Chemical composition, chitin and cell wall nitrogen content of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) larvae after physical and biological treatment // *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 2019. V. 546. P. 42028.
 90. Бастратов 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. Т. 4. С. 77–79.
 91. Ushakova N. et al. Antioxidative properties of melanins and ommochromes from black soldier fly *hermetia illucens* // *Biomolecules*. 2019. V. 9, № 9. P. 408.
 92. Khayrova A., Lopatin S., Varlamov V. Black Soldier Fly *Hermetia illucens* as a Novel Source of Chitin and Chitosan // *Int. J. Sci.* 2019. V. 8, № 4. P. 81–86.
 93. Хайрова А.Ш. и др. Получение хитина из черной львинки *Hermetia Illucens* путем прямой экстракции // *Известия Уфимского Научного Центра РАН*.

2018. T. 3, № 2. C. 84–87.
94. Khayrova A., Lopatin S., Varlamov V. Obtaining Chitin/Chitosan-Melanin Complexes from Black Soldier Fly *Hermetia Illucens* // IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng. 2020. V. 809, № 1. P. 012020.
 95. Majtán J. et al. Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*) // Int. J. Biol. Macromol. 2007. V. 40, № 3. P. 237–241.
 96. Greven H. et al. Characterization of tongue worm (Pentastomida) chitin supports α - rather than β -chitin // Zool. Anz. 2019. V. 279. P. 111–115.
 97. Soon C.Y. et al. Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan from *Zophobas morio* larvae in varying sodium hydroxide concentration // Int. J. Biol. Macromol. 2018. V. 108. P. 135–142.
 98. Kaya M. et al. Changes in physicochemical properties of chitin at developmental stages (larvae, pupa and adult) of *Vespa crabro* (wasp) // Carbohydr. Polym. 2016. V. 145. P. 64–70.
 99. Kaya M. et al. Physicochemical comparison of chitin and chitosan obtained from larvae and adult Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) // Mater. Sci. Eng. C. 2014. V. 45. P. 72–81.
 100. Kaya M., Baran T. Description of a new surface morphology for chitin extracted from wings of cockroach (*Periplaneta americana*) // Int. J. Biol. Macromol. 2015. V. 75. P. 7–12.
 101. Шагдарова Б.Ц. и др. Патент РФ № 2627870 от 14.08.2017. Способ получения низкомолекулярного хитозана и олигомеров хитозана. Бюл. № 23.
 102. Somogyi M. A new reagent for the determination of sugars // J. Biol. Chem. 1952. V. 195. P. 19–23.
 103. Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of sugars // J. Biol. Chem. 1944. V. 153. P. 375–379.

104. Marei N.H. et al. Isolation and characterization of chitosan from different local insects in Egypt // *Int. J. Biol. Macromol.* 2016. V. 82. P. 871–877.
105. Lyalina T. et al. Correlation Analysis of Chitosan Physicochemical Parameters Determined by Different Methods // *Org. Med. Chem. Int. J.* 2017. V. 1, № 3. P. 555562.
106. Taylor I., Howard A.G. Measurement of primary amine groups on surface-modified silica and their role in metal binding // *Anal. Chim. Acta.* 1993. V. 271, № 1. P. 77–82.
107. Климова В.А. Основные микрометоды анализа органических соединений // М.:Химия. 1975. 224 с.
108. Hirai A., Odani H., Nakajima A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by ^1H NMR spectroscopy // *Polym. Bull.* 1991. V. 26, № 1. P. 87–94.
109. Porębska-Budny M. et al. Antioxidative activity of synthetic melanins. Cardiolipin liposome model // *BBA - Gen. Subj.* 1992. V. 1116, № 1. P. 11–16.
110. Veleshko A.N. et al. Interaction of radionuclides with some functional derivatives of chitosan in solutions // *Radiochemistry.* 2009. V. 51, № 5. P. 490–495.
111. Manivasagan P. et al. Isolation and characterization of biologically active melanin from *Actinoalloteichus* sp. MA-32 // *Int. J. Biol. Macromol.* 2013. V. 58. P. 263–274.
112. Shagdarova B.T., Il'ina A. V, Varlamov V.P. Antibacterial Activity of Alkylated and Acylated Derivatives of Low-Molecular Weight Chitosan // *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 2016. V. 52, № 2. P. 237–241.
113. Karpova N. V et al. Influence of the Main Characteristics of Low Weight Chitosan on the Growth of the Plant Pathogenic Fungus *Botrytis cinerea* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019. V. 55, № 4. P. 405–413.
114. Курченко В.П. и др. Технологические основы получения хитина и хитозана

из насекомых. 2016. Т. 11, № 1. С. 110–126.

115. Hackman R.H. Chemistry of insect cuticle. III. Hardening and darkening of the cuticle. // *Biochem. J.* 1953. V. 54, № 3. P. 371–377.
116. Poshina D.N. et al. Accessibility of chitin and chitosan in enzymatic hydrolysis: A review // *Polym. Degrad. Stab.* 2018. V. 156. P. 269–278.
117. Ribas Fonseca L. et al. Modulating properties of polysaccharides nanocomplexes from enzymatic hydrolysis of chitosan // *Food Res. Int.* 2020. V. 137. P. 109642.
118. Kim S.K., Rajapakse N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review // *Carbohydr. Polym.* 2005. V. 62, № 4. P. 357–368.
119. Tømmeraas K. et al. Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans // *Carbohydr. Res.* 2001. V. 333, № 2. P. 137–144.
120. Cabrera J.C., Van Cutsem P. Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan // *Biochem. Eng. J.* 2005. V. 25, № 2. P. 165–172.
121. Roncal T. et al. High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis of a high deacetylation degree chitosan // *Carbohydr. Res.* 2007. V. 342, № 18. P. 2750–2756.
122. Kuo C.H., Chen C.C., Chiang B.H. Process characteristics of hydrolysis of chitosan in a continuous enzymatic membrane reactor // *J. Food Sci.* 2004. V. 69, № 7. P. 332–337.
123. Ming M. et al. Production of chitosan oligosaccharides by chitosanase directly immobilized on an agar gel-coated multidisk impeller // *Biochem. Eng. J.* 2006. V. 28, № 3. P. 289–294.
124. Saharan V. et al. Synthesis of chitosan based nanoparticles and their in vitro

- evaluation against phytopathogenic fungi // *Int. J. Biol. Macromol.* 2013. V. 62. P. 677–683.
125. Xing K. et al. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of oleoyl-chitosan nanoparticles against plant pathogenic fungi // *Int. J. Biol. Macromol.* 2016. V. 82. P. 830–836.
 126. Badawy M.E.I., Rabea E.I. Characterization and antimicrobial activity of water-soluble N-(4-carboxybutyryl) chitosans against some plant pathogenic bacteria and fungi // *Carbohydr. Polym.* 2012. V. 87, № 1. P. 250–256.
 127. Rabea E.I. et al. In vitro assessment of N-(benzyl)chitosan derivatives against some plant pathogenic bacteria and fungi // *Eur. Polym. J.* 2009. V. 45, № 1. P. 237–245.
 128. Badawy M.E.I. et al. Structure and antimicrobial comparison between N-(benzyl) chitosan derivatives and N-(benzyl) chitosan tripolyphosphate nanoparticles against bacteria, fungi, and yeast // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 186. P. 724–734.
 129. Binesh N., Farhadian N., Mohammadzadeh A. Enhanced stability of salt-assisted sodium ceftriaxone-loaded chitosan nanoparticles: Formulation and optimization by 32-full factorial design and antibacterial effect study against aerobic and anaerobic bacteria // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2021. V. 618. P. 126429.
 130. Hussein M.A.M. et al. Boosting the antibacterial activity of chitosan–gold nanoparticles against antibiotic-resistant bacteria by *Punicagranatum* L. extract // *Carbohydr. Polym.* 2021. V. 256. P. 117498.
 131. Etemadi S. et al. The synergistic effect of turmeric aqueous extract and chitosan against multidrug-resistant bacteria // *New Microbes New Infect.* 2021. V. 41. P. 100861.
 132. Kole S. et al. Nanoencapsulation of inactivated-viral vaccine using chitosan nanoparticles: Evaluation of its protective efficacy and immune modulatory effects in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against viral haemorrhagic septicaemia

- virus (VHSV) infection // *Fish Shellfish Immunol.* 2019. V. 91. P. 136–147.
133. Jia S. et al. Oral immunization of carps with chitosan–alginate microcapsule containing probiotic expressing spring viremia of carp virus (SVCV) G protein provides effective protection against SVCV infection // *Fish Shellfish Immunol.* 2020. V. 105. P. 327–329.
 134. Modak C. et al. Chitosan derivatives: A suggestive evaluation for novel inhibitor discovery against wild type and variants of SARS-CoV-2 virus // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 187. P. 492–512.
 135. Sharma N. et al. Underscoring the immense potential of chitosan in fighting a wide spectrum of viruses: A plausible molecule against SARS-CoV-2? // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 179. P. 33–44.
 136. Куликов С.Н. и др. Антибактериальное действие низкомолекулярного хитозана в отношении *Escherichia coli* // *Ученые Записки Казанского Университета.* 2013. Т. 155, № 3. С. 27–39.
 137. Marei N. et al. Enhanced antibacterial activity of Egyptian local insects' chitosan-based nanoparticles loaded with ciprofloxacin-HCl // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 126. P. 262–272.
 138. Matica A., Menghiu G., Ostafe V. Antibacterial Properties of Chitin and Chitosans // *Former Ann. West Univ. Timisoara-Series Chem.* 2017. V. 26, № 1. P. 39–54.
 139. Boddy L. Chapter 8 - Pathogens of Autotrophs // *The Fungi (Third Edition)*. Third Edit / Ed.: Watkinson S.C., Boddy L., Money N.P. Boston: Academic Press, 2016. P. 245–292.
 140. Jacobs K., Wingfield M.J., Gibbs J.N. PATHOLOGY | Vascular Wilt Diseases // *Encyclopedia of Forest Sciences* / Ed.: Burley J. Oxford: Elsevier, 2004. P. 766–772.
 141. Herrling T., Jung K., Fuchs J. The role of melanin as protector against free radicals

- in skin and its role as free radical indicator in hair // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2008. V. 69, № 5. P. 1429–1435.
142. Бакулин А.В. и др. Физико-химические характеристики хитозан-меланиновых комплексов // *Труды Белорусского государственного университета.* 2009. Т. 4, № 2. С. 290–297.
 143. Manzanares J.A., Rimpelä A.K., Urtti A. Interpretation of Ocular Melanin Drug Binding Assays. Alternatives to the Model of Multiple Classes of Independent Sites // *Mol. Pharm.* 2016. V. 13, № 4. P. 1251–1257.
 144. De Aguiar H.B. et al. Surface structure of sodium dodecyl sulfate surfactant and oil at the oil-in-water droplet liquid/liquid interface: A manifestation of a nonequilibrium surface state // *J. Phys. Chem. B.* 2011. V. 115, № 12. P. 2970–2978.
 145. Велешко И.Е. и др. Сорбция радионуклидов хитин-меланин глюкановым комплексом Микотон // *Химия растительного сырья.* 2011. Т. 4. С. 39–48.
 146. Piron E., Domard A. Interaction between chitosan and uranyl ions: Part 1. Role of physicochemical parameters // *Int. J. Biol. Macromol.* 1997. V. 21, № 4. P. 327–335.
 147. Tsezos M., Volesky B. Biosorption of Uranium and Thorium // *Biotechnol. Bioeng.* 1981. V. 23. P. 583–604.
 148. Tsezos M., Volesky B. The mechanism of uranium biosorption by *Rhizopus arrhizus*. // *Biotechnol. Bioeng.* 1982. V. 24. P. 955–969.
 149. Bakulin A. V. et al. Production of chitin—melanin complexes from *Apis mellifera* and study of the possibility of using them as radionuclide sorbents // *Russ. Agric. Sci.* 2011. V. 37, № 5. P. 423–426.
 150. Rózanowska M. et al. Free radical scavenging properties of melanin interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals // *Free Radic.*

Biol. Med. 1999. V. 26, № 5/6. P. 518–525.

151. Ищенко А.А., Свиридова А.А. Солнцезащитные средства. II. Неорганические УФ-фильтры и их композиции с органическими протекторами. // Известия высших учебных заведений. 2006. Т. 49, № 12. С. 3–16.
152. Heurung A.R., Raju S.I., Warshaw E.M. Adverse Reactions to Sunscreen Agents: Epidemiology, Responsible Irritants and Allergens, Clinical Characteristics, and Management // Dermatitis. 2014. V. 25, № 6. P. 289–326.
153. Cefali L.C. et al. Plant-based active photoprotectants for sunscreens // Int. J. Cosmet. Sci. 2016. V. 38, № 4. P. 346–353.