

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК ТАДЖИКИСТАНА

Институт химии им В.И. Никитина

---

УДК 577.12:544.773

На правах рукописи



**Шерова Замира Умаралиевна**

**ЭКСТРАКЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРИЦИНА ИЗ  
ШЕЛКОВЫХ ОТХОДОВ И КОМПОЗИЦИОННЫЕ  
МАТЕРИАЛЫ НА ЕГО ОСНОВЕ**

Диссертация

на соискание ученой степени доктора философии (PhD) - доктор по  
специальности 6D060600 – Химия (6D060606 – Высокомолекулярные  
соединения)

Научный руководитель:

*доктор химических наук, профессор  
Мухидинов З. К.*

Душанбе – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>5</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>7</b>
<b>ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....</b>	<b>14</b>
1.1. Краткая характеристика белков кокона тутового шелкопряда .....	14
1.1.1. Перспективы развития шелководства в Таджикистане .....	14
1.1.2. Химический состав коконов тутового шелкопряда .....	16
1.1.3. Фиброин (шелковая нить) .....	18
1.1.4. Шелковый серицин .....	22
1.1.5. Физико-химические свойства шелкового серицина .....	24
1.1.6. Методы экстракции серицина .....	26
1.2. Применение шелкового серицина .....	30
1.2.1. Биомедицинское направление применения серицина .....	30
1.2.2. Композиционные материалы на основе биополимеров.....	38
1.2.3. Композиционные материалы на основе серицина шёлка.....	39
1.2.4. Инкапсуляция биологически активных соединений (БАС) в биополимерных композитах .....	42
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>44</b>
2.1. Характеристика исходных веществ .....	44
2.2. Приготовление исходных растворов.....	44
2.2.1. Приготовление раствора серицина .....	44
2.2.2. Приготовление раствора пектина.....	44
2.2.3. Приготовление раствора полифенольных соединений.....	45
2.2.4. Приготовление буферных растворов .....	45
2.3. Методы получения серицина.....	45
2.3.1. Обезжиривание коконных оболочек тутового шелкопряда.....	45
2.3.2. Экстрагирование серицина из коконных оболочек тутового шелкопряда .....	46
2.4. Методы анализа серицина.....	47
2.4.1. Определение общего количества белка по методу Bradford.....	47
2.4.2. Определение относительной вязкости раствора серицина. ....	50
2.4.3. Определение белков спектрофотометрическим методом [98].....	50
2.4.4. Определение белков электрофоретическим методом.....	51

2.4.5. ИК- Фурье спектроскопия белка серицина .....	52
2.4.6. Определение молекулярной массы серицина .....	52
2.4.7. Определение молекулярной массы и молекулярно-массового распределения образцов серицина методом турбидиметрии.....	53
2.5. Эмульсионные микрокапсулы, стабилизированные комплексом белка и пектина .....	55
2.5.1. Приготовление эмульсионных микрокапсул в системе масло в воде (м/в) .....	55
2.5.2. Оценка стабильности эмульсий .....	55
2.6. Определение общей суммы полифенольных соединений методом Фолин- Чокальтеу .....	56
2.7. Методика разделения полифенольных соединений на капиллярном электрофорезе.....	58
2.8. Исследование антиоксидантной активности полифенольных соединений .....	59
2.9. Статистический анализ.....	60
<b>ГЛАВА 3. ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРИЦИНА ИЗ ШЁЛКОВЫХ ОТХОДОВ.....</b>	<b>62</b>
3.1. Выделение серицина из отходов шёлка.....	62
3.1.1. Сравнительный анализ выхода серицина из коконных оболочек при различных условиях экстракции (дегуммирование).....	63
3.1.2. Анализ физико-химических и гидродинамических свойств раствора серицина во время экстракции .....	68
3.2. Анализ фракционного состава серицина, выделенного различными методами .....	71
3.2.1. Определение общего количества белка.....	72
3.2.2. Изучение структуры образцов серицина методом ИК-Фурье спектроскопией .....	75
3.2.3. Молекулярная масса и молекулярно-массовое распределение серицина .....	84
3.2.4. Анализ поведения макромолекулы серицина в концентрированном растворе.....	92
<b>ГЛАВА 4. ПРИМЕНЕНИЕ СЕРИЦИНА В КАЧЕСТВЕ КОМПОЗИЦИОННОГО МАТЕРИАЛА.....</b>	<b>101</b>
4.1. Система доставки лекарств на основе серицина .....	101

4.1.1. Эмульсионное микро- и нано- капсулирование БАС с применением серицина для лечебных целей и хранения пищевых продуктов.....	103
4.1.2. Потенциал белково-полисахаридного комплекса как средства доставки БАС .....	106
4.2. Формирование и характеристика микрокапсул, полученных на основе НМ-пектина и серицина для инкапсуляции ЛВ и БАС .....	109
4.2.1. Эмульсионные микрокапсулы в системе масло в воде стабилизированные комплексом серицина и пектина .....	110
4.3. Инкапсулирование ПФС в эмульсионных микрокапсулах и оценка антиоксидантной активности.....	117
4.3.1. Химический состав полифенольных соединений прополиса .....	117
4.3.2. Определение антиоксидантной активности эмульсионных микрокапсул, содержащих ПФС .....	120
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>124</b>
<b>ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>127</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ.....</b>	<b>156</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

**АК** - аминокислота

**АОА** - антиоксидантная активность

**БАС** – биологически активные соединения

**БСА** - бычий сывороточный альбумин

**ВМ** - высокометилованный

**ВЭЭЖХ** - высокоэффективная эксклюзионная жидкостная хроматография

**ИК-Фурье спектроскопия** – инфракрасная спектроскопия с Фурье преобразованием

**ЖВВ** - жиро-восковые вещества

**КЗЭ** - капиллярный зонный электрофорез

**КС** - клеточная стенка

**ЛВ** – лекарственное вещество

**ММР** - молекулярно-массовое распределение

**НПВО** - нарушенное полное внутреннее отражение

**НД** - низкое давление

**НМ** - низкометилованный

**НМПЯ** - низкометилованный пектин из яблочных выжимок

**ПВС** - поливиниловый спирт

**ПФС** - полифенольные соединения

**СДЛ** - система доставки лекарств

**СНД** – серицин осажденный из раствора экстракта концентрированного при низком давлении

**СРЦ** - серицин

**ССНД** – спирторастворимая часть серицина, полученная после упаривания спиртового раствора образца СНД

**ССУФ** – спирторастворимая часть серицина, полученная после упаривания спиртового раствора образца СУФ

**СУФ** - серицин осажденный из раствора экстракта после ультрафильтрации

**СЭМ** - сканирующая электронная микроскопия

**ТМ** - традиционный метод

**ТС** -тепловой стресс

**УСДЛ** - усовершенствованная система доставки лекарств

**УФМ** - ультрафильтрационная мембрана

**УФ-спектроскопия** - ультрафиолетовая спектроскопия

**ФМ** - флэш-метод

**ФУФ** - серицин осажденный из раствора фильтрата после ультрафильтрации

**NTU** - нефелометрическая единица

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Шелкопряд Тутовника (*Bombyx mori*) продуцирует и выделяет два типа белка — фиброин и серицин. Серицин шёлка представляет собой природный полимер, синтезируемый тутовым шелкопрядом (*Bombyx mori*). Он выполняет функцию связывающего вещества, обволакивая и скрепляя два фиброиновых волокна, формирующих шелковую нить, которая используется для построения кокона.

Серицин представляет собой водорастворимый гликопротеин и составляет от 25 до 30% массы кокона. В его состав входят 18 аминокислот с полярными боковыми группами, такими как гидроксильные, карбоксильные и аминогруппы, которые делают его гидрофильным белком [1]. Он содержит большое количество серина, аспарагиновой кислоты и глицина. В своей структуре серицин является глобулярным белком, состоящим из случайно свивающихся клубков и  $\beta$ -листов. Молекулярная масса серицина зависит от метода его экстракции, при этом преобладающими аминокислотными группами являются серин, глицин и глутаминовая кислота. Существует диапазон 40-400 кДа.

Повторное применение и рекуперация серицина, который обычно отбрасывается в текстильной индустрии, не только снижает экологические проблемы, но и обладает значительной научной и коммерческой ценностью.

Серицин, являясь водорастворимым белком, получаемым из коконов шелкопряда, обладает множеством физико-химических свойств, что делает его перспективным для применения в различных областях, включая биомедицину. Эти свойства в значительной степени зависят от метода экстракции и сорта шелкопряда, что может приводить к изменениям в молекулярном весе и концентрации аминокислот. Серицин содержит как гидрофобные, так и гидрофильные аминокислоты, что придаёт ему уникальные увлажняющие свойства. Благодаря антиоксидантному потенциалу, он активно используется в пищевой и косметической промышленности, а также в медицинских целях. Например, серицин применяется для заживления ран, стимулирования клеточной пролиферации и защиты кожи от ультрафиолетового излучения. Его

антиоксидантные свойства открывают возможности для использования серицина в терапии злокачественных опухолей, а также в качестве противомикробного и противовоспалительного средства. Кроме того, серицин демонстрирует потенциал в облегчении состояния пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта, такими как колит, и может способствовать улучшению липидного профиля и защите от ожирения. Серицин находит применение в тканевой инженерии, криоконсервации, в качестве среды для культур клеток и для доставки лекарств, демонстрируя его широкие возможности как важного биоматериала в современных медицинских технологиях [1–5].

Согласно данным Агентства по статистике, в 1991 году в Республике Таджикистан было произведено 4 528 тонн коконов. Однако к 2023 году, по информации ОАО «Пиллаи Точик», объём урожая значительно уменьшился до 361 тонн, что указывает на заметное сокращение производства шелковичных коконов в стране. На сегодняшний день на предприятиях по производству шёлка Республики Таджикистан лишь 10–15% коконов относятся к высшей и первой категориям. Основная часть сырья представлена коконами второго и третьего качества. Это приводит к существенному росту доли потерь шёлкового волокна при их обработке на специализированных фабриках. Уровень отходов в производственной сфере страны достигает 25–30% от общего объёма выпускаемой продукции [6].

По сведениям Агентства по статистике при Президенте Республики Таджикистан фабрики по производству шёлка из года в год накапливают более 150 тонн отходов из шелка, например, неразмотанные коконы, волокнистые остатки кокономотания, куколки и другой утиль. Переработка данных отходов имеет большую экономическую важность, поскольку при соотношении на килограмм произведённого шёлка-сырца равняется свыше 1 кг побочных продуктов, требующих переработки.

Благодаря своим нескольким присущим свойствам, таким как биосовместимость, биоразлагаемость, антимикробность, удаление радикалов,

устойчивость к ультрафиолетовому излучению, окислительная стойкость и способность поглощать влагу, серицин стал привлекательным продуктом для его универсального применения в различных областях, включая медицину, фармацевтику, косметику и текстильную промышленность [1–14].

Таким образом, разработка инновационной технологии переработки шёлка с извлечением из отходов новых продуктов с добавленной стоимостью — шёлковых нитей, композитных структур и клеевых составов, которые могут найти применение в различных отраслях экономики Республики Таджикистан является крайне значимым и востребованным направлением.

**Связь исследования с программами и научной тематикой.** Тема диссертационной работы включена в приоритетные направления научных и научно-технических исследований в Республике Таджикистан на период 2021-2025 годы. Решение данного вопроса направлено на развитие экономики, обеспечение продовольственной безопасности страны и создание функциональных пищевых продуктов и лекарственных препаратов.

Работа проводилась в соответствии с планом НИР ГНУ «Институт химии им. В.И. Никитина Национальной академии наук Таджикистана» на тему: «Создание носителей лекарственных веществ и пищевых ингредиентов на основе биополимеров» (номер гос. регистрации ГР 0116ТJ 00543).

**Целью данной работы является** разработка эффективного способа получения серицина, путем утилизации шелковых отходов и его характеристика для дальнейшего использования в качестве композиционного материала.

Для достижения данной цели были поставлены и решены следующие задачи:

- ~ разработка эффективных методов получения серицина, путем утилизации шелковых отходов кокомотальных предприятий Республики Таджикистан;
- ~ изучение физико-химических свойств полученного серицина;
- ~ изучение молекулярной массы серицина и его молекулярно-массового распределения;

- ~ разработка протеин-полисахаридного комплекса для использования как системы доставки биоактивных ингредиентов;
- ~ создание транспортных систем биологически активных соединений (БАС) и пищевых нутриентов на основе серицина с полисахаридами в виде эмульсионных нано- и микрокапсул и их характеристика.

**Объектами исследования являются** не утилизируемые отходы шёлка, образцы серицина, полученные различными методами, яблочный пектин, полифенольные соединения, экстракт прополиса, эмульсионные микрокапсулы, и другие средства и реагенты для проведения экспериментов.

**Методы исследования.** В работе были использованы различные методы гидролиз-экстракции серицина из отходов шелка: традиционные методы экстракции с применением воды и солей, новые методы экстракции – флэш метод, экстракция белка с применением ультразвука и др. Характеристика объектов исследования проводилась с применением современных методов, таких как высокоэффективная эксклюзионная жидкостная хроматография (ВЭЭЖХ), ИК-Фурье спектроскопия, микроскопия, турбидиметрическое титрование, вискозиметрия и др.

#### **Научная новизна работы.**

- Разработан эффективный метод получения серицина из шелковых отходов водной экстракцией в автоклаве при высокой температуре за короткое время;
- Исследована вторичная структура серицина методом ИК-Фурье спектроскопии. Впервые установлено существование структуры  $\beta$ -листа у образца из водного экстракта и структуры случайных клубков у щелочного экстракта;
- Проведён анализ молекулярной массы и гидродинамических свойств серицина в растворе методом ВЭЭЖХ. Обнаружено, что полипептиды серицина элюируются в трёх макромолекулярных популяциях, основная часть которых, приходится на вторую фракцию со средним значением молекулярной массы ( $M_w$ ) 19.4 – 19.8 кДа.

- Разработаны оптимальные условия формирования стабильных микрокапсул в эмульсионной системе «масло/вода» стабилизированной комплексом серицин/пектин с инкапсулированными биологически активными соединениями (полифенольные соединения - ПФС).
- Инкапсулированные ПФС в форме эмульсионных микрокапсул показали высокую антиоксидантную активность при минимальной концентрации, что подтверждает сохранение их терапевтических свойств.

### **Практическая ценность и реализация результатов.**

Восстановление и повторное использование серицина, обычно отбрасываемого текстильной промышленностью, не только сводит к минимуму экологические проблемы, но также имеет высокую научную и коммерческую ценность.

На основе анализа литературных данных и результатов настоящей работы показано, что серицин может найти применение для создания новых природных биоматериалов и носителей лекарств из-за их биоразлагаемости, биосовместимости, и низкой токсичности, также использоваться в качестве транспортных средств для обеспечения эффективной транспортировки лекарств и биоактивных веществ, для приготовления съедобных упаковок лекарственных веществ (ЛВ) и биологически активных соединений (БАС) для фармацевтического применения и функциональной пищи.

**Соответствие темы паспорту специальности.** Основная часть диссертационного исследования соответствует паспорту специальности 6D060606 – Высокомолекулярные соединения по пунктам 1, 5, 8 и 9 (1...конформации, размеры и формы макромолекул, молекулярно- массовое распределение полимеров; 5. Исследование молекулярной и надмолекулярной структуры биополимеров; 8... разработка новых методов изучения физико-химических свойств и других свойств; и 9. Целенаправленная разработка полимерных материалов с новыми функциями и интеллектуальных структур с их применением, обладающих характеристиками, определяющими области их использования в заинтересованных отраслях науки и техники).

### **Основные положения, выносимые на защиту.**

- Разработка эффективного метода получения серицина с сохранением его качеств;
- изучение структуры и анализ молекулярной массы и гидродинамических свойств серицина в разбавленном и концентрированном растворах;
- создание оптимальных условий получения стабильных микрокапсул с минимальным размером, эффективно захватывающие БАС;
- исследование антиоксидантной активности полученных микрокапсул, содержащих БАС;
- обоснование возможности применения серицина и композитов на его основе в пищевой и фармацевтических отраслях.

**Степень достоверности полученных результатов.** Достоверность полученных результатов подтверждена воспроизводимостью и согласованностью данных при использовании физико-химических методов анализа, с использованием современных приборов и методик и рекомендациями по применению биополимерных носителей в производство функциональных пищевых продуктов и фармацевтических препаратов.

**Апробация работы.** Основные материалы диссертации доложены, обсуждены и получили положительную оценку на региональных, республиканских и международных конференциях: III международной научной конференции «Инновационное развитие науки», 12 октября 2024 г.; на VI международной научной конференции «Вопросы физической и координационной химии», Душанбе, 15-16 мая 2024 г.; XIII национальной научно-практической конференции с международным участием «Технологии и продукты здорового питания», Россия, г. Саратов, 21 марта 2024 г.; IV- Школа молодых химиков государств-участников СНГ «Современные достижения химической науки и технологии», Душанбе, 25 ноября – 2 декабря 2023 г.; 31st International Conference of FFC, Yerevan, Armenia, September 29- October 1st, 2023; ACS Fall 2023, August 13-17, 2023, in San Francisco, CA., USA. [www.acs.org/meetings](http://www.acs.org/meetings); XII Национальной научно-практической конференции с

международным участием «Технологии и продукты здорового питания», г. Саратов, 17-18 декабря 2020 г.; III Международной научно-практической конференции «Медико-биологические и нутрициологические аспекты здоровьесберегающих технологий», г. Кемерово, 28 апреля 2023 г.; V международной научно-практической конференции на тему «Современные проблемы физики и химии полимеров», Душанбе, 10 октября 2023 г.; республиканской конференции с международным участием, посвящ. 80-летию со дня рождения Т.С. Морозкиной, Минск, 29 мая 2020 г.; XIV- XIX Нумановских чтениях, Душанбе 2017-2024 гг; XII International Symposium "Actual problems of chemistry, biology and technology of natural compounds" (September 7-8, 2017 Tashkent).

**Публикации.** По результатам исследования опубликовано 33 печатных работ, общим объёмом 12.94 п.л. (авторских – 7.0 п.л.), в том числе 4 статьи в журналах международной базы «Scopus», 9 статей в журналах из Перечня ВАК при Президенте Республики Таджикистан и Российской Федерации, 1 патент РТ, 15 тезисов докладов на международных и 4 тезиса докладов на республиканских конференциях.

**Личный вклад автора** заключается в анализе научной литературы, его участие при постановке задач по теме диссертационной работы, в непосредственном проведении экспериментальных работ, обработке, анализе и интерпретации полученных результатов.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация изложена на 156 страницах машинописного текста, включая 22 рисунка и 15 таблиц. Диссертация состоит из введения, четырёх глав, выводов и библиографического списка из 172 наименований.

**Ключевые слова:** коконы шелкопряда, серицин, пектин, полифенольные соединения, молекулярная масса, молекулярно-массовое распределение, эксклюзионная жидкостная хроматография, ИК-Фурье спектроскопия, турбидиметрическое титрование, эмульсионные микрокапсулы.

## ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1. Краткая характеристика белков кокона тутового шелкопряда

#### 1.1.1. Перспективы развития шелководства в Таджикистане

Коммерческое шелковое производство имеет долгую историю, начавшуюся в Северном Китае около 5000 лет назад, благодаря благоприятным климатическим условиям и наличию необходимых растений для кормления шелкопрядов. Исторические данные относительно шелкового производства исходят именно из этого региона и показывают, что шёлк был одним из самых важных сельскохозяйственных ресурсов для китайской цивилизации. С течением времени шелковое производство стало основным видом экономической деятельности в Северном Китае. Развитие торговли и обмена с другими регионами Востока привело к распространению шелкового производства на более широкую территорию. Основная дорога, по которой шёлк распространился из Северного Китая, пролегла через Центральную и Западную Азию, достигала Ближнего Востока и даже доходила до Европы [1].

Сегодня в мире около 60 стран производят шёлк, и производство шёлка важно для 20 из них, с экономической точки зрения [1–6]. Основными шелководческими странами являются Япония, Китай, Корея, Италия, Индия, Индонезия, Закавказье и страны Центральной Азии, в том числе и Таджикистан [3–6, 15]. Отрасль шелководства в Республике Таджикистан имеет многовековую историю [15-17]. Наиболее эффективной территорией развития шелководства с благоприятными природными условиями для выращивания шелковицы и выкармливания гусениц, переработки шёлка, производство атласа и шелковых ковров является Согдийская область, где производится более половины общего объёма коконов и шелковых тканей республики [15].

Производство шелка - уникальный процесс и является сезонным видом деятельности, не требующим крупных финансовых вложений, и начинающийся с выращивания листьев тутового дерева, который является основным кормом для

шелкопряда. После того, как шелкопряд скручивает нити вокруг себя и создаёт кокон, начинается самый интересный этап - получение шелковой нити.

Обычно из одного кокона получается от 300 до 600 м шелковой нити. Для создания всего одного метра шелкового материала требуется около 3000 коконов.

Шёлк — один из самых прочных натуральных волокон, но при намокании он теряет до 20% своей прочности. Обладает хорошим коэффициентом восстановления влаги – 11%. Его эластичность варьируется от умеренной до низкой: даже при незначительном удлинении он остается растянутым. Он может ослабнуть при воздействии слишком большого количества солнечного света [4].

С целью развития шелководства в стране были одобрены две программы, утвержденные постановлением Правительства Республики Таджикистан в 2011 и 2020 годах [16, 17].

Как отмечено в работе [17], Республика Таджикистан, в рамках программы по развитию шелководства и переработки коконов тутового шелкопряда на 2021-2024 годы, нацелена на стабильный рост отрасли через внедрение инновационных технологий. В течение следующих четырех лет в регионах республики (Согдийская и Хатлонская области) планируется посадка по 2 миллиона, а в Гиссарском районе — свыше 300 тысяч тутовых деревьев. Программа также включает в себя выращивание более 33 тысяч коробок тутового шелкопряда, что позволит увеличить производство коконов до 1200 тонн, и 800 тонн, обработкой которых будет осуществляться в рамках самой страны [17]. По прогнозам Минэкономразвития Таджикистана, производство кокона должно увеличиться до 1300 тонн в год [16].

В соответствии с Постановлением Правительства республики от 29 февраля 2020 года, виды деятельности по возделыванию кокона, шелкопрядению, шелкомотанию освобождены от всех видов налогов. Глава государства, Основатель мира и национального единства, Лидер нации, Президент Республики Таджикистан Эмомали Рахмон, выступая с Посланием к Парламенту 21 декабря 2021 года, поручил в течение десяти лет полностью

освободить земли, занятые тутовыми деревьями, от уплаты единого земельного налога. Согласно новой Программе развития шелководческой отрасли на 2021–2024 годы, запланированы восстановление площадей тутовых плантаций, уход за насаждениями, повышение их продуктивности, а также закладка новых посадок [16, 17]

Между тем, мировые цены на шелк-сырец демонстрируют устойчивую динамику роста. С 2002 года среднегодовая стоимость шелка-сырца увеличивалась в среднем на 17% в год и за прошедший период выросла в 3 раза - с 15.8 долл. за кг в 2002 г. до 50 долл. в 2022 году [17].

Отходы шелковой промышленности можно классифицировать как отходы из кокона, отходы выращивания и нитевидные отходы. Шелковые отходы могут использоваться в качестве грубой пряжи и прядильного шёлка, быть интегрированы в производство натурального каучука. Добавление шелковых волокон позволяет улучшить физико-химические свойства каучука и создать материал с уникальными характеристиками. Другой способ утилизации шелковых отходов - экстракция фиброина и серицина. Эти вещества могут быть использованы в различных отраслях, от медицины до косметики, делая процесс шелководства более полезным и универсальным. Отходы шелковой промышленности представляют собой ценный ресурс, который можно эффективно использовать в различных отраслях. Благодаря возможности производства пряжи, добавления в натуральный каучук и экстракции ценных компонентов, шелковые отходы становятся неотъемлемой частью устойчивого развития текстильной и других отраслей промышленности [1, 5, 7–12, 18].

---

### **1.1.2. Химический состав коконов тутового шелкопряда**

---

В природе встречаются разнообразные биологические виды с уникальными адаптивными защитными механизмами, такими как шелкопряды. Шелкопряды - хороший пример того, что они прядут защитные коконы для использования в качестве укрытий во время метаморфозы от личинок до

взрослых особей [8]. Основными насекомыми, производящими шёлк, являются *Bombyx mori*, *Antheraea mylitta*, *Antheraea assama* и *Antheraea ricini* [10]. Самый известный вид шёлка получают из коконов, выработанных личинками тутового шелкопряда *Bombyx mori* [5].

Тутовый шелкопряд *Bombyx mori* - чешуекрылое насекомое, одомашненное более 7 тысяч лет назад. Биология данных видов подробно изучалась из-за их значимости для производства шёлка на протяжении длительного времени. Цикл развития шелкопряда состоит из четырёх последовательных стадий: яйцо, личинка, куколка, и взрослая особь (имаго). Шелкопряду нужна особая диета для производства высококачественных коконов, а листья белой шелковицы (*Morus alba*) обладают питательной ценностью, соответствующей этому требованию. Эти листья состоят из воды (81.72%), жира (0.57%), белка (1.55%), клетчатки (1.47%), углеводов (14.21%) и других второстепенных соединений (0.48%), таких как минералы. Синтез белков, образующих основу шелкового волокна, осуществляется железистыми клетками шелкопряда. После выработки белки сразу же поступают в полость железы, где они подвергаются процессу преобразования в шелковую нить. Эта трансформация сопровождается прохождением нити через передний отдел железы, после чего она выводится наружу через специальное отверстие, называемое матрицей. В результате формируется тонкая двойная нить, состоящая из фиброина, которая покрыта защитным слоем – веществом под названием серицин. Серицин выполняет важную функцию, так как он служит связующим элементом, способствующим удержанию структуры будущего кокона. Именно благодаря этому веществу обеспечивается прочность и стабильность шелковой оболочки, которая играет ключевую роль в процессе создания безопасного укрытия для стадии куколки шелкопряда. Полученная структура (кокон), имеющая овальную форму, является безопасным убежищем во время метаморфоза личинки, в процессе которой она становится куколкой [11].

Кокон шелкопряда представляет собой лёгкие (весом всего несколько граммов) и компактные структуры, сформированные из непрерывной шелковой нити длиной 700–1500 метров. На протяжении миллионов лет эволюция этих коконов обеспечила им превосходные защитные свойства, позволяя эффективно противостоять неблагоприятным условиям окружающей среды и атакам хищников, включая птиц, насекомых и микроорганизмы. Благодаря эллипсоидальной форме кокона и утончённой структуре на его концах, шелкопряд успешно завершает процесс метаморфоза, переходя из куколки в моль. Этот процесс облегчается щелочным веществом, которое выделяется самим организмом и разрыхляет структуру кокона.

Основная часть кокона (98%) состоит из двух ключевых белков – фиброина и серицина, которые придают ему прочность и стабильность. Также в его состав входят белок P25 (гликопротеин) и сероин, выполняющие защитные функции, противостоящие воздействию хищников, грибков и бактерий. Эти вещества выделяются железами шелкопряда и играют важную роль в формировании и функциональности кокона. Кроме того, в структуре кокона содержатся жиры и воск (0.4–0.8%), неорганические соли (0.7%) и пигменты (0.2%), которые дополняют его химический состав и функциональные свойства [1, 11, 12, 18].

Тутовый шелкопряд прядёт шелковые нити, образуя оболочку кокона, где некоторые пигменты сосуществуют и накапливаются в слоях серицина кокона. Красящие компоненты связаны с фенольными соединениями в листьях шелковицы (*Morus alba Linn.*), единственного корма для личинок тутового шелкопряда. Содержание красящих компонентов кокона, которые, в первую очередь, связаны с каротиноидами и флавоноидами, варьируются в зависимости от штамма тутового шелкопряда [19, 20]. Цвет варьируется от кремово-белого (*Bombyx mori* и *Philosamiaricini*) до серого (*Antheraea mylitta*), кремово-жёлтого (*A. proylei*) и золотисто-жёлтого (*A. assamensis*) [21].

---

### 1.1.3. Фиброин (шелковая нить)

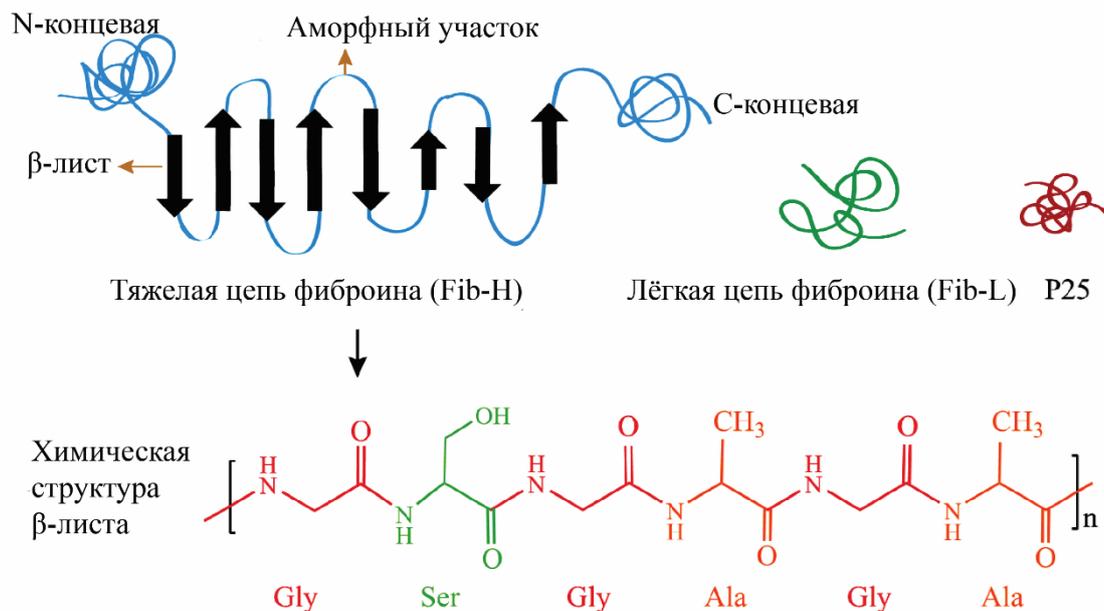
---

Шелковый фиброин - это белок, который образует нить шелкопряда и обладает уникальными физическими и химическими свойствами [10, 22, 23]. Шелковая нить, состоящая из двух шелковин с поперечником около 16 мкм каждая (32 мкм в совокупности), достигает длины до 1500 м, однако из-за неразматываемых верхнего и внутреннего слоёв кокона её средняя размотанная длина составляет 600–900 м [10]. Фиброин представляет собой гликопротеин, состоящий из двух эквимольных субъединиц белка 370 и 25 кДа, ковалентно связанных дисульфидными связями. Фиброиновая нить состоит как из кристаллических, так и аморфных доменов. Аморфные домены характеризуются наличием аминокислот с более объёмными боковыми цепями, тогда как кристаллические домены характеризуются высоким процентом аланина, глицина и серина (32, 44, 14%), соответственно, который содержит короткие боковые цепи, что позволяет плотно упаковывать прилегающие листы [10, 23, 24].

Авторы установили, что фиброиновые волокна представляют собой гидрофобный гликопротеин, секретлируемый в просвет задних желёз в виде молекулярного комплекса, включающего тяжёлую (*H*) цепь приблизительно 350 кДа и лёгкую цепь (*L*) 25 кДа и гликопротеин P25 с 27 кДа (рисунок 1.1) [22–24].

Эти полимерные цепи связаны дисульфидными связями с образованием комплекса HL (рисунок 1.1). Кроме того, гидрофобный гликопротеин P25 (25 кДа) связан с комплексом HL [22].

Фиброин организован в пучки нитей, которые вместе образуют единую шелковую нить. Во время плетения кокона каждая из двух нитей, происходящая из шелковой железы, окружена слоями серицина и образует шелковую нить [1, 10, 22–24]. В работе [22] количественный иммуноферментный анализ со специфическими антителами для каждого белкового компонента показал, что молярное соотношение H-цепи, L-цепи и P 25 составляет 6:6:1 для фиброина, секретлируемого в заднюю шелковую железу [22].



**Рисунок 1.1. - Фиброиновые волокна и их компоненты. Фиброины шёлка состоят из тяжелой и легкой полипептидной цепи (соединённых дисульфидной связью) и гликопротеина P25 в молярном соотношении 6:6:1 [22]. Тяжелая цепь состоит из повторяющихся гидрофобных доменов, в основном, состоящих из аминокислотных последовательностей глицина, аланина и серина, которые могут принимать конформацию  $\beta$ -листа [23]**

Молекулярная масса и кристалличность фиброина выше, чем у серицина, а надмолекулярные структуры серицина и фиброина отличаются друг от друга. Фиброин более гидрофобен, чем серицин, из-за другого аминокислотного состава [23]. В коконе фиброин представляет собой волокнистый белок в форме тонкой двойной нити, связанной дисульфидными связями и окруженной последовательными липкими слоями серицина, образующими шёлк. В шелковой промышленности серицин удаляется из фиброина для улучшения блеска, мягкости, гладкости, белизны и окрашиваемости волокон [24].

Натуральный шёлк – ценное волокно с высокой прочностью, тонкостью, гигиеничностью, гигроскопичностью, воздухопроницаемостью, низким удельным весом и хорошей окрашиваемостью, обладающее упругой деформацией до 60%, устойчивостью к смятию, превосходящей шерсть химической стойкостью, невосприимчивостью к разбавленным кислотам,

щелочам и органическим растворителям, растворяющееся только в концентрированных щелочах при кипячении и теряющее 5–15% прочности в мокром состоянии [6].

Шелковое волокно можно использовать во многих целях, включая текстиль, медицину и промышленность. Это сырье для производства ценных тканей, парашютов, материалов для покрытия шин, искусственных кровеносных сосудов и хирургических швов. Волокна шёлка обладают уникальными природными свойствами, которые не уступают самым передовым синтетическим полимерам [10]. По сравнению с другими природными биополимерами фиброин является многообещающим, благодаря своим превосходным механическим свойствам, хорошей биосовместимостью биоразлагаемостью и универсальности структурных изменений. Эти полезные свойства объясняют его уникальные физико-химические параметры [25,26]. Волокна регенерированного фиброина шёлка находят свое применение, в основном, в области тканевой инженерии в качестве каркасов. Эти каркасы могут использоваться для поддержки клеток, развития костей, хрящей, сосудистых трансплантатов и тканей кожи [10]. Результаты работы [26] показывают, что пористые 3D-каркасы фиброин-пектина обладают потенциалом в качестве заменителя кожи для её регенерации. Нановолокна Ag/фиброин показали многообещающую антибактериальную активность против *P. aeruginosa* даже при низком содержании Ag (0.1% Ag, мас. / Об.) и немного активны против *S. epidermidis* и *S. aureus* при содержании 1% Ag (мас. / Об.) с минимальной цитотоксичностью [25].

Натуральный шёлк используется для производства разнообразных платьевых тканей, таких как атлас, шифон, жоржет, тафта и креп-сатин, а также нитей, шнуров и высокопрочных технических тканей, востребованных в оборонной промышленности, помимо этого, его применяют для изготовления шёлковых швейных ниток, а отходы и бракованные коконы перерабатывают в шёлковую пряжу [6].

---

#### 1.1.4. Шелковый серицин

---

Тутовый шелкопряд (*Bombyx mori*) синтезирует и выделяет два основных класса белков: фиброин и серицин [18, 22, 26, 27]. Серицин составляет примерно 20–30% от общего веса кокона [7–13, 18, 27–32], хотя у некоторых разновидностей тутового шелкопряда, таких как «*hope sericin*», его содержание может достигать около 98.5% от массы кокона (рисунок 1.2) [33–37]. Основная роль серицина заключается в том, чтобы удерживать вместе фиброиновые нити, которые помогают в формировании кокона, он представлен семейством белков с молекулярной массой от 10 до 400 кДа [1, 18, 34].

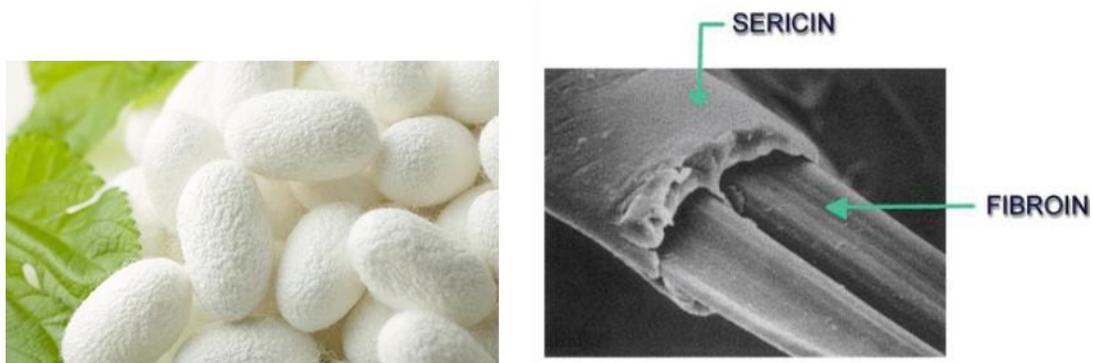
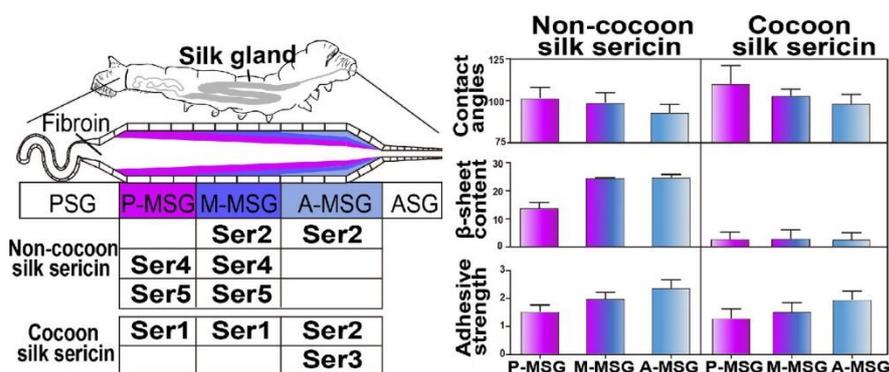


Рисунок 1.2. - Кокон шелкопряда (слева). Серицин и фиброин (справа) [35]

Кроме того, белки серицина богаты гидрофильными аминокислотами, в том числе аспарагиновой кислотой и серином [7]. Примечательно, что фиброин представляет собой полукристаллический комплекс, выполняющий роль носителя для шелковых волокон, тогда как серицин представляет собой аморфный белковый полимер, действующий как связующее вещество [8].

В присутствии серицина волокна твёрдые и жёсткие, но становятся мягкими и блестящими после его удаления [1,7,27]. Серицин представляет собой макромолекулярный, глобулярный [38], нерастворимый в холодной воде белок, обладающий высокой гидрофильностью и клейкими свойствами. При обработке шелковых тканей серицин обычно извлекается из шелкового кокона во время процесса дегуммирования [1, 10, 12, 19].

Слой серицина содержит белки Ser1 - Ser5 и небольшое количество антибактериальных пептидов, флавоноидов, соли, воск, углеводы и другие примеси (рисунок 1.3) [22, 39–41]. Также были идентифицированы пять генов серицина: Ser1 (белки массой 150 и 400 кДа, полученные методом альтернативного сплайсинга) [38, 42], Ser2 (120 и 230 кДа), Ser3 (250 кДа), Ser4 (260 и 280 кДа) и Ser5 (260 кДа). Что касается шелковых коконов, то Ser1 и Ser3 являются первичными серицинами [39-42].



**Рисунок 1.3. - Компоненты слоя серицина шёлка. Серициновый слой коконов тутового шелкопряда состоит из серицинов (ser1, ser2 и ser3) и других фракций, включая соли, воск, углеводы, флавоноиды, антимикробные пептиды и др. [42]**

Серицин представляет собой глобулярный белок, структурно состоящий из случайных клубков и  $\beta$ -листов, которые легко трансформируются в ответ на механическое растяжение, влагопоглощение или воздействие температуры, вызывая переход между состояниями золя и геля, а при нагревании в воде до 50–60 °С и выше серицин становится растворимым, тогда как при более низких температурах его растворимость снижается, и структура случайных клубков преобразуется в  $\beta$ -листы, что приводит к формированию геля [1,7,8].

Серицин содержит 18 аминокислот, среди которых наиболее значимы серин (32%), аспарагиновая кислота (18%) и глицин (16%). В его составе преобладают гидроксиаминокислоты, такие как серин и треонин (45.8%), а также полярные аминокислоты (42.3%) и в меньшей степени неполярные аминокислоты (12.2%) [7–12, 27, 28, 34–36]. Полярные группы аминокислотных боковых цепей, включая карбоксильные, гидроксильные и аминогруппы, а также

их органический состав, растворимость и структурная организация позволяют серицину вступать в сшивание, сополимеризацию и взаимодействовать с другими полимерами, что обеспечивает ему уникальные свойства [1, 20, 35]. Элементный состав серицина С—44.32-46.29%; Н—5.72-6.42%; N— 16.44-18.33%; O—30.35-32.5%; S—0.15% [1, 4, 35–39]. Химическая характеристика серицина влияет на его многие физические и биологические свойства [1, 37].

---

### 1.1.5. Физико-химические свойства шелкового серицина

---

Физико-химические свойства серицина, которые, в основном, зависят от способа выделения серицина и генетической линии тутового шелкопряда, влияют на его функциональные свойства и делают серицин потенциальным биосовместимым материалом для биомедицинских применений.

Серицин, обладая слоистой структурой, классифицируется на три фракции — *A*, *B* и *C*, основываясь на его растворимости и молекулярной массе, которые используются как стандарты для такой классификации [1, 7, 12, 18, 27]. Серицин *A*, наиболее растворимая в теплой воде фракция, располагается во внешнем слое кокона, содержит около 17.2% азота, а основными аминокислотами в её составе являются серин, треонин, глицин и аспарагиновая кислота. Серицин *B*, находящийся в среднем слое кокона, содержит 16.8% азота и, помимо аминокислот серицина *A*, включает триптофан, тогда как серицин *C*, расположенный во внутреннем слое, является нерастворимым в горячей воде. Этот слой примыкает к фиброину и может быть удален из него обработкой горячей разбавленной кислотой или щелочью. Он содержит серу и 16.6% азота. В дополнение к аминокислотам, содержащимися в серицине *A* и *B*, фракция *C* также содержит пролин.

Различные фракции серицина также обозначены другими исследователями [7, 22, 35] в зависимости от их способности к растворению, как серицин *A* и *B*, или серицин I, II, III и IV, или S1, S2, S3, S4 и S5 и, как  $\alpha$ - и  $\beta$ -модификации. Растворимость  $\alpha$ -серицина в кипящей воде больше, чем у  $\beta$ -серицина.

Серицин является уникальным белком из-за его необычных свойств, которые суммируются следующим образом:

**Растворимость серицина.** Растворимость связана с аморфной и кристаллической структурой серицина. Иными словами, растворимость серицина в воде уменьшается, когда молекулы серицина превращаются из случайного клубка (аморфная часть) в структуру  $\beta$ -листа (кристаллическая область). Растворимость серицина может быть увеличена добавлением полиакрилата натрия и может быть уменьшена добавлением формальдегида, полиакриламида или смолы на основе биополимеров [27].

**Гелеобразующие свойства.** Гелеобразование серицина, впервые изученное в 1994 году, происходит наиболее активно при температуре 25–40°C и pH 6–7. [43]. Серицин состоит из структуры случайного клубка и  $\beta$ -листа; при нагревании в горячей воде случайная структура клубка растворяется, а при понижении температуры преобразуется в  $\beta$ -лист, что вызывает формирование геля [7, 27]. Это явление обратимо: при нагревании образца в воде до 50–60 °C структура снова растворяется, а при охлаждении вновь преобразуется в гель [44]. Согласно Квеон и др. [30], прочность геля серицина возрастает при снижении поверхностного натяжения, а время его формирования сокращается с добавлением высоких концентраций геля полоксамера. Это объясняется тем, что гидрофильные компоненты полоксамера поглощают воду, окружающую серицин, способствуя более быстрому и прочному формированию геля [30].

**Изоэлектрическая точка.** Это относится к pH, при котором молекула не несёт чистого электрического заряда. Изоэлектрическая точка серицина составляет от 3.5 до 4.0 pH, что объясняется преобладанием кислых аминокислотных остатков, чем основных [7, 27].

**Молекулярная масса.** Молекулярная масса серицина зависит от метода его экстракции, при этом преобладающими аминокислотами являются серин, глицин и глутаминовая кислота. Молекулярная масса серицина варьируется от 40 до 400 кДа при его извлечении из коконов и от 80 до 310 кДа при экстракции непосредственно из железы шелкопряда, причем эти показатели зависят от

условий экстракции, включая тип реагента (кислоты, щелочи, ферменты), а также такие факторы, как температура, давление, рН и время обработки [2]. Например, извлечение серицина с использованием 1% раствора дезоксихолата натрия с последующим осаждением с использованием равного объёма 10% трихлоруксусной кислоты показывает молекулярную массу в диапазоне от 17.1 кДа до 18.46 кДа. Экстракция серицина горячей водой показывает молекулярную массу 24 кДа путем гель-электрофореза, тогда как метод распылительной сушки продуцирует серицин с молекулярной массой 5-50 кДа, при активности фермента 3-10 кДа и 50 кДа, когда он экстрагируется водным раствором мочевины при 100°C [7, 27]. В работе [38] серицин получен растворением кокона тутового шелкопряда *Bombyx mori* в насыщенном водном тиоцианате лития, содержащим 2-меркаптоэтанол, и фракционирован осаждением этанолом. Анализ полученного серицина методом SDS-PAGE выявил, что его состав преимущественно включает три полипептида с молекулярными массами 400, 250 и 150 кДа. Молекулярная масса экстрагированного серицина с использованием чистой воды, без химических добавок, в целом, показала распределение по размерам, варьирующееся от 20 до 400 кДа, с основными пиками от 200 до 100 кДа и пиками с долей серицина ниже 100 кДа, в зависимости от условий, используемых в эксперименте [45]. Все эти результаты показывают, что молекулярная масса серицина зависит от условий применяемых методов.

---

### 1.1.6. Методы экстракции серицина

---

Серицин извлекается различными методами, в результате чего проявляет разные физические и биологические свойства. Использование различных химикатов (кислот или щелочи) в процессе экстракции [42, 46, 47] влияют на термическое поведение серицина. Как было отмечено в работе [19], серицин, полученный разными способами, проявляет различную биологическую активность: например, экстрагированный с использованием мочевины, проявлял наивысшую антигепатомазную активность, тогда как серицин, полученный

щелочью, не проявлял ингибирования тирозиназы грибов. Также было обнаружено, что пигменты, в первую очередь, флавоноиды и каротиноиды из коконов шёлка, усиливают ингибирование тирозиназой серицина.

В работе [40] был определен наиболее практичный метод максимально возможного восстановления интактного серицина; инкубация в 8 М мочеvine с 5% 2-меркаптоэтанолом при 80<sup>0</sup>С в течение 2-10 мин. позволяет экстрагировать более 95% общего серицина кокона без разложения. Сатоши Токутаке [48] экстрагировал белок шёлка из коконов с помощью раствора этилендиамина / гидроксида меди [48]. Фракции фиброина и серицина разделяли путем осаждения серицина при рН 5.5. При гель-электрофорезе серицин демонстрировал чёткие полосы, тогда как фиброин их не показывал. Фракционирование компонентов фиброина и серицина проводили методом гель-фильтрации на сефарозе 6В. Наименьший компонент во фракции серицина был дополнительно очищен с помощью повторной хроматографии, в результате чего на гель-электрофорезе выявилась единственная полоса, соответствующая молекулярной массе 24 кДа.

Авторы [46] исследовали процессы дегумирования шёлка и извлечения серицина из сточных вод разными способами: щелочным, горячей водой, высокой температурой и высоким давлением (ВТВД), а также методом микроволновой экстракции. Полученные порошки серицина были тщательно охарактеризованы с помощью элементного состава, сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), спектроскопии (УФ, ИК и флуоресценции), вторичной структуры, термической стабильности, анализа молекулярной массы и сравнением с коммерческим серицином. Результаты показывают, что микроволновая экстракция является наиболее эффективным методом дегумизации шёлка и экстракции серицина, поскольку восстанавливается весь серицин, содержащийся в коконах. Показано, что образцы серицина, полученные разными методами экстракции, имеют схожий состав. Однако наблюдались различия в длине цепи образцов серицина. Молекулярная масса серицина высокая при щелочной и микроволновой экстракции, а более низкая

молекулярная масса наблюдается у серицина, при экстракции горячей водой и ВТВД. Анализ вторичной структуры подтверждает, что серицин имеет высокую степень структурированности в агрегированной или в форме  $\beta$ -листа. Морфология и структурная организация серицина может меняться от одной экстракции к другой, изменяя свойства серицина [46].

Арамвит и др. [47] обнаружили, что серицин, полученный различными методами экстракции, имеет разную молекулярную массу, дзета-потенциал, размер частиц и содержание аминокислот [47]. Серицин разложенный при нагревании был наименее токсичным для клеток и активировал самое высокое производство коллагена, в то время как серицин, экстрагированный мочевиной, показал самую низкую жизнеспособность клеток и производство коллагена. В работе [49] серицин экстрагировали из коконов *Bombyx mori*, 0.5% -ным раствором карбоната натрия в течение 1 ч при 90–95°C. Серицин очищен путем диализа и сульфатированием хлорсульфоновой кислотой. Сульфатирование серицина было подтверждено методом ИК-Фурье спектроскопией. Рассчитанный выход продукта (эффективность реакции) составил 44.9%. <sup>1</sup>H-ЯМР показал, что сульфатирование, в основном, происходит по остаткам серина в молекуле серицина. Сульфатированный серицин разделяли на три фракции гель-фильтрационной хроматографией с использованием сефакрила S-200. Содержание сульфатных групп и аминокислотный состав каждой фракции были практически одинаковыми, а антикоагулянтная активность различалась для каждой фракции сульфатированного серицина. Более высокая антикоагулянтная активность наблюдалась у высокомолекулярной фракции [49].

Исследование [50] проводилось с целью извлечения белка серицина, образующегося в процессе дегумирования шёлка. Для извлечения ценного белка серицина и снижения затрат были изучены мембранная фильтрация и ферментативный гидролиз извлеченного серицина. Серицин с молекулярной массой 2.427–9.863 кДа был извлечен после процесса мембранной фильтрации. Выделенный серицин был подвергнут дальнейшему ферментативному гидролизу с получением гидролизата серицина (средняя молекулярная масса

1.046–2.795 кДа), который подходит для дальнейшего применения в косметике [50].

Серицин экстрагировали методом дегумирования при высокой температуре и давлении горячей водой [51]. Для экстракции использовали автоклав при температуре 120°C в течение 30 мин, в соотношении 1:30 (г коконов/мл дистиллированной воды). Полученный раствор серицина затем фильтровали с использованием вакуумного насоса для удаления оставшихся кусочков кокона, твердых частиц и возможных примесей, присутствующих в растворе, затем проводили распылительную сушку. Полученный порошок серицина растворяли в дистиллированной воде в концентрации 2% (мас./об.) с использованием автоклава при тех же условиях, указанных выше. Полученный раствор разливали в планшеты с лунками объёмом 2 мл, которые замораживали при температуре -80 °C в течение 24 ч. Затем замороженные образцы лиофилизировали в течение 48 ч в сублимационной сушилке.

В исследовании [52] продукты, полученные в результате обычно используемых процедур (экстракции в кипящей воде, щелочной экстракции и экстракции в автоклаве), сравнивали с продуктами, полученными в результате водной экстракции в мягких условиях. Электрофореграммы показали, что водная экстракция в мягких условиях, проводимая при 50°C в течение до 4 недель, с перемешиванием или без него, приводит к наименьшему разложению серицина. Инфракрасный спектрометрический анализ показал, что серицин, полученный в результате метода мягкой экстракции, содержал преимущественно конформации  $\beta$ -листа, тогда как более деградиационные методы (щелочной, автоклав) приводили к серицину, где конформации случайного клубка были предпочтительными. Длительная водная экстракция при 50°C (но не при 60°C) оказалась приемлемым вариантом получения продуктов серицина, в которых гидротермально-индуцированная фрагментация полипептидных компонентов сведена к минимуму [52].

Авторы [53], получили серицин из водного раствора, после выделения его из *Bombyx mori*, лимонной кислотой. Морфологические и биохимические

свойства данного серицина, сравнивали со свойствами серицина, экстрагированной щелочью и горячей водой. На основании анализа СЭМ серицин, полученный кислотой, показал тонкоплёночную структуру размером 10–100 мкм с хорошей дисперсностью, в то время как серицин, полученный щелочью и водой имел гораздо более крупную тонкоплёночную структуру (<500 мкм) [53] .

## **1.2. Применение шелкового серицина**

### **1.2.1. Биомедицинское направление применения серицина**

В современном мире все большее внимание уделяется экологическим аспектам производства. Интерес к природным полимерам, обладающими многими ценными свойствами, такими как биосовместимость, биоразлагаемость, низкая токсичность и хорошая биологическая активность, возрастает с каждым годом.

Благодаря своим многочисленным свойствам, таким как биосовместимость, биоразлагаемость, антимикробные свойства, способность удалять радикалы, устойчивость к ультрафиолетовому излучению, окислительная стойкость и способность поглощать влагу [9, 14], серицин стал привлекательным продуктом для универсального применения в различных областях, включая медицину, фармацевтику, косметику и текстильную промышленность [5–14].

Учитывая универсальность и уникальные свойства серицина его широко используют для производства губок, плёнок и гидрогелей для дальнейшего применения в различных биомедицинских приложениях [1, 8, 12, 18].

Таким образом, данные собранные в обзорных работах [1, 8, 12, 18], показывают, что серицин способствует пролиферации клеток, при их применении в тканевой инженерии для восстановления тканей кожи, благодаря своим увлажняющим, антиоксидантным и противовоспалительным свойствам, а также митогенному действию на клетки млекопитающих. Примечательно, что

серицин используется для доставки лекарств, благодаря своей химической активности и чувствительности к рН. Эти уникальные свойства серицина повышают биологическую активность лекарств, облегчая изготовление биомедицинских материалов в микро- и наномасштабах, получение гидрогелей и конъюгированных молекул. В этой части обзора подробно описаны методы экстракции, биологические свойства и соответствующее биомедицинское применение серицина (рисунок 1.4) [1, 8, 12, 18].



**Рисунок 1.4. - Основные направления применения серицина [1]**

Серицин начинает привлекать внимание как потенциальный каркас в области тканевой инженерии из-за его уникальных свойств, таких как устойчивость к окислению, бактериям и ультрафиолетовому свету, а также улучшенная гидрофильность и биодegradация. Чтобы разработать биоматериалы на основе серицина, в исследовании [54] была предпринята попытка переработать серицин в полезные формы, включая микрочастицы и нановолокна, которые могут служить строительными блоками при сборке каркасов для тканевой инженерии. В работе [26] были изготовлены новые фиброин/серициновые 3D губчатые каркасы и изучены их структурные,

биологические и иммунологические характеристики, которые показали способность поддерживать рост остеобластоподобных клеток, не вызывая провоспалительной реакции. Серицин вместе с поливиниловым спиртом (ПВС) применяется для получения [55] трехмерного каркаса, подходящего для биологических применений. Было продемонстрировано, что серицин нетоксичен для клеток фибробластов и может способствовать процессу заживления ран по сравнению с ранами, обработанными физиологическим раствором или кремовой основой [56].

Модифицированная композитная пленка серицин/агар с наночастицами серебра продемонстрировала отличную гидрофильность, хорошие механические свойства и антимикробную способность [57]. Хуавей Хе и др. [58] разработали экологичный, простой и экономичный подход к изготовлению плёнки AgNP-серицин/ПВС, обладающей хорошей антибактериальной активностью против *E.coli* и *S.aureus*. Эта новая плёнка продемонстрировала большой потенциал в области биомедицинских материалов, таких как перевязочные средства для ран и кожной тканевой инженерии [58].

Данная работа [59] предполагает использование электропряденных волокон, полученных в результате сочетания серицина, кератина и желатина, в качестве наноструктурированных платформ для тканевой инженерии. С целью продвижения серицина в качестве возможного субстрата для роста клеток роговицы и создания тканеинженерных конструкций для восстановления поверхности глаза, в работе [60] исследовано прикрепление и рост лимбальных эпителиальных клеток роговицы человека (ЭКРЧ) на мембранах на основе серицина *in vitro*. Исследование [61] посвящено изготовлению двумерных (2D) и трехмерных (3D) матриц на основе смешивания желатина с серицином. Клетки (мышинные фибробласты и кератиноциты человека), культивированные на матрицах желатин/серицин шёлка, показали усиленное прикрепление и пролиферацию. Результаты исследования подтверждают, что 2D и 3D матрицы желатин/серицин шёлка могут служить перспективными биоматериалами в области тканевой инженерии [61].

Многочисленные исследования *in vivo* показали, что регенерированные шелковые биоматериалы эффективны в заживлении ран, способствуя пролиферации клеток и оказывая антибактериальное антиоксидантное действие [62–68].

Повязки на раны используются для предотвращения попадания инфекций, обезвоживания, ускорения восстановления эпителия и уменьшения рубцов. Серицин играет важную роль в заживлении ран, способствуя синтезу коллагена. В исследовании [63] описан состав повязки для ран на основе наночастиц декстран/серицина шелка, насыщенных золотом. Наблюдалось заживление ран на коже *in vivo* на модели мышей в течение 16 дней. Результаты исследования показали, что наночастицы декстран/серицина, насыщенные золотом, могут быть многообещающим биоматериалом, эффективным для предотвращения повреждения тканей и образования рубцов, а также подходящим для лечения ран [63].

Новая серициновая плёнка, названная гелевой плёнкой, была приготовлена простым способом без использования каких-либо химических модификаций: раствор серицина желировали этанолом в форме листа и затем сушили. Полученные характеристики гелевой плёнки с серицином указывают на её потенциал в качестве перевязочного материала для ран [64]. Результаты исследования [65] показывают, что серицин обладает фотозащитным эффектом против острого повреждения, вызванного УФ-лучей, и развития опухоли за счёт снижения окислительного стресса, свойством подавлять повышение экспрессии белка циклооксигеназы-2 и пролиферации клеток в коже мышей.

В работе [66] сообщается, что серицин с молекулярной массой от 5 до 100 кДа (серицин-С) представляет собой добавку для культивирования клеток, используемую для ускорения пролиферации клеток гибридомы. Инъекционный гидрогель альгинат/серицин/оксид графена (Альг/Сер/ОГ) [67] на основе каркаса альгинат-тирамина с ферментативным сшиванием, проявлял свойства биовизуализации и контролируемую деградацию при высвобождении серицина и ОГ. Было продемонстрировано синергическое воздействие серицина и ОГ на

регенерацию кости. Серицин использовался совместно с экстрактами листьев *R.tomentosa* в качестве экологически чистой стратегии синтеза наночастиц серебра [68]. Полученные наночастицы были охарактеризованы и включены в гидрогель для местного применения.

Исследование [69] посвящено изучению влияния серицина на тревогу и когнитивные нарушения у мышей, получивших тепловой стресс (ТС). Исследование показало, что серицин способен смягчить когнитивные нарушения и тревожное поведение, вызванные ТС, у мышей, вероятно, за счёт модуляции белка теплового шока в гиппокампе, снижения окислительного стресса и апоптоза [69]. Серицин шёлка был выбран для модуляции сборки наноразмерных кристаллов гидроксиапатита с помощью модифицированного метода соосаждения [70]. В работе оценена биосовместимость полученных кристаллов *in vitro* и доказана их сильная способность стимулировать дифференцировку и пролиферацию клеток.

Исследование [71] было сосредоточено на использовании серицина в качестве криопротектора для хранения клеток млекопитающих и была разработана новая среда для замораживания, содержащая 1% серицина, 0.5% мальтозы, 0.3% пролина, 0.3% глутамина и 10% ДМСО. Эта сконструированная бессывороточная среда для замораживания подходит для криоконсервации клеток млекопитающих и насекомых и не вызывает опасений инфекций. В исследовании [72] приготовлены гибкие плёнки из смеси желатина, серицина и глины для упаковки гигиенических продуктов (гигиенические прокладки, подгузники, салфетки, фармацевтические упаковки, медицинское оборудование, такие как шприцы и т.д.). Антимикробное тестирование выявило эффективную активность этих смесевых плёнок в отношении грамположительных (*S.aureus*) и грамотрицательных (*E.coli*) бактерий [72].

Благодаря своим свойствам, серицин, особенно, полезен для улучшения искусственных полимеров, таких как полиэфир, полиамиды, полиолефины и полиакрилонитрилы. Серицин также используется в качестве покрытия или материала для смешивания натуральных и искусственных волокон, тканей и

полимерных изделий. В исследовании [14] поверхность полиэфирной ткани была функционализирована и обработана серицином для улучшения ее многофункциональных свойств и улучшения окрашиваемости основными красителями. Обработанные, серицином, образцы, окрашенные в основной цвет, проявляли антимикробную активность против *S.aureus*. Также было замечено улучшение статического поведения образцов, обработанных серицином. В работе [73] была получена прочная и высокогидрофильная полиэфирная ткань путем сшивания серицина на полиэфирной ткани, обработанной воздушно-атмосферной плазмой. Изучена возможность использования серицина, получаемого из не утилизируемых отходов шелкового производства, для шлихтования хлопчатобумажной пряжи в исследовании [74]. Результаты исследований раствора серицина полученного из не утилизируемых отходов шёлка показали, что серицин является актуальным для шлихтования хлопчатобумажной пряжи.

Исследовано влияние ряда водорастворимых многофункциональных растворов полимерных композиций на основе поличетвертичной соли диметиламиноэтилметакрилата с моноиодоуксусной кислотой и серицина на физико-механические показатели натурального шерстяного волокна. В результате модификации с полимерной композицией шерстяные волокна меняют прочность, растяжимость, блеск, матовость, белизну, бактерицидные и огнеупорные свойства и т.д. [75].

Твёрдые частицы, переносимые по воздуху, являются одной из наиболее серьезных проблем загрязнения воздуха. Эти твердые частицы также являются переносчиками микроорганизмов, таких как бактерии, грибы и вирусы. Волокнистые фильтры-маски просты и экономичны и эффективно удаляют из воздушного потока частицы размером менее микрометра. Были изготовлены нановолоконные маты из серицина/ПВС/глины (Cloisite 30B) методом электропрядения для создания антимикробных масок для фильтрации воздуха. Результаты показывают, что нановолоконный мат серицин/ПВА/глина может

быть многообещающим материалом для изготовления защитной маски для фильтрации воздуха на основе одежды [76].

Исследование [77] было направлено на изучение использования частиц серицин/альгината, сшитых ПВС (СА-ПВС) для периодической биоадсорбции иттербия (дефицитного, дорогого и широко используемого) промышленных стоков, который образуется в больших объёмах каждый день. Работа теоретически рассматривает возможность ультрафильтрации ионов тяжелых металлов ( $Pb^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) из водных растворов с использованием биополимера серицина [78].

Новейшая технология инкапсуляции обеспечивает продолжительную доставку нужных терапевтических веществ в конкретные участки тела, минуя необходимость в иммунодепрессантах. Получение гибридных плёнок серицин/ПВС методом испарения растворителя для загрузки тригидрата амоксициллина изучено в работе [79]. Поверхность плёнки ПВС может быть модифицирована большим количеством гидрофильных групп серицина. Эта особенность указывает на то, что гибридная плёнка серицин/ПВС может использоваться для высвобождения лекарств. Сунита Наяк и др. готовили микрокапсулы, состоящие из серицина и микрогранул альгината в качестве внутреннего ядра, с внешней оболочкой из хитозана и сшитые генипином. Эта работа предлагает инкапсуляцию живых клеток для потенциальных терапевтических применений. Исследование предполагает, что разработанные микрокапсулы серицин-альгинат-хитозан вносят вклад в разработку модели клеточной инкапсуляции [35].

В работе Соотц Ю.Н. и др. исследована возможность создания капсульной оболочки с использованием комбинации биосовместимых полиэлектролитов, таких как серицин-хитозан и серицин-альгинат натрия [80]. На основе изучения взаимодействия серицина с биodeградируемыми полиэлектролитами, включая альгинат натрия и хитозан, была выбрана система серицин-альгинат натрия, обеспечивающая формирование стабильных во времени эмульсий с микрокапсулами. Серицин использовался в качестве матрицы регулирования для

синтеза аморфных сферических наночастиц фосфата кальция (Сер-СаР) со средним размером 80 нм методом соосаждения. Результаты опытов на мышах, показали, что сферические наночастицы Сер-СаР практически полностью распределены в клетках печени и могут подвергаться биодegradации после эндоцитоза [81]. Ван и др. [82] получили гидрогели серицина, функционализированные кислотным фактором роста фибробластов человека (ФРФ1), которые показали полезные свойства биоматериала, такие как инъекционная способность и пористая микроструктура. В частности, ФРФ1 был защищен от деградации во время обработки и гелеобразования серицина и достигал долгосрочной стабильности в гидрогелях серицина с пролонгированным высвобождением [82].

Тяжелая цитотоксичность химиотерапевтических препаратов ограничивает их клиническое применение. Серицин, натуральный белок шёлка, не обладает иммуногенностью, но обладает разнообразной биологической активностью, что побудило к изучению применения серицина в качестве доставки химиотерапевтических препаратов. Сообщается об успешном изготовлении и характеристике конъюгированных с фолатом наночастиц серицина, обладающих способностью нацеливать рак на рН-зависимое высвобождение доксорубина (эти наночастицы называются «Ф-НСД»). Исследование характеристик показывает, что эти наночастицы обладают хорошей цитотоксичностью и гемосовместимостью. В совокупности это исследование предполагает, что наночастицы Ф-НСД могут быть потенциально эффективными носителями, особенно полезными для доставки гидрофобных химиотерапевтических агентов для лечения рака с высоким уровнем экспрессии фолатных рецепторов [83]. Целью исследования [84] была разработка наночастиц альбумина-серицина (НЧ Аль-Сер) в качестве новой системы доставки миРНК (малых интерферирующих РНК) для лечения рака гортани. Включение серицина в структуру альбумина улучшило устойчивость к рН-зависимому разложению. Потенциальная терапевтическая способность этих легко приготовленных, экономически эффективных и безопасных систем

доставки миРНК продемонстрировала, что эти НЧ могут быть разработаны путём дальнейших исследований *in vitro* и/или *in vivo* для генной терапии и могут стать многообещающей альтернативой доступным коммерческим продуктам [84].

Таким образом, было обнаружено, что серицин активирует пролиферацию нескольких клеточных линий, а также проявляет различную биологическую активность. Серицин сам по себе может образовывать гель; однако после смешивания с другими полимерами и сшивания он может образовывать плёнку или каркас с хорошими характеристиками. Благодаря своим уникальным свойствам серицин находит применение в медицине, косметологии, фармацевтике и при создании биоматериалов.

---

### **1.2.2. Композиционные материалы на основе биополимеров**

---

В настоящее время многие биосовместимые и биоразлагаемые полимеры экспериментально и/или клинически исследованы для получения композитов на полимерной основе в качестве носителей лекарственных средств. Путем проектирования композитной структуры биополимеров можно получить определенные физико-химические и механические свойства. Полученный материал может демонстрировать сочетание лучших свойств компонентов, а также интересных особенностей, которыми часто не обладают отдельные компоненты. Полимерные композиты могут помочь улучшить количество и кинетический профиль высвобождения потенциальных и существующих лекарств. Стоит отметить, что полимерный композит после пребывания в течение достаточного времени для высвобождения его наночастиц должен разлагаться и уничтожаться без дискомфорта для пациента [85]. В настоящее время, композитные структуры представляются перспективными носителями лекарств, имеющими многочисленные преимущества перед традиционными формами, но нам всё ещё необходимо углубить знания об их свойствах и

особенностях, которые получаемые композиты способны приобретать при тщательном составлении их смеси.

Методы инкапсуляции позволяют создавать композитные частицы, которые обычно имеют интересующий материал ядра, покрытый вторичным материалом. Основываясь на свойствах формирования слоя вокруг гидрофобных частиц, инкапсуляция может придать новые свойства контролируемого высвобождения материала - ядра, защиту от неспецифических химических взаимодействий, простоту обращения и транспортировки, а также лёгкое отделение от матрицы от общей частицы композита. В целом, обзорные статьи подчеркивают растущую важность методов инкапсулирования в различных областях, таких как фармацевтика, нутрицевтика и продукты питания [86].

---

### **1.2.3. Композиционные материалы на основе серицина шёлка**

---

Авторы [12, 87–93] отмечают, что белок серицин востребован благодаря своим уникальным свойствам, включая антиоксидантные, увлажняющие, заживляющие, антибактериальные, защитные от ультрафиолетового излучения и противоопухолевые, что делает его полезным для применения в различных сферах. Полярные группы аминокислотных боковых цепей, такие как карбоксильные, гидроксильные и аминогруппы, вместе с органическим составом, растворимостью и структурной организацией серицина обеспечивают возможность его сшивания, сополимеризации и комбинирования с другими полимерами для создания материалов с улучшенными свойствами. Серицин также применяется в качестве улучшителя или покрытия для натуральных и синтетических волокон, тканей и изделий. Модифицированные, серицином, материалы и его композиты находят применение как биоразлагаемые биоматериалы, биомедицинские материалы, полимеры для формования изделий, функциональные мембраны, волокна и ткани [12].

По сравнению с фиброином серицин не является структурным белком, поэтому материалы на основе серицина не обеспечивают надежных

механических свойств. Чтобы решить эту проблему, Фенг Ванг и др. [87] сообщают об эффективном методе изготовления композитов фиброин-серицина шёлка (ФС-СШ) непосредственно из целых коконов, исключая традиционный этап экстракции для удаления серицина. Этот подход сочетает в себе характеристики материала фиброина как структурной единицы, а также серицина как биологической функциональной единицы, чтобы достичь преимуществ в отношении обработки и свойств материалов. Он не только упрощает обработку и сохраняет механические свойства фиброина, предотвращая дегуммирование, но и обеспечивает эти свойства. Композиционные материалы ФС-СШ с повышенной гидрофильностью и адгезией клеток, способствуют росту и пролиферации клеток. Кроме того, из этих белковых композитов можно изготавливать материалы различных форматов (например, плёнки, губки, монолиты) для различных биомедицинских применений. Серицин, присутствующий в этих материалах ФС-СШ, не вызывал воспалительной реакции *in vitro*. Эти материалы ФС-СШ поддерживали адгезию, рост и пролиферацию клеток, тем самым предлагая потенциальное применение в качестве биоматериалов.

В исследовании [88] был разработан и изготовлен стабильный и функциональный композитный гелевый биоматериал на основе белка серицина с улучшенной активностью пролиферации клеток с использованием генно-инженерного шелкового материала, содержащего цитокины человеческого происхождения в сочетании с молекулами агарозы. Композитный гелевый материал имеет пористую структуру и состоит из белковой сети серицина, молекулярной сети агарозы и перекрестной сети серицин-агарозы, образованной за счет водородных связей. Такая сложная организация позволила увеличить стабильность и механические свойства материала примерно в два раза. Полученный гель не вызывал явной цитотоксичности или серьезных воспалительных реакций ни *in vitro*, ни *in vivo*. В совокупности этот композитный гелевый материал имеет потенциал медицинского применения для восстановления и регенерации поврежденных тканей.

В работе [89] сообщается о разработке и оценке нанокompозитных плёнок хитозан-серицин-серебро (НХСАg) без и с моксифлоксацином (Мок). Метод получения плёнки заключался в синтезе наночастиц серебра *in-situ* в составе коллоидного композита хитозан-серицин с последующим приготовлением плёнки методом литья в растворитель. Композитные плёнки также показали устойчивое высвобождение и проникновение Мок *in vitro*. Исследования чувствительности к антибактериальным препаратам *in vitro* доказали многообещающее антибактериальное поведение композитных плёнок против грамположительных (*S. aureus*, *S. epidermidis*) и грамотрицательных (*P. aeruginosa* и *A. baumannii*) патогенных бактерий. Оценка *in vivo* на модели крыс с ожогами показала, что полученные нанокompозитные плёнки проявляют свойства более быстрого заживления ран, а гистологические изменения (новообразование кровеносных сосудов, регенерация эпидермиса и отложение коллагена) продемонстрировали их применимость в качестве эффективного материала для ухода за ранами [89].

Наночастицы и микрокапсулы из шелкового композита позволяют загружать как полярные, так и неполярные агенты для адресной доставки. Будучи биосовместимыми, сам серицин или композитные материалы серицина могут быть легко использованы в качестве носителя микросфер лекарственного средства или материала-покрытия, поскольку они обладают регулируемыми профилями высвобождения лекарственного средства. Кумар и др. [3] использовали серицин для адресной доставки лекарств. Большинство лекарств вызывают побочные эффекты на желудок из-за их непосредственного воздействия на кислотную среду при пероральном приёме.

Природное свойство серицина обеспечивает его устойчивость к кислотам и, следовательно, может использоваться в качестве идеального капсульного материала для доставки лекарств в тонкий кишечник, где происходит большая часть всасывания лекарства, поскольку рН кишечника щелочная, а серицин легко растворяется в слабых щелочах. Также исследовали возможность приготовления основы-носителя для таких лекарств путем приготовления микрочастиц и

шариков из белка серицина для направленной доставки лекарств без каких-либо побочных эффектов [3].

---

#### **1.2.4. Инкапсуляция биологически активных соединений (БАС) в биополимерных композитах**

---

Как правило, инкапсулирование биологически активных агентов включает три стадии: (1) формирование стенки вокруг материала, который должен быть инкапсулирован; (2) обеспечение предотвращения нежелательной утечки; 3) обеспечение отсутствия нежелательных материалов. Текущие методы инкапсуляции включают распылительную сушку, распылительное охлаждение, экструзию, покрытие в псевдооживленном слое, коацервацию, захват липосом, комплексообразование с включениями, центробежное разделение суспензии, лиофилизацию, сокристаллизацию, эмульсию и т.д. [90].

Нутрицевтики или функциональные продукты [91] - это современный термин, используемый для описания экстрактов растений, овощей, фруктов и корней, которые способствуют поддержанию здоровья, приносят пользу и могут помогать в лечении определённых заболеваний. Список потенциальных нутрицевтиков (антиоксиданты, биоактивные пептиды, витамины, пробиотики и т.д.) бесконечен. Последние исследования и применение полифенолов, являющихся природными антиоксидантами, привлекли значительное внимание производителей функциональных продуктов питания, нутрицевтиков и фармацевтической продукции из-за их потенциальной пользы для здоровья человека.

Полифенолы (то есть флавоноиды) - это природные соединения, содержащиеся во многих овощах, фруктах, орехах, злаках и травах, которые естественным образом действуют как антиоксиданты и обладают антиоксидантными свойствами с преимуществом низкой токсичности. Эффективность полифенольных соединений (ПФС) зависит от сохранения стабильности, биологической активности и биодоступности активных

ингредиентов. Однако их потенциальный неприятный вкус, например, терпкость, ограничивает их применение, которую необходимо замаскировать перед добавлением в пищевые продукты. Использование инкапсулированных полифенолов вместо свободных соединений может уменьшить неприятный вкус или запах, нестабильность, а также улучшить биодоступность и время полужизни соединений *in vivo* и *in vitro* [90, 92].

Из-за более высокого спроса потребителей на более здоровые продукты в последние несколько лет растет интерес к инкапсулированию БАС для разработки функциональных продуктов питания и нутрицевтиков. Термин «инкапсуляция» относится к процессу, в котором биоактивное соединение окружается материалом покрытия для сохранения или улучшения его физико-химических свойств во время процесса, хранения или потребления пищи. Выбор подходящего метода капсулирования БАС будет зависеть от физико-химических свойств соединений, материала покрытия и характеристик конечного продукта, таких как, например, размер его частиц, эффективность капсулирования и нагрузочная способность, а также контролируемое высвобождение [93]. На основании этих рассуждений, методы инкапсуляции классифицируются по различным критериям с учетом экономических и экологических аспектов [86].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Характеристика исходных веществ

В работе были использованы такие реагенты, как соляная и серная кислоты марки (х.ч.), гидроксид натрия и калия (ч.д.а.), кальция и аммония (х.ч.), трилон Б (фиксанал), метанол (х.ч.), этанол (ректификат) и изопропанол (х.ч.).

Растворы соляной кислоты с определенным значением pH готовили путем разведения концентрированной кислоты с дистиллированной водой. pH раствора определяли на pH-метре. Стандартные растворы соляной кислоты, гидроксида натрия и трилона Б готовили из соответствующих фиксаналов.

Растворители, которые применяли в исследованиях, очищали по известным методикам. Использованные соли, кислоты, щелочи имели марку «х.ч.» или «ч.д.а.» производства *Sigma Aldrich* или «*Рeахим*».

В качестве объектов исследования использовались бракованные коконы тутового шелкопряда из кокономотальных фабрик Республики Таджикистан.

### 2.2. Приготовление исходных растворов

---

#### 2.2.1. Приготовление раствора серицина

---

На аналитических весах (*Acculab ALC-210.4*,  $d = 0.0001$  г) взвешивали точную навеску серицина (*экстрагированного 0.5%-ным раствором  $Na_2CO_3$* ), добавляли небольшое количество дистиллированной воды, перемешивая на магнитной мешалке в течение 2 ч. Затем, объём раствора доводили водой до 50 мл и перемешивали до полного растворения серицина. Полученный раствор центрифугировали при 4500 об/мин в течение 30 мин, осадок отделяли и высушивали при 60-70<sup>0</sup>С в сушильном шкафу, взвешивали и рассчитывали концентрацию раствора по разнице взятой навески и массы осадка.

---

#### 2.2.2. Приготовление раствора пектина

---

На аналитических весах взвешивали точную навеску пектина (низкометилованный (НМ)-пектин, полученный из яблочных выжимок на пилотной установке, с содержанием галактуроновой кислоты (ГК, %) 58.6, степенью этерификации (СЭ, %) 38.0 и молекулярной массой ( $M_w$ ) 110.2 кДа (далее обозначенные как НМПЯ), добавляли несколько капель этилового спирта во избежание комкования и перемешивали для удаления пузырьков воздуха из полимера, затем добавляли небольшое количество 0,1М раствора NaCl, перемешивая на магнитной мешалке в течение 2 ч. Затем, объём раствора доводили до 25 мл и перемешивали до полного растворения пектина. Полученный раствор центрифугировали при 5000 об/мин в течение 30 мин, осадок отделяли и высушивали при 60-70<sup>0</sup>С в сушильном шкафу, взвешивали и рассчитывали концентрацию раствора по разнице взятой навески и массы осадка.

---

### **2.2.3. Приготовление раствора полифенольных соединений**

---

На аналитических весах взвешивали точную навеску полифенольных соединений (ПФС) прополиса из пчелиного хозяйства Яванского района Республики Таджикистан, полученного экстракцией 70%-ным раствором этанола), добавляли небольшое количество 80%-го раствора этанола, перемешивая на магнитной мешалке в течение 2 ч. Затем, объём раствора доводили до 35 мл и перемешивали до полного растворения ПФС.

---

### **2.2.4. Приготовление буферных растворов**

---

Буферный фосфатный (pH=6.4) раствор был приготовлен согласно справочнику по аналитической химии [94].

## **2.3. Методы получения серицина**

---

### **2.3.1. Обезжиривание коконных оболочек тутового шелкопряда**

---

Энтомологический материал сушили при температуре 110°C в течение 1 часа, затем определённое количество высушенного материала экстрагируют с подходящим растворителем многократно до полного извлечения жиро-восковых веществ (ЖВВ).

Разрезанные на мелкие фрагменты оболочки бракованных коконов помещали в бумажный патрон и вставляли в экстрактор аппарата Сокслет. Для экстракции ЖВ веществ используют органические растворители: например, смесь гексана со спиртом (3: 2 по объёму) или этилацетат. Время экстракции: 5 часов, температура водяной бани 80°C, продолжительность каждого цикла кипения с обратным холодильником 30 мин., количество циклов 12 [6]. В собранный аппарат через холодильник заливали этилацетат, включали воду и нагревающее устройство. Экстракцию проводили при температуре 80°C до обесцвечивания раствора этилацетата (8-10 циклов). В конце процесса растворитель отделяют от осадка фильтрованием, а затем упаривают на роторном испарителе, получая смесь твёрдого и полутвёрдого воска, который несколько раз промывают эфиром, затем сушат в сушильном шкафу при 37°C. Полученные, таким образом, промежуточные продукты состоят из жиров, воска, полифенолов и соединений сахаров.

---

### 2.3.2. Экстрагирование серицина из коконных оболочек тутового шелкопряда

---

Экстрагирование шелковых отходов производилось в двух вариантах:

А- в дистиллированной воде;

Б – в слабощелочном растворе карбоната натрия.

#### ***Вариант А:***

Фрагменты оболочек (50 гр) бракованных коконов тутового шелкопряда были разделены на мелкие части и подвергнуты кипячению в течение 60 минут в 1 литре дистиллированной воды при температуре 85–90°C на водяной бане. Полученный экстракт объёмом 0.670 литра, имеющий однородную

консистенцию светло-коричневого цвета и вязкостью 4.5 единицы, был использован для приготовления шлихты.

### ***Вариант Б:***

Слабощелочной раствор с концентрацией 0.02 М был приготовлен путем растворения 5 г порошка карбоната натрия в 1 литре дистиллированной воды. Затем 50 г раздроблённых оболочек бракованных коконов были помещены в стеклянную посуду объёмом 1.5 литра и залиты 1 литром слабощелочного раствора. Полученный раствор подвергался кипячению в водяной бане при комнатной температуре (26°C) в течение 60 минут. Полученный экстракт объёмом 0.760 литра, имеющий однородную консистенцию темно-коричневого цвета и вязкость 5.6 единицы, также был использован для приготовления шлихты [6].

## **2.4. Методы анализа серицина**

---

### **2.4.1. Определение общего количества белка по методу Bradford**

---

Общее содержание белка в каждом из экстрактов определяли классическим методом Брэдфорда [95] и калибровали с использованием образцов сывороточного альбумина в диапазоне 1–10 мкг/мл. Значения поглощений измеряли при 595 нм. Поскольку комплекс белка с красителем стабилен до 60 минут, значения поглощений регистрировали до этого предела времени и в пределах 10 минут друг от друга. Концентрация белка в образцах была рассчитана путём сравнения значений оптической плотности ( $D_{595}$ ) со значением  $D$  стандартной кривой.

Метод основан на прямом связывании Кумасси G-250 с аминокислотными остатками аргинина, триптофана, тирозина, гистидина и фенилаланина в белке, причем с аргинином он связывается в восемь раз чаще, чем с другими аминокислотными остатками. Поэтому, если известно, что белок обогащен остатками аргинина (пример, гистон), то в качестве стандарта необходимо также использовать аргинин-богатый белок. Комплекс Кумасси-аргинин имеет

максимум поглощения при 595 нм, тогда как сам краситель в растворе – при 470 нм.

Спектры поглощения комплекса и чистого красителя перекрываются, поэтому очень важно следить за соотношением красителя и белка, так как их неконтролируемое изменение будет приводить к ошибкам измерения. Если по какой-то причине метод Bradford используется для определения белка в широком диапазоне концентраций (до 1500 мкг/мл), то очевидно, что калибровочный график не будет линейным. Однако им можно пользоваться если «разбить» его на линейные отрезки с целью получения линейной зависимости для каждого участка. Еще один аспект, возникающий при использовании этого метода – возможное взаимодействие компонентов буфера образца с красителем. Необходимо проверять реакцию буферной смеси, в которой находится белок, на взаимодействие с красителем. В случае взаимодействия, необходимо удалить эти компоненты из раствора.

При постановке реакции Bradford используют соотношение объёма реактива Bradford к образцу равное 50:1 (минимально рекомендуемый объём соответствует 200 мкл реагента и 4 мкл образца). Следует отметить, что для измерения лучше использовать стеклянные кюветы, так как на стенках кварцевых и пластиковых кювет адсорбируется значительное количество красителя.

*Приготовление реактива Bradford.* 100 мг красителя Кумасси ярко-голубого (Coomassie Blue Brilliant G250) растворяли в 50 мл 96% этанола. Затем к этому раствору, постоянно перемешивая его стеклянной палочкой, добавить 100 мл 85% фосфорной кислоты. При добавлении фосфорной кислоты окраска раствора из синего должна перейти в коричневый. В стакан объёмом 1 л налить 500-700 мл дистиллированной воды и медленно, помешивая воду стеклянной палочкой, добавлять в неё раствор, содержащий краситель Кумасси голубой, этанол и фосфорную кислоту. Довести раствор до 1 литра и оставить на ночь при комнатной температуре. После этого полученный раствор необходимо профильтровать. Реактив Bradford хранить в холодильнике в колбе из темного стекла с притёртой пробкой. При длительном хранении (более 1 месяца) реактив необходимо повторно калибровать. Взвешивают на весах 200 мг исследуемой ткани. Растирают ее до образования однородной массы (гомогената) с 50 мл фосфатного буфера (рН 7.4) в фарфоровой ступке на холоде. Экстракцию белка

проводят в течение 1 ч при постоянном помешивании при 4 °С. Затем гомогенат центрифугируют 10 мин при 8 000 об/мин. Супернатант используют для определения белка.

Определение концентрации в опытных образцах. 0.1 мл раствора препарата, содержащего 0.01-0.1 мг испытуемого белка помещают в пробирки, прибавляют 5 мл реактива Bradford, перемешивают и оставляют при комнатной температуре в течение одинакового времени в интервале, как правило, 10 мин. Оптическую плотность измеряют при длине волны 595 нм. В качестве раствора сравнения вместо образца берут аналогичное количество буфера или экстрагирующего раствора. Содержание белка в пробе в мг/л определяют по калибровочному графику. Измерения проводят в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях. Построение калибровочной кривой Калибровочную кривую строят, используя бычий сывороточный альбумин (БСА) или яичный альбумин. Приготовление раствора БСА: 10 мг БСА растворить в 10 мл дистиллированной воды – концентрация раствора 1мг/мл. Затем готовят второй стандартный раствор, для этого берут 1 мл первого стандартного раствора и 9 мл Н<sub>2</sub>О (общий объём этого раствора – 10 мл). Концентрация второго стандартного раствора 0.1 мг/мл. Из второго стандартного раствора готовят серию разведений в пробирках в соответствии со схемой (таблица 2.1).

**Таблица 2.1. - Приготовление растворов белка для построения калибровочного графика.**

Концентрация раствора белка (мкг/мл)	Количество исходного раствора белка в мкл	Количество Н <sub>2</sub> О в мкл
10 мкг/мл	100	900
20 мкг/мл	200	800
30 мкг/мл	300	700
40 мкг/мл	400	600
50 мкг/мл	500	500
60 мкг/мл	600	400
70 мкг/мл	700	300
80 мкг/мл	800	200
100 мкг/мл	100	-

Для построения калибровочного графика берут 0.1 мл соответствующего раствора белка, помещают в пробирки, прибавляют 5 мл реактива Bradford, перемешивают и оставляют при комнатной температуре в течение одинакового времени в интервале, как правило, 10 мин. Оптическую плотность измеряют при длине волны 595 нм. В качестве раствора сравнения вместо образца берут аналогичное количество буфера или экстрагирующего раствора [95, 96].

---

#### **2.4.2. Определение относительной вязкости раствора серицина.**

---

К очищенной навеске серицина добавляли рассчитанное количество 1%-го раствора NaCl и при интенсивном перемешивании с помощью магнитной мешалки растворяли, небольшое количество нерастворимых остатков отделяли центрифугированием при скорости ротора равной 7000 об/мин, высушивали и учитывали при расчёте концентрации раствора. Измерение времени течения растворов различной концентрации (от 0.20 до 0.06 г/дл) проводили на вискозиметре Уббелюде (время течения растворителя 53 сек) при 25°C с точностью 0.1 сек. По полученным данным рассчитывают приведенные вязкости в зависимости от концентрации раствора и путем экстраполяции первого параметра к нулевой концентрации определяют значение характеристической вязкости [97].

Для определения относительной вязкости растворы фильтровали через фильтр Шотта №2. Относительную вязкость раствора серицина при экстракции солевым (С) и водным (В) растворами рассчитывали по следующей формуле:

$$\eta_{от} = t_{р-р} / t_{р-тель} \quad (2.1).$$

где,  $\eta_{от}$  - относительная вязкость,  $t_{р-р}$  - время прохождения раствора через капилляр вискозиметра,  $t_{р-тель}$  - время прохождения растворителя через капилляр вискозиметра.

---

#### **2.4.3. Определение белков спектрофотометрическим методом [98].**

---

Растворы стандартных белков готовили в трех повторностях (концентрация 0.5 мг/мл). Препарат пероксидазы растворяли в ацетатном буфере (рН 5), альбумин яичный и лизоцим – в фосфатном буфере (рН 7.9), остальные белки – в воде.

Оптическую плотность растворов определяли на спектрофотометре UV 1 Thermo Spectronic (Англия) в 1 см кювете, используя программу измерения, состоящую из трех блоков по значениям аналитических длин волн (235, 260 и 280 нм). Расчет концентрации белка и статистическую обработку данных проводили на компьютере по разработанной программе.

Концентрацию белка (мг/мл) по значениям оптической плотности при 260 и 280 нм рассчитывали по формуле [2.2], а при 235 и 280 нм – по формуле [2.3]:

$$C = 1.45D_{280} - 0.74D_{260} \quad (2.2)$$

$$C = (D_{235} - D_{280}) / 2.51 \quad (2.3).$$

---

#### 2.4.4. Определение белков электрофоретическим методом

---

Для анализа белкового состава молочной сыворотки одним из достаточно информативных методов является электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ). Качественный состав белков молочной сыворотки изучали методом вертикального электрофореза [99] в градиентном ПААГ (4-14%), содержащем SDS-Na при рН 8.3. Используемая мини электрофоретическая система фирмы SIGMA дает существенно лучшие результаты и позволяет идентифицировать большое количество белковых фракций сыворотки, включая минорные компоненты, оценить общую картину белкового спектра и определить молекулярные массы белков.

Молекулярные массы белков определяли по калибровочному графику, построенному в зависимости от подвижности белков – стандартов фирмы SIGMA.

Для электрофоретического разделения белков молочной сыворотки использовали 14% разделяющий и 4% концентрирующий гели. В качестве

электродного буфера использовали 0.025 М трис-глициновый буфер (pH 8.3). Образцы растворяли в буфере содержащем 0.44 М Трис-ОН, 0.1% мМЕДТА, 10% SDS-На и 20%  $\beta$ -меркаптоэтанола. Электрофорез проводили при напряжении 120 V в течении 16-20 часов. Гель окрашивали в 0.25% растворе Кумасси G-250, фон отмывали водой от избытка красителя и высушивали между слоями целлофана.

---

#### 2.4.5. ИК- Фурье спектроскопия белка серицина

---

ИК-спектроскопию широко применяют для анализа вторичной структуры белков. Для анализа и структуры белка серицина, полученного из шёлковых отходов, использовали ИК-спектрофотометр с Фурье преобразованием (FT-IR Spectrum 65 (Perkin Elmer) с использованием приставки нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО, attenuated total reflection ATR). Образец белка серицина сушили при 110°C в течение 30 минут и анализировали с помощью ИК-Фурье-спектроскопии.

Образец регистрировали в диапазоне сканирования 400-4000  $\text{см}^{-1}$  со 128 сканирований со спектральным разрешением 2  $\text{см}^{-1}$  [100]. Устройство контроля давления обеспечивало хороший контакт между образцом и кристаллом. Фоновый спектр был получен на воздухе.

---

#### 2.4.6. Определение молекулярной массы серицина

---

Средневесовую ( $M_w$ ), среднечисловую ( $M_n$ ), z-среднюю ( $M_z$ ) молекулярную массы и показатель полидисперсности ( $M_w/M_n$ ) были определены методом эксклюзионной жидкостной хроматографии (ЭЖХ) [101,102]. Сухие образцы серицина (~2 мг/мл) растворяли в подвижной фазе (0.05 М  $\text{NaNO}_3$ ), центрифугировали при 20 000 об/мин в течение 30 мин и фильтровали через мембранный фильтр (Millex HV 0.22 мкм, Millipore Corp., США). Скорость потока составляла 0.8 мл/мин, а объём инъекции – 100 мкл задавалась с

помощью программы Breez (Waters). Система доставки растворителя состояла из двухканального вакуумного дегазатора, насоса высокого давления (Waters 1515 Isocratic Pump), и автоинжектора (717 Plus AutoInjector, Waters). Для разделения белка серицина использовали две колонки, содержащие PL-Aquagel OH40 и PL-Aquagel OH60. Образцы запускали в 3-кратной повторности. Выход фракции белка из колонки обнаруживали последовательно с помощью детекторов ViscoStar и RI 2410 (Waters, США). Электронные выходы обоих детекторов были подключены к отдельным последовательным портам одного и того же персонального компьютера, таким образом, чтобы данные могли одновременно собираться и обрабатываться программным обеспечением ASTRA 5.3.4.20 (Wyatt Technology, США) и Breez (Waters, США). Колонки калибровали с использованием серии стандартных образцов Pullulan (Showa Denko K. K., Япония) со значениями  $M_w$  788; 667; 404; 112; 47.3 и 22.8 кДа соответственно [102].

Значения  $M_w$ ,  $M_n$  и  $M_z$  для серицина были получены с использованием универсальной калибровки. Среднее значение приращения показателя преломления (равное 0.185 мл/г) от концентрации ( $dn/dc$ ) было взято из литературы [103].

---

#### **2.4.7. Определение молекулярной массы и молекулярно-массового распределения образцов серицина методом турбидиметрии**

---

Было исследовано молекулярно-массовое распределение (ММР) серицина, полученного из коконов тутового шелкопряда (*Bombyx mori*), экстрагированного различными методами, посредством доступного метода турбидиметрического титрования в концентрированном растворе.

Для исследования использовали три образца серицина: серицин экстрагированный 0.5%-ным раствором  $Na_2CO_3$  (серицин 1), серицин

экстрагированный дистиллированной водой (серицин 2) и коммерческий серицин производства Sigma (серицин 3).

Предварительно все растворы, очищали пропусканием через тонкопористую мембрану (0.2 мкм, PVDF, Millipore Corp., США).

В первом эксперименте в 0.25 г серицина (образцы 1, 2, 3) добавляли по 50 мл воды и перемешивали до полного растворения. Во 2-м эксперименте в 0.5 г серицина (образцы 1, 2) добавляли по 50 мл воды и также перемешивали до полного растворения. Затем растворы центрифугировали при 5000 об/мин. После удаления механических примесей и осадка концентрации растворов составили 0.47% для серицина 1, 0.45% для серицина 2 и 0.50% для серицина 3 первого эксперимента; 0.98% для серицина 1 и 0.94% для серицина 2 второго эксперимента. Турбидиметрическое титрование проводили на лабораторном турбидиметре 2100 AN IS (HACH, USA) при температуре  $20 \pm 0.3^\circ\text{C}$ . Вначале проводили предварительное грубое титрование: 30 мл раствора серицина с концентрацией 0.47% помещали на магнитную мешалку Variomag (Thermo Scientific, США) и при перемешивании титровали 96%-ным раствором спирта до появления еле заметного помутнения. Замеряли объём осадителя, израсходованного на грубое титрование.

Далее проводили точное титрование. Для этого в стаканчик наливали исходный раствор серицина, соответствующий приблизительно объёму измерительной ячейки, ставили на магнитную мешалку и при непрерывном перемешивании добавляли определенное количество осадителя – 96%-ный этанол. После каждой порции осадителя переливали содержимое стаканчика в стандартный герметичный сосуд, который помещали в измерительную ячейку турбидиметра и определяли мутность в нефелометрических единицах (NTU). Отсчеты производили при добавлении осадителя до тех пор, пока мутность раствора не перестала изменяться. Обработка полученных данных проводилась по методике, описанной в работе [104].

## **2.5. Эмульсионные микрокапсулы, стабилизированные комплексом белка и пектина**

### **2.5.1. Приготовление эмульсионных микрокапсул в системе масло в воде (м/в)**

Микрокапсулы получали по методике, описанной в работе [105, 106] с некоторыми изменениями: в ёмкость, установленную в водяную баню при температуре 60<sup>0</sup>С наливали 3 мл растительного масла и при перемешивании на цифровом гомогенизаторе ИКА Т-25 (ULTRA TURRAX, ИКА-WERKE GMBH & CO.KG, Germany) при скорости 12 000 об/мин добавляли 5 мл 0.5%-ного спиртового раствора ПФС и 10 мл 0.4%-ного водного раствора серицина (первичная эмульсия). После 15 мин., не прерывая перемешивание, медленно добавляли рассчитанное количество 0.2%-ного раствора пектина в 0.1 М NaCl для получения вторичной эмульсии, и продолжили перемешивание ещё 20 мин. Затем, после охлаждения и в течение нескольких дней измеряли объёмы полученных эмульсий для оценки их устойчивости по объёму с течением времени. После достижения стабильного объёма кремового слоя, полученные эмульсии несколько раз промывали дистиллированной водой для удаления несвязанных ПФС (ЛВ). По этой методике были приготовлены микрокапсулы с разными весовыми соотношениями серицина и пектина.

### **2.5.2. Оценка стабильности эмульсий**

Эмульсии хранили в стеклянных градуированных пробирках при комнатной температуре (22-25<sup>0</sup>С) и оценивали устойчивость по объёму с течением времени. Для этого измеряли объём приготовленных эмульсий после охлаждения и в течение нескольких дней до момента образования постоянного объёма кремовидного слоя.

Устойчивость микрокапсул в промытых эмульсиях оценивали микроскопически на микроскопе *OLYMPUS BX53 (OLYMPUS U-TR30-2,*

Япония). Количество микрочастиц и их размеры были определены с помощью компьютерной программы *OLYMPUS cellSens Standard*. На основе этих данных были построены кривые распределения частиц микрокапсул.

Размер частиц представлял собой средневзвешенный по объёму средний диаметр  $d_{43}$ , который рассчитывали по формуле [2.4]:

$$d_{43} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (2.4)$$

где  $n_i$  количество эмульсионных частиц с диаметром  $d_i$ . Согласно данному уравнению, следует отметить, что минимальное значение размера частиц при хранении эмульсии и постоянном объёме является показателем стабильности эмульсии [106, 107].

## **2.6. Определение общей суммы полифенольных соединений методом Фолин-Чокальтеу**

Для определения содержания фенольных соединений применяется спектрофотометрический метод с использованием реактива Фолина-Чокальтеу, содержащего в своем составе фосфовольфрамовые и фосфомолибденовые гетерополикислоты, которые восстанавливаются фенольными соединениями в щелочной среде. Это приводит к образованию комплекса синего цвета (вольфрамовая синь или гетерополисини), интенсивность окраски которого пропорциональна количеству фенольных соединений.

Метод основан на реакции окисления полифенольных соединений водно-спиртового экстракта прополиса реактивом Фолина-Чокальтеу и последующим фотометрированием образующейся «сини» при длине волны 765 нм. В качестве внутреннего стандарта используют галловую кислоту.

Используя чистую пробирку емкостью 50 мл, готовят 1 N реагент Фолина-Чокальтеу, смешав 2 N реагент Фолина-Чокальтеу с 50% этанолом в пропорции

1:1: 25 мл реагента 2N Фолина-Чокальтеу и 25 мл 50% этанола. Встряхивают, чтобы перемешать, накрывают пробирку алюминиевой фольгой для защиты от света при температуре 4°C не более 3 месяцев.

Далее готовят раствор натрия углекислого с массовой долей 20 %. Используя пробирку емкостью 50 мл, содержащую 10 г  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , добавляют 50 мл дистиллированной воды и интенсивно встряхивают пробирку до тех пор, пока соль полностью не растворится.

*Для приготовления основного раствора галловой кислоты с массовой концентрацией 100 мкг/мл, добавляют 1 мл горячей дистиллированной воды в пробирку, содержащую 5 мг галловой кислоты, с помощью пластикового шприца емкостью 1 мл. Встряхивают, пока полностью не растворится, переливают в чистую колбу емкостью 50 мл, а затем объем раствора в колбе доводят до метки горячей дистиллированной водой.*

*Приготовления рабочих растворов галловой кислоты. Используя основной раствор галловой кислоты 100 мг/мл и дистиллированную воду, готовим следующие серийные разведения: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 и 0 мг/мл согласно нижеприведенной таблице, тщательно встряхивая. Рабочие растворы не подлежат хранению.*

При определении общей суммы полифенольных соединений растительного экстракта методом Фолина-Чокальтеу в пробирки Эппендорфа вносим пипеткой 200 мкл реагента 1 N Фолина-Чокальтеу а затем пипеткой 200 мкл экстракта прополиса, хорошо встряхиваем, тщательно перемешиваем, затем даём пробиркам настояться в течение 10 минут при комнатной температуре. Через 10 минут пипеткой добавляем 300 мкл 20% раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Параллельно готовим контрольный раствор, добавляя 200 мкл дистиллированной воды. Пробирки плотно закрывают, а затем помещают в водяную баню с температурой 40°C на 20 минут.

Через 20 минут быстро охлаждаем пробирки до комнатной температуры, чтобы остановить реакцию, положив их на лед или в холодную воду на 1 минуту.

Растворы приобретают синий или бело-голубой цвет, а на дне пробирок присутствует осадок.

В течение следующих 10–15 минут измеряем поглощение при 765 нм на УФ-видимом спектрофотометре *UVIThermo spectronic* (Англия).

Измеряем образцы еще два раза и вычисляем среднее значение в программе *Excel*.

Для построения градуировочного графика берут среднеарифметическое значение результатов трех измерений оптической плотности каждого рабочего раствора галловой кислоты. Строят градуировочный график, откладывая на оси ординат значение массовой концентрации галловой кислоты, а на оси абсцисс-оптическую плотность.

Градуировочный график должен быть линейным. Градуировочный график строят каждый раз перед проведением измерений.

По градуировочному графику находим значение массовой концентрации галловой кислоты в растворе прополиса (С), мг/мл. [108].

## **2.7. Методика разделения полифенольных соединений на капиллярном электрофорезе**

Определение общего содержания полифенольных соединений (ПФС), включая флавоноиды и фенольные кислоты анализировался с помощью капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ). Эксперименты по КЗЭ проводились на системе капиллярного электрофореза 3D Agilent G1600AX (Германия), оснащенной системой детектирования на основе диодной матрицы. Колонка была откалибрована с использованием стандарта 18 фенольных соединений [109].

Разделение ПФС проводили на капиллярном электрофорезе (3DAgilent HPCE G1600AX, фирмы Agilent Technologies, США) с использованием капилляра с полимерным покрытием, химически инертным. Концентрация

образца 1 мг/мл в 30 мМ-ом боратном буфере, рН 9.3, 5 % изопропанолом; напряжение 10 kV постоянное, обратная полярность (к аноду).

## **2.8. Исследование антиоксидантной активности полифенольных соединений**

Антиоксидантную активность (АОА) определяли методом, основанным на реакции с 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) радикалами [110].

2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH) представляет собой свободный радикал, это высокоактивная молекула, которая имеет один неспаренный электрон и стремится присоединить к себе любой другой неспаренный электрон. Если в раствор DPPH внести некое вещество, имеющее также свободный радикал (электрон), то неизбежно пройдет реакция, в результате которой образуется дифенил-пикрилгидразин.

DPPH со свободным радикалом имеет темно фиолетовое окрашивание. Если гидразИЛ превращается в гидразИН, то окраска ослабевает и меняется на желтую. Чем больше вносится в систему свободных радикалов R•, тем сильнее ослабевает окраска раствора. В этом суть метода – чем больше в системе свободных радикалов, тем выше антиоксидантные свойства системы. Соответственно строится калибровка – зависимость снижения интенсивности окраски DPPH от концентрации антиоксиданта. Чем выше концентрация антиоксиданта, тем сильнее снижается окраска DPPH – от темно-фиолетовой до желтой. В качестве стандартного раствора обычно используют стандарты известных антиоксидантов (аскорбиновая кислота, тролокс, кверцитин). В результате восстановления DPPH антиоксидантом снижается пурпурно-синяя окраска DPPH в метаноле, а реакция контролируется по изменению оптической плотности (D) при 517 нм обычными методами спектрофотометрии. Данный метод в значительной степени основан на принципе, что антиоксидантная

активность испытуемого антиоксиданта эквивалентна его электроно-донорной способности или так называемой восстанавливающей способности.

Измерения проводились на УФ-видимом спектрофотометре (UV1 Thermo spectronic, Англия) при длине волны 517 нм.

Рабочий раствор DPPH радикалов (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), Sigma-Aldrich) получают растворением 0.0024 г DPPH в 100 мл 95%-ном этаноле с концентрацией 0.06 мМ. Раствор используют свежеприготовленный, хранению не подлежит.

*Разбавленный контрольный раствор* готовят разведением 2.5 мл воды с этанолом в мерной колбе на 25 мл. Оставляют в течение 20 мин при 20°C. При необходимости фильтруют через фильтр.

*Определение.* 1.5 миллилитра исследуемого образца смешивают с 1.5 миллилитрами DPPH реактива и тщательно перемешивают, оставляют в темноте на 30 мин.

*Контроль:* Добавляют в пробирку 1.5 мл разведенного контрольного раствора и 1.5 мл раствора DPPH и хорошо перемешивают. Хранят 30 мин в темноте и определяют оптическую плотность при 517 нм.

АОА экстрактов сравнивали с антиоксидантной активностью стандартного антиоксиданта аскорбиновой кислоты. Антиоксидантная активность (%) вычисляется по формуле [2.5]:

$$AOA (\%) = [(D_{\text{контроль}} - D_{\text{образец}}) / D_{\text{контроль}}] \times 100 \quad (2.5)$$

Анализ проводят в трех повторах, и значения рассчитываются с использованием программы *Microsoft Excel*.

Результаты рассчитываются по калибровочным кривым, составленным с использованием аскорбиновой кислоты (витамина С) [110].

## 2.9. Статистический анализ

Результаты исследования выражены в виде средних значений с указанием стандартного отклонения. Статистическая обработка данных проводилась с использованием парного и непарного t-критерия Стьюдента, а также дисперсионного анализа (ANOVA) для оценки различий между группами.  $P < 0,05$  считалось статистически значимым.

## ГЛАВА 3. ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРИЦИНА ИЗ ШЁЛКОВЫХ ОТХОДОВ

### 3.1. Выделение серицина из отходов шёлка

Как было отмечено в обзорной части работы натуральный шёлк представляет собой непрерывную нить, состоящую из двух соединённых волокон фиброина, которые образуют коконную нить шелкопряда *Bombyx mori* (*B. Mori*) и скрепляются клейким веществом, известным как серицин или шелковый клей. Серицин содержит 18 аминокислот (АК), включая основные АК с высоким содержанием гидрофильных АК, особенно серина, что делает его водорастворимым. В серицине кокона *A. Mylitta* (дикий шелкопряд) содержание серина оценивают в среднем до 19%, в зависимости от метода экстракции. Содержание серина намного выше в серицине *B.Mori* и оценивается в 33% от общего содержания АК. Другие основные АК представляют собой глицин, гистидин, глутаминовую и аспарагиновую кислоты, треонин и тирозин.

Таким образом, шелковый серицин в основном состоит из АК с полярными боковыми цепями, содержащими гидроксильные, карбоксильные или аминогруппы [1, 4, 27, 29, 31].

Серицин, также известный как «шелковый клей», представляет собой глобулярный белок, который составляет 25-30% нити шёлка-сырца. В текстильной промышленности, серицин отделяют от фиброина через «дегуммирование» коконов и выбрасывают в сточные воды [5, 6, 9–12, 15, 18, 19, 27].

В настоящее время разработано несколько методов извлечения серицина из коконов [1, 11, 19, 40, 41, 46, 47], включая термическую обработку с использованием разбавленного раствора карбоната натрия, тройную последовательную экстракцию шёлка водой при 100 °С по одному часу каждая, а также экстракцию в автоклаве при 118 °С в течение 3 часов и другие методы.

---

### 3.1.1. Сравнительный анализ выхода серицина из коконных оболочек при различных условиях экстракции (дегуммирование)

---

В процессе обработки шелковых тканей серицин необходимо удалить, эта процедура направлена на получение шелковых волокон с блестящей поверхностью, мягкими на ощупь и элегантными драпировками [111]. Существуют различные методы экстракции для удаления серицина из шёлка, такие как: а) горячий водный раствор карбоната натрия [19], б) водный раствор мочевины при 85°C [7], с) автоклавирование [7] и другие [112]; все они основаны на растворимости белка в воде. Методы экстракции оказывают большое влияние на выход сырья, а также важное влияние на характеристики серицина [113]. Одним из наиболее распространенных методов экстракции является процесс автоклавирования, поскольку не требуется использование каких-либо химических реагентов и процесс диализа не является необходимым [114].

Серицин, как промышленный отход текстильной и шелковой промышленности может находить применение в различных областях [114] как устойчивый и более дешевый источник белка. Серицин, извлеченный из шелкового кокона, содержит несколько полезных аминокислот, таких как аспарагиновая кислота, глицин и серин. Кроме того, серицин обладает сильной гидрофильностью, что придает ему эффективные биологические и биосовместимые характеристики, включая антибактериальные, антиоксидантные, противораковые и антигиперлипидемические свойства. При использовании в сочетании с другими биоматериалами серицин оказался эффективным в производстве плёнок, покрытий и упаковочных материалов. Недавние исследования указывают на возможность использования серицина в качестве съедобного покрытия [115, 116] для хранения пищевых продуктов.

Существуют различные методы извлечения серицина из шелковых коконов, из которых традиционный метод экстракции с использованием только горячей воды является очень распространенным. Он имеет то преимущество, что позволяет использовать природный полимер, хотя чистота серицина в этом

случае намного ниже, чем при использовании других методов экстракции [112]. Кроме того, имеется очень ограниченная информация о составе серицина, извлеченного методом экстракции горячей водой [116]. Другим традиционным методом экстракции серицина является смесь мыла с щелочью, такого как бикарбонат натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), путем кипячения при атмосферном давлении и высокой температуре [117]. Однако в этом процессе извлечение серицина является неглубоким и его качество неудовлетворительное, что приводит к потере его функциональных свойств [117]. Обычно процесс кипячения при экстракции существенно влияет на структуру белка. После длительных периодов кипячения его молекулярная масса снижается из-за фрагментации серицина, что приводит к деградации аморфных областей, включая их гидрофильные свойства [18]. Учитывая недостатки традиционных методов экстракции, разрабатываются несколько альтернативных методов экстракции серицина.

Анализируя имеющиеся данные литературы, нами, проводилась экстракция серицина из шёлковых отходов в различных вариантах: (А) - в щелочном растворе; (В) – в дистиллированной воде, а также при использовании (внедрении) инновационных методов: вариант (С) – в автоклаве за короткое время и (Д) – предварительная обработка коконов ультразвуком с дальнейшей экстракцией согласно вариантам А и В [3-А, 14-А, 30-А].

**Вариант А:** экстракцию серицина проводили методом щелочного гидролиза с использованием раствора карбоната натрия концентрацией 0,04 М, для приготовления которого 5 г карбоната натрия растворяли в 1 л дистиллированной воды. В стеклянную ёмкость объёмом 1.5 л помещали 50 г оболочек бракованных коконов, предварительно нарезанных на мелкие фрагменты, и заливали их 1 л приготовленного щелочного раствора. Полученную смесь кипятили на водяной бане при комнатной температуре в течение 3 часов. Извлечение серицина из экстракта осуществляли двумя методами. Первый образец получали концентрированием отфильтрованного экстракта (500 мл) при низком давлении с использованием роторного испарителя. Второй образец извлекали методом ультрафильтрации (УФ) того же

объёма с использованием плоских мембран УАМ 175 с отсечками по молекулярной массе 15–20 кДа. В концентрированные растворы каждого из образцов добавляли этиловый спирт в соотношении 1:3 и оставляли на сутки для осаждения серицина. Конечная концентрация этанола в смеси составила в среднем  $60.0 \pm 1.7\%$ . Через сутки, осадок серицина отделяли центрифугированием, декантировали спиртом, высушивали при комнатной температуре и измельчали на шаровой мельнице. Полученный, таким образом, белок назван СНД. Концентрат второго образца, названный СУФ, получали так же, как и в первом случае. Спиртовые растворы упаривали досуха и получали спирторастворимые части белка серицина – образцы ССНД и ССУФ соответственно. Из фильтрата после УФ также получен белок, обозначенный как ФУФ.

**Согласно варианту Б** 50 г оболочек бракованных коконов, предварительно нарезанных на мелкие фрагменты, кипятили в 1 л дистиллированной воды в течение 3 часов на водяной бане при температуре  $90^{\circ}\text{C}$ . Полученный экстракт фильтровали через тканевый мешок и концентрировали с использованием роторного испарителя "*Unipon-35P*" (Польша). В концентрированный раствор добавляли этиловый спирт в соотношении 1:3, оставляя смесь на 24 часа для осаждения серицина. Осадок серицина через сутки фильтровали через плотную ткань, промывали спиртом, после чего раствор центрифугировали, высушивали при комнатной температуре и измельчали с использованием шаровой мельницы. Спиртовой раствор упаривали досуха и получали спирторастворимую часть белка серицина.

**Вариант С: Экстракция серицина в автоклаве.** В варианте С, экстракцию серицина водным и солевым растворами в автоклаве проводили следующим образом: 50 г измельчённых отходов коконов помещали в мешочек, который затем размещали в автоклав. В автоклав заливали 1 л 0.5%-ного раствора карбоната натрия и проводили экстракцию в течение 10 минут при температуре  $120^{\circ}\text{C}$  и давлении 1.5 атм. После завершения экстракции раствор концентрировали с использованием роторного испарителя. В полученный

концентрат добавляли этиловый спирт в соотношении 1:3, оставляя смесь на 24 часа для осаждения серицина. Через сутки осадок серицина фильтровали через плотную ткань, промывали спиртом, высушивали при комнатной температуре и измельчали с помощью шаровой мельницы. Спиртовой раствор упаривали досуха и получали спирторастворимую часть белка серицина. Аналогично проводили экстракцию серицина в автоклаве и с дистиллированной водой.

**Вариант Д: Предварительная обработка ультразвуком.** Экстракцию серицина по варианту Д проводили водной экстракцией как в варианте Б, но с предварительной обработкой раствора с коконами ультразвуком (УЗ) на аппарате СРХ130РВ (*Cole Parmer*, США) при частоте 40 Гц. 5 г измельчённых оболочек коконов, предварительно очищенных от жира-восковых веществ, помещали в стакан, содержащий 100 мл 0.5%-ного раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , и оставляли на 20 минут для замачивания. Затем стакан помещали в ультразвуковой аппарат на 10 минут при частоте 40 кГц.

Таким образом, был рассчитан выход растворимых веществ при дегуммировании бракованных коконов.

В таблице 3.1 для сравнительного анализа выхода серицина из оболочек коконов при различных условиях экстракции, приведены выход серицина в граммах и процентах, а также условия их получения: температура, давление в автоклаве и время экстракции.

**Таблица 3.1. - Выход серицина из оболочек коконов при различных условиях экстракции [14-А, 30-А].**

Экстрагент Ы, рН	Условия экстрагирования				Выход серицина			
	Реактор	Т, °С	Р, атм.	время, мин.	Спирто- осаждаемая часть		Спирто- растворимая часть	
					г	%	г	%
Солевой 11.27	Водяная баня	90	1.0	180	6.08	12.16	3.25	6.49
Вод ный	Водяная баня	90	1.0	180	1.21	2.41	0.86	1.72

Продолжение таблицы 3.1.

Солевой 11.19	Автоклав	120	1.5	7	2.05	4.03	13.69	27.3
Вод ный	Автоклав	120	1.5	7	<b>11.60</b>	<b>23.20</b>	<b>3.11</b>	<b>6.22</b>
Солевой 11.22	Автоклав	120	1.5	10	1.44	2.88	14.80	29.61
Вод ный	Автоклав	120	1.5	10	8.09	16.04	1.04	2.09
Солевой 11.18	УЗ (40Гц)	25	1.0	10				
	Водяная баня	90	1.0	60	0.69	13.90	0.82	16.30
Водный	УЗ (40Гц)	25	1.0	10	0.02	0.41	0.11	2.13
	Водяная баня	90	1.0	60	0.08	1.56	0.08	1.72

Выход спиртоосаждаемой фракции серицина также было высоким при гидролиз-экстракции коконов в растворе щелочи при значении рН раствора 11.2, температуре 90°C и продолжительности 180 мин, по варианту А и составил 12.16%. Однако, при этих же условиях водная экстракция не позволила выделить белок, выход серицина составил всего 2.41%.

Анализ данных таблицы показывает, что, наибольший выход высокомолекулярного или агрегированного серицина (23.2%) достигается при экстракции коконов водой в автоклаве при 120°C, давлении 1.5 атм в течение 7 мин (вариант С). В то время увеличение время гидролиз-экстракции заметно снижает выход серицина до 16.04%.

Далее для интенсификации процесса гидролиз-экстракции серицина из коконов предварительно был применён метод УЗ. Данный подход, действие УЗ за 10 мин позволило снизить время гидролиз-экстракции серицина с трёх часов до двух и получить больше белка с выходом 13.9 %. Несмотря на достигнутые

успехи, водная экстракция серицина не принесла ожидаемых результатов. Выход серицина при экстракции водой оставался низким.

Необходимо отметить, что при анализе состава спирторастворимой части белка обнаружено, что небольшая фракция серицина растворяется в спирте: данная фракция составила от 1.72% для водной и 6.49% для щелочной экстракции; однако, в процессе автоклавирования коконов, выход вышеуказанной фракции увеличился почти в 5 раз и составил 29.61% при 10 мин. экстракции при высокой температуре и давлении.

Таким образом, из полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. При традиционном методе гидролиз-экстракции серицина из коконов его выход высок, однако этот процесс требует значительного времени и расхода щелочи;

2. Использование УЗ способствует некоторому увеличению выхода продукта и сокращению времени гидролиза на один час, что является инновационным подходом в процессе экстракции серицина щелочью;

3. Высокий выход качественного (высокомолекулярного серицина) можно достичь путем экстракции серицина в автоклаве при 7 мин. обработкой коконов водой, что является весьма успешным технологическим достижением в данной работе.

---

### **3.1.2. Анализ физико-химических и гидродинамических свойств раствора серицина во время экстракции**

---

Результаты анализа физико-химических параметров и относительной вязкости раствора серицина при экстракции коконных оболочек тутового шелкопряда *B.mori* в солевом (С) и водном (В) растворах при 180 мин. обработкой, при нормальных условиях, приведены в таблице Таблица 3.2.

**Таблица 3.2. - Значение рН, плотности и относительной вязкости солевого и водного экстрактов из бракованных коконов [33-А].**

t (время экстракции, мин.)	рН		ρ (плотность, г/мл)		η (относительная вязкость)	
	С	В	С	В	С	В
30	10.15	6.21	0.9656	0.9861	1.111	1.077
60	10.13	6.26	0.9598	0.9864	1.142	1.017
90	10.12	6.27	0.9725	0.9871	1.069	1.017
120	10.08	6.29	0.9645	0.9901	1.052	1.012
150	10.09	6.31	0.9652	0.9899	1.054	1.019
180	10.07	6.31	0.9691	0.9883	1.033	1.012

Данные таблицы Таблица 3.2 показывают, что рН солевого экстрагента постепенно, но незначительно ( $P > 0.05$ ) на 0.08 единиц уменьшается, в то время рН водного экстрагента увеличивается на 0.1 единицу. Это указывает на то, что экстрагированный белок, обладает амфотерным свойством. Плотность растворов с течением времени меняется незначительно ( $P > 0.01$ ). Однако вязкость растворов экстракта в обоих случаях уменьшается в конце процесса: в случае с солевым (щелочным) экстрагентом значение вязкости увеличивается от 1.111 до 1.142 и затем плавно снижается после 1 часа экстракции щелочным раствором и 1,5 часа экстракции в случае с водным раствором.

Для более детального и точного анализа оценивалось изменение относительной вязкости раствора серицина при солевой (С) и водной (В) экстракции и рассчитывалось по формуле [2.1]. Результаты измерения приведены в таблице 3.3.

**Таблица 3.3. - Результаты измерения относительной вязкости раствора серицина при солевой (С) и водной (В) экстракции [30-А, 33-А].**

Время экстракции, мин	С			В		
	t <sub>р-р</sub> , с	t <sub>р-тель</sub> , с	η <sub>от</sub>	t <sub>р-р</sub> , с	t <sub>р-тель</sub> , с	η <sub>от</sub>
0	4.23	4.23	1.000	4.17	4.17	1.000
15	4.52	4.23	1.069	4.19	4.17	1.005

Продолжение таблицы 3.3.

30	4.70	4.23	1.111	4.49	4.17	1.077
45	4.72	4.23	1.116	4.21	4.17	1.010
60	4.83	4.23	1.142	4.20	4.17	1.007
75	4.76	4.23	1.125	4.23	4.17	1.014
90	4.52	4.23	1.069	4.24	4.17	1.017
105	4.50	4.23	1.064	4.26	4.17	1.022
120	4.45	4.23	1.052	4.22	4.17	1.012
135	4.46	4.23	1.054	4.24	4.17	1.017
150	4.46	4.23	1.054	4.25	4.17	1.019
165	4.34	4.23	1.026	4.20	4.17	1.007
180	4.37	4.23	1.033	4.22	4.17	1.012

Используя данные таблицы строился график зависимости относительной вязкости ( $\eta_{от}$ ) от времени экстракции (рисунок 3.1).

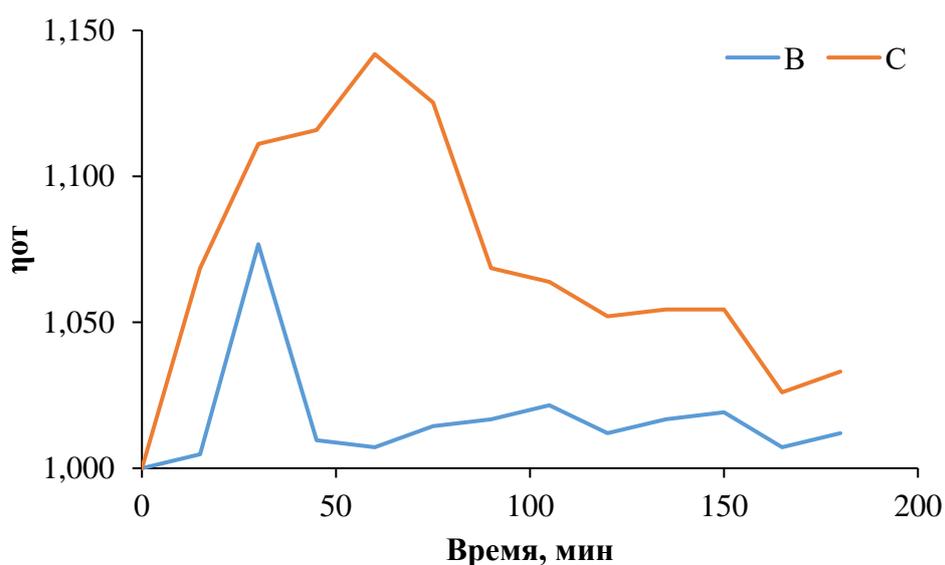


Рисунок 3.1. - Зависимость относительной вязкости ( $\eta_{от}$ ) от времени экстракции [33-А]

Как и следовало ожидать, в случае с солевой экстракцией значение вязкости увеличивается и достигает максимального значения (1.142) за 60 мин и затем плавно снижается. В случае с водной экстракцией относительная вязкость растворов меньше, а максимальное ее значение наблюдается при 30 мин. экстракции.

Эти данные показывают, что в начале экстракции в обоих случаях наблюдается экстракция высокомолекулярного белка и при действии высокой

температуры деградирует, несмотря на увеличение суммарного выхода всего белка в растворе.

### **3.2. Анализ фракционного состава серицина, выделенного различными методами**

Для структурного анализа образцы серицина были проанализированы с целью определения содержания белка и наличия функциональных групп с использованием метода ИК-Фурье спектроскопии. Дополнительно был проведён анализ молекулярной массы и молекулярно-массового распределения с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), что позволило получить подробную информацию о молекулярной структуре и распределении белковых макромолекул в образцах.

На первый взгляд, образцы представляли собой мягкие, шелковистые на ощупь однородной консистенции порошки и отличались цветом (таблица 3.4, рисунок 3.2): сконцентрированные вакуум-выпарным способом и выделенные из спиртового осадка СНД сероватого цвета; образец из спиртового раствора ССНД светло-коричневого цвета; образец, полученный после ультрафильтрации и выделенный из спиртового осадка СУФ сероватого цвета; образец из спиртового раствора ССУФ коричневого цвета, а серицин, полученный из УФ-фильтрата темно-коричневого цвета.

**Таблица 3.4. - Выход фракций серицина, полученного щелочной экстракцией и выделенный последовательно разными способами [3-А, 16-А].**

Фракции серицина	Выход	
	(г)	(%)
СНД	4.2569	12.16
ССНД	1.3822	3.95
СУФ	0.4054	1.16
ССУФ	1.8654	5.33
ФУФ	3.0637	8.75
Всего	10.9736	31.35



**Рисунок 3.2. - Образцы серицина, полученные разными способами [3-А, 16-А]**

Наибольшая фракция белка получена выпариванием раствора экстракта в виде осадка (12.16%) и растворимой в спирте (3.95%) фракцией. Во втором случае, при концентрировании раствора экстракта в УФ-ретентате осаждением спиртом выделено всего 1.16% белка, т.к. в процессе УФ основная часть белка (8.75%) прошла через мембрану, это привело к снижению концентрации белка в ретентате и к низкому выходу в спиртовом осадке. Другая часть белка восстановлена из спиртового раствора (5.33%). В результате экстракции серицина дистиллированной водой был получен порошок массой 1.8271 г, характеризующийся мягкой, шелковистой текстурой, однородной консистенцией и светло-коричневым оттенком. Выход серицина составил 3.65% от первоначальной массы оболочек или 12.16% от общего содержания серицина в волокнах шёлка-сырца.

---

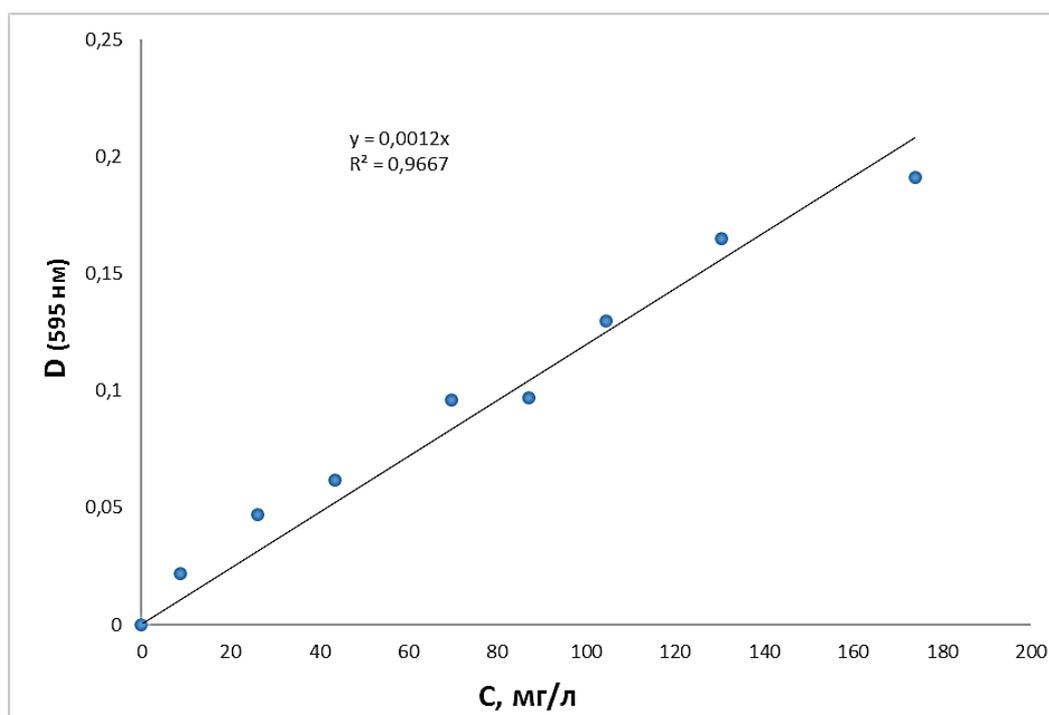
### **3.2.1. Определение общего количества белка**

---

Для определения общего количества белка использовали образцы серицина, полученные из коконов тутового шелкопряда различными методами и для сравнения был взят коммерческий образец фирмы «Sigma». Образцы пронумерованы в следующем порядке:

- сер. 1 - sericin *Bombix mori* (silkworm) производства Sigma;
- сер. 2 – серицин, экстрагированный 0.5%-ным раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и полученный из раствора экстракта концентрированием на роторном испарителе (СНД);
- сер. 3-серицин, экстрагированный 0.5%-ным раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и полученный из раствора экстракта ультрафильтрацией с применением плоских мембран УАМ 175 (СУФ);
- сер. 4 – серицин, экстрагированный водой (СрВ);
- сер. 5 - серицин, экстрагированный водой в автоклаве (СрВА);
- сер.6 - серицин, экстрагированный 0.5 %-ным раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в автоклаве (СрША).

Общее содержание белка в растворах образцов с концентрациями 50 и 100 мг/л определяли классическим методом Брэдфорда [95]. Для анализа 0.1 мл раствора образца, содержащего 0.05 и 0.1 мг/мл исследуемого белка, помещали в пробирки, добавляли 5 мл реактива Брэдфорда, тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре на одинаковое время в диапазоне от 2 до 60 минут. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре «UV 1 Thermo Spectronic» (Англия) при длине волны 595 нм. Концентрацию белка в растворах серицина (в мг/л) определяли с помощью уравнения калибровочного графика (рисунок 3.3), построенного на основе бычьего сывороточного альбумина с известными концентрациями в диапазоне 0.01–0.1 мг/мл.



**Рисунок 3.3. - Калибровочный график стандартного образца бычьего сывороточного альбумина с известными концентрациями в пределах 0.01-0.1 мг/мл**

Данные по содержанию растворимого белка представлены в таблице 3.5.

**Таблица 3.5. - Содержание белка в исследуемых образцах серицина [2-А, 3-А].**

	D (595нм)	C <sub>1</sub> , мг/л	C <sub>2</sub> , мг/л	Содержание белка, %
сер. 1	0.012	40	10	25
	0.026	80	21.7	27.1
сер.2	0.021	45	17.5	38.9
	0.045	90	37.5	41.7
сер.3	0.013	43	10.8	25.2
	0.028	86	23.3	27.1
сер.4	0.007	18.5	5.8	31.5
	0.013	37	10.8	29.3
сер.5	0.007	25	5.8	23.3
	0.012	50	10.0	20.0
сер.6	0.01	37.5	8.3	22.2
	0.023	75	19.2	25.6

D (595 нм) - оптическая плотность при длине волны 595 нм, C<sub>1</sub>- концентрация приготовленных растворов образцов, C<sub>2</sub>- концентрация образцов, определенных из уравнения калибровочной кривой.

Из данных таблицы 3.5 видно, что содержание растворимого белка в серицине, экстрагированного щёлочью и водой, выделенного после концентрирования, наибольшее и составляет примерно 40.3% и 30.4% от

исходной массы, соответственно. Для остальных изученных образцов серицина содержание белка одинаковое и колеблется в пределах 21.65-26.05% и сходны с содержанием белка в коммерческом серицине (*Sigma*, США). Это подтверждает тот факт, что при концентрировании и сушке происходит денатурация белка или его агрегация, что приводит к слабому растворению.

---

### 3.2.2. Изучение структуры образцов серицина методом ИК-Фурье спектроскопией

---

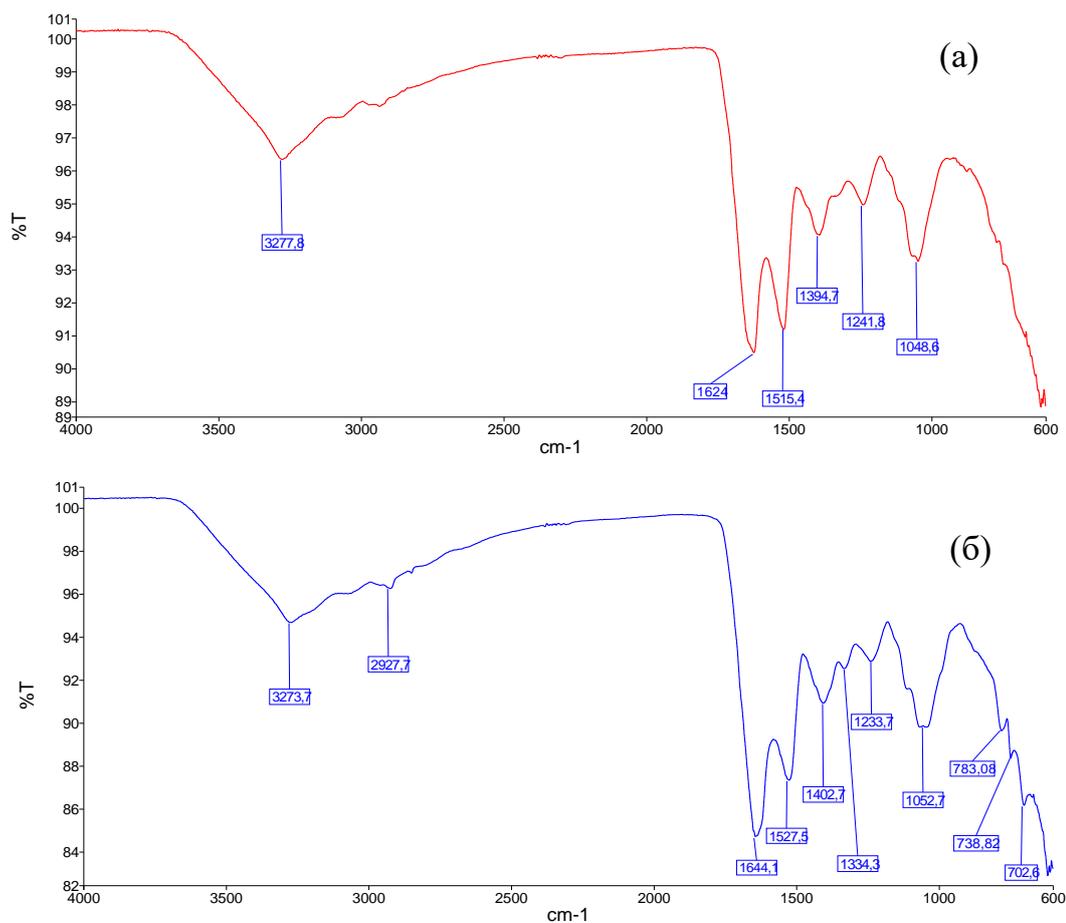
Вторичная структура серицина из коконов *B.mori* образована из складчатой структуры  $\beta$ -листа и области, состоящей из случайных клубков [118], которые были обнаружены с помощью спектрометрии кругового дихроизма. Она состояла из 36.7%  $\beta$ -листа, 52.7% случайных клубков и 10.6% нерегулярной вторичной структуры (повороты или « $\beta$ -изгибы»), наличие  $\alpha$ -спирали не обнаружено [119].

ИК-спектроскопия широко используется для анализа вторичной структуры белков, поскольку она позволяет получить информацию о специфичных колебаниях химических связей, характерных для различных структурных элементов. ИК-Фурье спектроскопия является эффективным и хорошо зарекомендовавшим себя методом для изучения вторичного структурного состава и динамики белков. В сочетании с математическими методами повышенного разрешения были разработаны различные подходы к анализу данных ИК-Фурье спектров, что позволяет повысить точность и чувствительность при исследовании структурных изменений белков. Многими авторами [11, 120–126] установлена корреляция между ИК-спектрами и вторичной структурой белков.

ИК-Фурье спектры образцов серицина были получены на основе 16–20 сканирований и проанализированы в диапазоне поглощений от 4000 до 600  $\text{см}^{-1}$  с использованием специализированного программного обеспечения. Повторные

измерения каждого спектра выявили изменение  $T$  около 2%. Вторичная структура серицина была охарактеризована методом ИК-Фурье спектроскопии с применением приставки нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО).

На рисунке 3.4 приведены ИК-Фурье спектры образцов серицина, экстрагированные водой (а) и солью карбоната натрия (б) в традиционных условиях гидролиз-экстракции, согласно варианту А и В.



**Рисунок 3.4. - ИК-Фурье спектры серицина, экстрагированный водой (а) и солью карбоната натрия (б) [6-А, 12-А]**

Поглощение первичных амидов, которое обусловлено валентными колебаниями связи C=O, информативны для определения вторичной структуры белков [120]. Валентные колебания C-N в сочетании с изгибом плоскости N-H смещаются в диапазоне от 1240 до 1250 см<sup>-1</sup>, что соответствует изменению структуры случайной спирали в структуре  $\beta$ -листа [120].

Типичные полосы поглощения в молекуле белка серицина, такие как амид I ( $1600-1700\text{ см}^{-1}$ ), амид II ( $1504-1582\text{ см}^{-1}$ ) и амид III ( $1200-1300\text{ см}^{-1}$ ), были обнаружены при  $1624.0\text{ см}^{-1}$  для водного экстракта и  $1644.1\text{ см}^{-1}$  для солевого экстракта. Полосы поглощения для амид II проявляются при  $1515.4$  и  $1527.5\text{ см}^{-1}$  для водного и солевого экстрактов, соответственно. Для амида III соответствующие пики наблюдаются при  $1241.8$  и  $1233.7\text{ см}^{-1}$ .

Область спектра амид I ( $1600-1700\text{ см}^{-1}$ ) является наиболее важной для анализа, так как она обладает высокой чувствительностью к изменениям вторичной структуры белка. Наличие пиков  $1624.0\text{ см}^{-1}$  и  $1644.1\text{ см}^{-1}$  указывает на преимущественное существование структуры  $\beta$ -листа для образца из водного экстракта и структуры случайных клубков для солевого экстракта. Это приводит к сильно гидрофильному характеру первичных амидов [120].

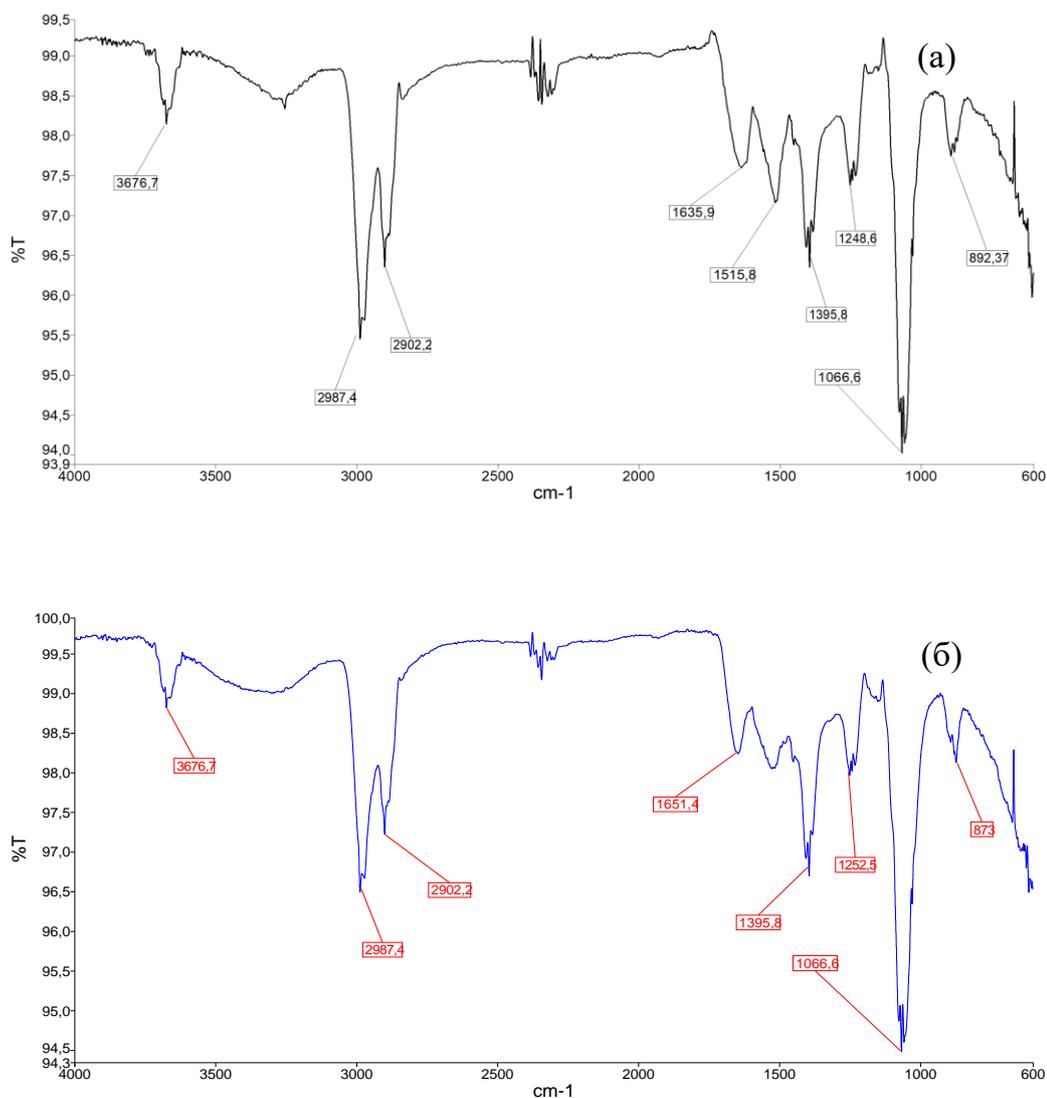
Полосы поглощения при  $1515$  и  $1520\text{ см}^{-1}$  представляют собой случайные клубки и  $\beta$ -листы, соответственно, вторичных амидов, тогда как полосы  $1241$  и  $1233\text{ см}^{-1}$  указывают на структуры случайных клубков и  $\beta$ -листы, соответственно, третичных амидов [11,120]. Первичные амиды состоят из 70–85% групп C=O и 10–20% групп C-N. Вторичные амиды более сложны, чем первичные амиды, и соответствуют полосам поглощения в диапазоне от  $1510$  до  $1580\text{ см}^{-1}$  [52]. Эти результаты указывают на случайную конформацию клубка белка серицина [122].

Области ИК-спектров Амид II и III также чувствительны к изменениям во вторичной структуре. Однако в случае амид III на эти области поглощения влияют множество побочных факторов, которые усложняют анализ вторичной структуры белка [120].

Другой характерный пик, в ИК-Фурье спектрах белков, находится в области  $3200-3400$  и относится к амиду A [122, 123]. Для серицина эти полосы соответствуют между  $3270$  и  $3309\text{ см}^{-1}$  из-за валентных колебаний гидроксильной группы ( $-\text{OH}$ ) аминокислоты серина [11, 120]. Кроме того, влияние валентных колебаний N-H наблюдается в пиках в диапазоне от  $3500$  до  $3000\text{ см}^{-1}$ , которые перекрываются пиками O-H групп в диапазоне от  $3600$  до  $3200$

см<sup>-1</sup> [125]. В нашем случае, для серицина, экстрагированного водой и солью изменение в данной области не заметное (3278 и 3274 см<sup>-1</sup>).

ИК-Фурье спектры серицина, полученного при высокой температуре и давлении, в автоклаве (вариант С) водой (рисунок 3.5а) и солью (рисунок 3.5б) имеют отличительные черты от спектров предыдущих экстрактов.



**Рисунок 3.5. - ИК-Фурье спектры серицина, экстрагированного водой (а) и солью (б) в автоклаве [6-А]**

По данным Лизуки [126], преобладающая вторичная структура серицина, выделенного из шёлка, представляет собой структуры случайных клубков в смеси с 5–10 % β-листов, где отсутствовали α-спирали. Согласно Ким и др. [127], при удалении воды из молекулы белка в процессе сушки, возникает высокая

склонность к агрегации цепей. Из-за этой агрегации нити белка сближаются, и формируется структура  $\beta$ -листа.

Присутствие сильных полос поглощения (рисунок 3.5а и 3.5б) свободных -ОН групп при  $3676.7\text{ см}^{-1}$ , и пики при  $2987.4$  и  $2902.2\text{ см}^{-1}$ , связаны с ОСН<sub>3</sub> и СН-алифатическими группами соответственно, указывают на реорганизацию макромолекулы белка при этих условиях [128]. Поглощение карбоксильных групп для амида I в образце серицина, экстрагированного водой наблюдается при  $1635.9\text{ см}^{-1}$  и серицина, экстрагированного солью наблюдается при  $1651.4\text{ см}^{-1}$ . Макромолекула серицина характеризуется конформационной неоднородностью полимерной цепи, которая может включать последовательные участки  $\alpha$ -спиральной и  $\beta$ -структурной организации, при этом их соотношение зависит от содержания воды.

Эти результаты указывают на разрушение водородных связей при высокой температуре автоклава. В условиях высокой подвижности макромолекул возможны обратимые конформационные переходы клубка в  $\beta$ -лист и  $\alpha$ -спиральную структуру. Формирование водородных связей могут приводить к обратному явлению, при этом на ИК-спектрах может наблюдаться понижение частот и расширение полос [121, 122].

Экстракция белка солевым раствором приводит к уменьшению доли конформации в  $\beta$ -листе (образованных за счёт водородных связей водорода карбоксильных групп), что соответствует проявлению пика при  $1651\text{ см}^{-1}$ , которое относят к  $\alpha$ -спирали и неупорядоченной структуре.

В ИК-спектрах серицина наблюдается характеристический пик амид I в области  $1620\text{--}1624\text{ см}^{-1}$ , соответствующий антипараллельным  $\beta$ -листам, который чётко отличается от пиков, характерных для параллельных  $\beta$ -листов и других элементов вторичной структуры. При агрегации белков часто происходит интенсивное образование дополнительных антипараллельных  $\beta$ -листов. Эти изменения в структуре серицина могут существенно влиять на его конечные свойства, что делает их важным объектом для дальнейших исследований.

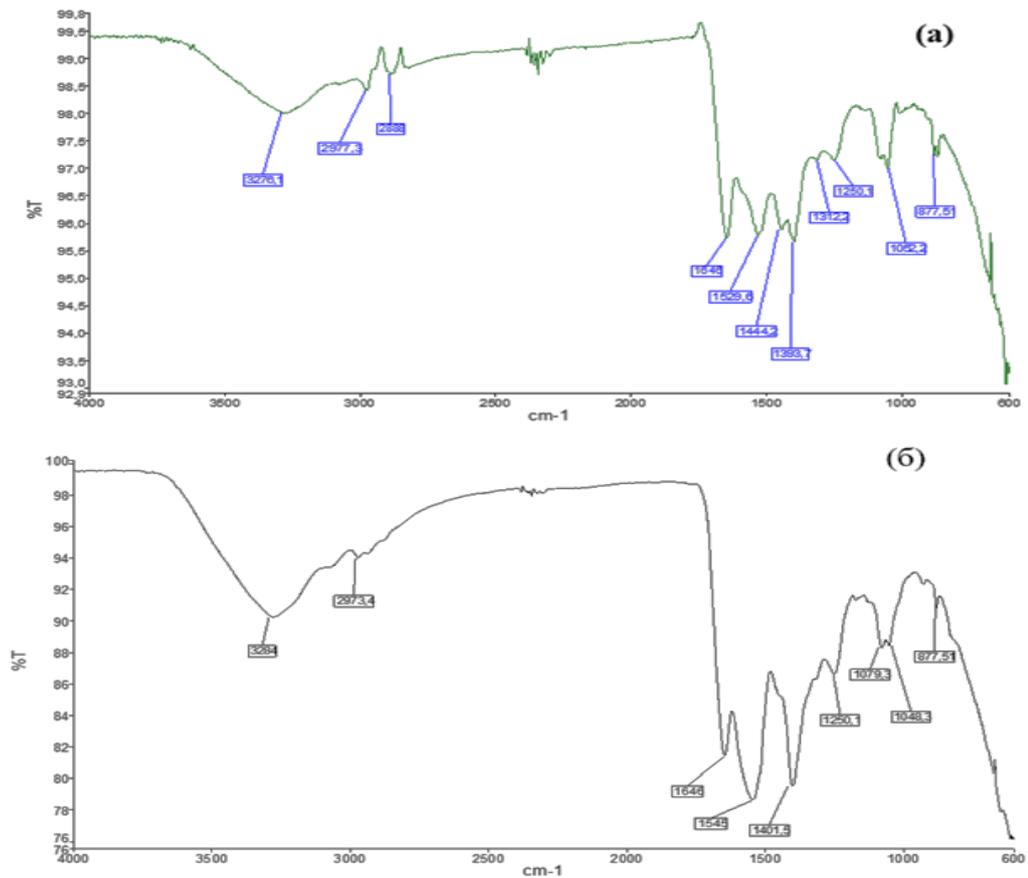
Боковые цепи аминокислот играют ключевую роль в молекулярных механизмах белков, и их поглощение в спектрах может предоставить ценную информацию. В частности, динамика участвующих групп может быть изучена в рамках одного эксперимента, что позволяет получить данные о состоянии протонирования, координации катионов и водородных связях.

В ИК-Фурье спектрах серицина, полученного в автоклаве обнаружена сильная полоса поглощения при  $1066\text{ см}^{-1}$ , которую относят к деформационным колебаниям  $\delta$  (C-O) триптофана, а также к валентным  $\nu(\text{NC})$  и  $\nu(\text{CC})$  и деформационным колебаниями  $\delta(\text{CH})$ ,  $\gamma(\text{CH}_2)$  связей данного аминокислотного остатка [121].

Кроме того, во всех спектрах серицина наблюдается ещё одна заметная полоса поглощения в области  $1395\text{-}1402\text{ см}^{-1}$ . В исследовании [129] Терамото пришёл к выводу, что сильные полосы поглощения около  $1400\text{ см}^{-1}$  обусловлены боковыми цепями остатков серина, которые составляют около 30% составляющих аминокислот серицина, и это можно считать признаком для идентификации серицина от других типов белков. Автор также пришел к выводу, что большинство звеньев молекулы серицина не ориентированы в серициновом волокне и что существует только несколько ориентированных сегментов [130,131].

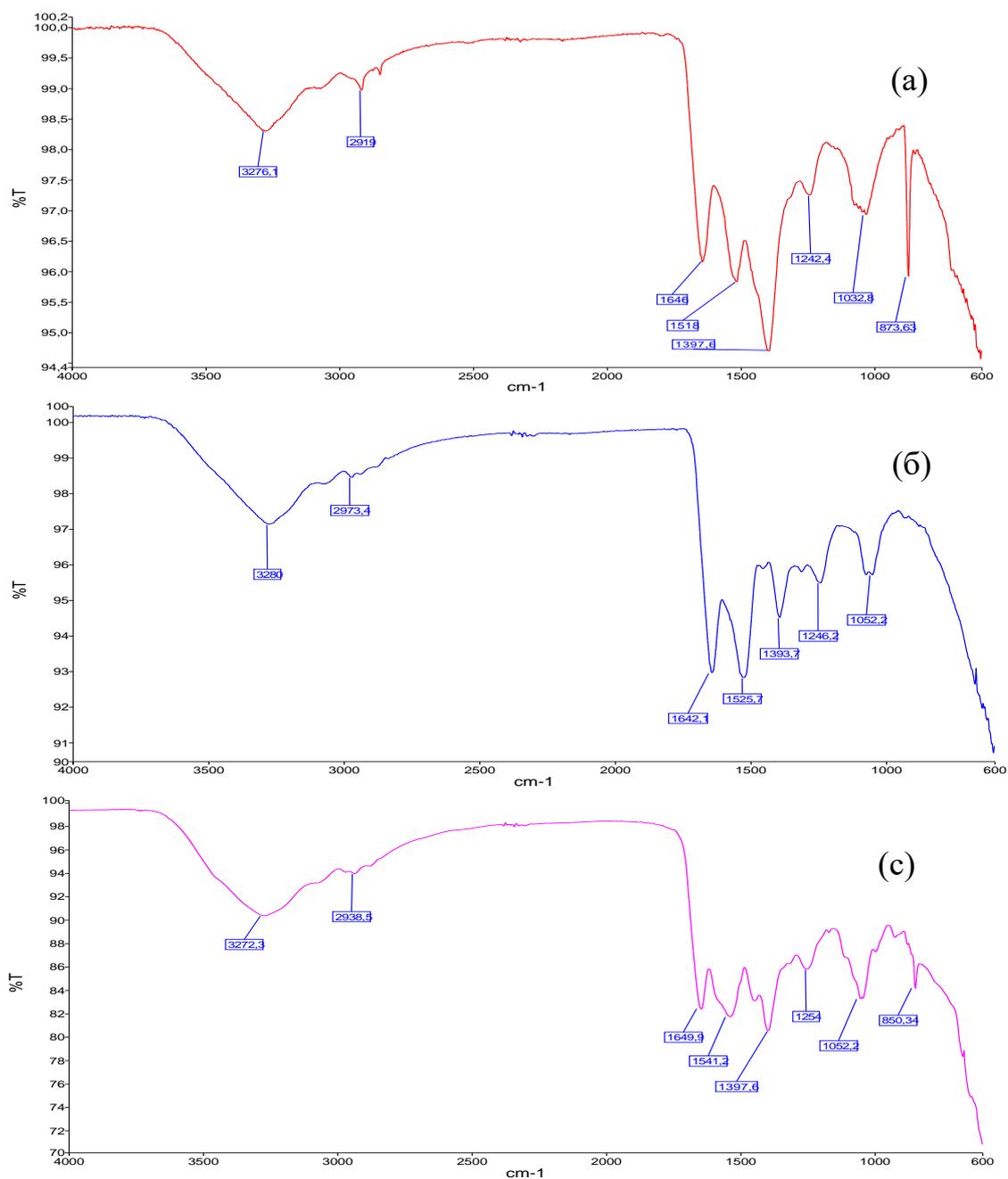
Эти отличия, которые проявляются в ИК-спектрах серицина, экстрагированного при высокой температуре, подтверждают гипотезу о реорганизации макромолекулы белка. Причина новых появлений сигналов при  $1066\text{ см}^{-1}$  и  $1395\text{ см}^{-1}$  для триптофана и серина соответственно, вероятнее всего связана с их выходом на наружную часть макромолекулы серицина при его последовательном переходе от структуры  $\beta$ -листов в клубок и в  $\alpha$ -спиральную структуру.

На рисунке 3.6 (а и б) представлены ИК-Фурье спектры серицина, выделенного из солевого экстракта, концентрированного при низком давлении (СНД) и выделенного осаждением в спирте (а) и спектры серицина (ССНД), выделенного из спиртового раствора (б).



**Рисунок 3.6. - ИК-Фурье спектры серицина, выделенного из солевого экстракта, концентрированного при низком давлении (СНД) и выделенного осаждением в спирте (а) и спектры серицина (ССНД), выделенного из спиртового раствора (б) [6-А]**

На рисунке 3.7 (а, б и с) приводятся ИК-Фурье спектры серицина, выделенного из солевого раствора экстракта, ультрафильтрацией (СУФ-а); серицина, выделенного из спиртового раствора (ССУФ-б) серицина, выделенного из раствора фильтрата, после ультрафильтрации (ФУФ-с).



**Рисунок 3.7. - (а) - ИК-Фурье спектры серицина, выделенного из солевого раствора экстракта, ультрафильтрацией (СУФ-а); (б)- спектры серицина, выделенного из спиртового раствора (ССУФ-б) и (с)- спектр серицина, выделенного из раствора фильтрата, после ультрафильтрации (ФУФ) [б-А]**

Химические аспекты белка серицина могут быть определены с помощью анализа ИК-Фурье спектров и позволяют дифференцировать их от других типов белковых материалов. В этом аспекте мы сравнивали различные способы выделения серицина из растворов гидролизата, на примере солевого экстракта, для оценки структурных изменений методом ИК-Фурье спектроскопии. Для

сравнения и анализа данных спектров, соответствующих полосам поглощения, относящиеся к основным структурным элементам серицина приводятся в таблице 3.6.

**Таблица 3.6. - Соответствующие полосы поглощения, относящиеся к основным структурным элементам серицина [6-А].**

Образцы серицина	Амид I (1600-1700 см <sup>-1</sup> )	Амид II (1500-1580 см <sup>-1</sup> )	Амид III (1200-1300 см <sup>-1</sup> )
СНД	1646*	1530	1250
ССНД	1646	1545	1250
СУФ	1645	1518	1242
ССУФ	1642	1525	1246
ФУФ	1650	1541	1254
*Следующие возможные структуры по сигналу амид I: 1608 - агрегированные нити; 1617-1633 - β-листы; 1638-1648 случайные клубки; 1653-1658 α-Спирали; 1668-1690 Повороты (β -изгиб)			

Данные таблицы 3.6 показывают, что все образцы серицина, полученные экстракцией солью, кроме УФ фильтрата (ФУФ) независимо от способа их выделения из раствора гидролизата мало отличаются по вторичным структурам и соответствующие полосы поглощения для амидов I-III почти схожи, что говорит об идентичности его структуры, которая относится к структуре случайных клубков. В образце ФУФ, который получен из фильтрата после УФ, макромолекулы серицина с низкой молекулярной массой скорее принимают упорядоченную структуру α-спирали.

Таким образом, проведенные исследования вторичной структуры, полученного серицина разными методами гидролиз-экстракции из коконов тутового шелкопряда методом ИК-Фурье спектроскопии показали, что в зависимости от метода экстракции макромолекула серицина может находиться в различных структурах от β-листа до α-спирали.

Наличие пиков 1624.0 см<sup>-1</sup> и 1644.1 см<sup>-1</sup>, относящиеся к валентным колебаниям С=О амида I указывают на преимущественное существование

структуры  $\beta$ -листа для образца из водного экстракта и структуры случайных клубков для солевого экстракта. Экстракция белка с использованием солевого раствора приводит к снижению доли  $\beta$ -листовой конформации, образованной за счёт водородных связей карбоксильных групп, что проявляется в виде пика при  $1651\text{ см}^{-1}$ , ассоциируемого с  $\alpha$ -спиральной и неупорядоченной структурами.

ИК-Фурье спектры серицина, полученного при высокой температуре и давлении, в автоклаве и при применении соли имеют отличительные черты от спектров предыдущих экстрактов: присутствие сильного поглощения свободных -ОН групп при  $3676.7\text{ см}^{-1}$ , появление пиков при  $2987.4\text{ см}^{-1}$  и  $2902.2\text{ см}^{-1}$  связаны с  $\text{OCH}_3$  и  $\text{CH}$ -алифатическими группами соответственно, указывают на реорганизацию макромолекулы белка в этих условиях. А также обнаружено появление сигналов при  $1066\text{ см}^{-1}$  и  $1395\text{ см}^{-1}$  для триптофана и серина соответственно, вероятнее всего связано с их выходом на наружную часть макромолекулы серицина при его последовательном переходе от структуры  $\beta$ -листов в клубок и в  $\alpha$ -спиральную структуру.

---

### **3.2.3. Молекулярная масса и молекулярно-массовое распределение серицина**

---

Молекулярная масса серицина варьируется от 20 до 310 кДа, при этом его структура и молекулярная масса зависят от выбранного метода экстракции и способа очистки из раствора [131–134]. Серицин, полученный из водорастворимого компонента шёлка тутового шелкопряда, состоит из полипептидов с молекулярной массой 60–130 кДа особенно богат аспарагиновой кислотой и серином с высоким содержанием гидроксильных, карбоксильных и аминогрупп. С другой стороны, фиброин шёлка (ФС), основной компонент шелкового волокна, состоит из полипептидов тяжелой и легкой цепи с молекулярной массой 25–350 кДа, а его аминокислотный состав – в основном, из глицина, аланина, серина и высокого содержания тирозина [132].

Абсолютная характеристика белков в растворе имеет важное значение и является необходимой для применения в различных отраслях промышленности. Например, в фармацевтике или биотехнологии продукты на белковой основе должны быть однородными и без присутствия агрегатов. Было обнаружено, что химическая агрегация молекул тестируемых соединений – одна из причин получения ложно положительных результатов при скрининге свойств многих новых лекарств [133] среди прочих.

Расшифровка молекулярной основы неправильной укладки и агрегации белка является важным шагом на пути к полному пониманию факторов, вызывающих возникновение нервных заболеваний, и приводит к разработке эффективных терапевтических стратегий [134]. В связи с этим, анализ агрегации белка в растворе предлагает отличный инструмент для изучения патологических процессов нарушения правильной конформации белка в контролируемых условиях.

Авторами определено, что серицин, экстрагированный различными методами, имеет разную молекулярную массу: например серицин, экстрагированный мочевиной показал четкие полосы с молекулярной массой в диапазоне от 10 до >225 кДа; кислотная и щелочная экстракции – полосы в диапазоне 50–150 кДа и 15–75 кДа; экстракция водным раствором тиоцианата лития – 3 основных полипептида с молекулярной массой 400, 250 и 150 кДа соответственно [9, 45, 47, 135].

В данной работе молекулярную массу ( $M_w$ ) и молекулярно-массовое распределение (ММР) образцов серицина определяли с использованием высокоэффективной эксклюзионной жидкостной хроматографии (ВЭЭЖХ). Анализ проводили с помощью системы высокого давления (Waters, США), оснащённой встроенным 2-канальным вакуумным дегазатором, дифференциальным вискозиметром модели ViscoStar (Wyatt Technology, США), дифференциальным рефрактометром RI 2410 (Waters, США) и двумя эксклюзионными колонками PL-Aquagel OH-60 и OH-40. Для автоматического

введения проб использовали систему 717 Plus Auto Injector (Waters, США), как подробно описано в главе 2.

Детальный анализ результатов ВЭЖХ, полученных с помощью программы *ASTRA*, приводится в таблице 3.7, где представлен выход агрегированных частиц (микрогель – MG, %), полученных центрифугированием исходного раствора белка (2 мг/мл), выход образца из хроматографической колонки (R, %), средневесовая молекулярная масса ( $M_w$ , кДа), значение полидисперсности для каждой фракции полимера ( $M_w/M_n$ ), характеристическая вязкость ( $[\eta]_w$ , мл/г) и гидродинамический радиус ( $R_h(w)$ ).

**Таблица 3.7. - Выход агрегированных частиц (микрогель –MG, %) и образца из хроматографической колонки (R, %), средневесовая молекулярная масса ( $M_w$ , кДа), значение полидисперсности ( $M_w/M_n$ ), характеристическая вязкость ( $[\eta]_w$ , мл/г) и гидродинамический радиус ( $R_h(w)$ , нм) образцов серицина [3-A]**

Образцы сеицина	MG, %	R, %	$M_w$ , кДа	$M_w/M_n$	$[\eta]_w$	$R_h(w)$ , нм
<b>СНД Пик-1</b>	39.22	0.10	202.72	1.12	117.65	15.12
<b>СНД Пик -2</b>		44.30	19.41	3.43	5.72	2.46
<b>СНД Пик -3</b>		15.60	1.74	1.94	0.84	0.35
<b>СУФ Пик -1</b>	25.34	3.53	296.80	1.38	69.12	14.74
<b>СУФ Пик -2</b>		40.90	19.81	6.15	15.01	3.42
<b>СУФ Пик -3</b>		4.90	0.12	1.92	2.91	0.28
<b>ССУФ</b>	29.56	72.00	53.10	2.16	7.90	3.30
<b>ФУФ</b>	31.84	63.50	32.90	5.66	3.20	1.90

Значения характеристической вязкости и гидродинамического радиуса для первого образца ССУФ изменялись в соответствии с приведенной  $M_w$ . Однако высокое значение индекса полидисперсности, низкие значения характеристической вязкости и гидродинамического радиуса для второго образца ФУФ говорят о его высокой степени агрегации, скорее возникшей при сушке раствора фильтрата.

Все полученные образцы имели высокий процент агрегированных, либо денатурированных фракций при нейтральном рН в растворе подвижной фазы

(0.05 M NaNO<sub>3</sub>), которые были получены с помощью центрифугирования раствора до введения их в колонку ЭЖХ и составили 39.22; 25.34; 29.56 и 31.84% для образцов СНД, СУФ, ССУФ и ФУФ соответственно. Среди данных образцов серицина фракции СНД, выделенные водно-спиртовым раствором, и растворимая фракция в этой смеси имели наибольшее количество агрегированных фракций.

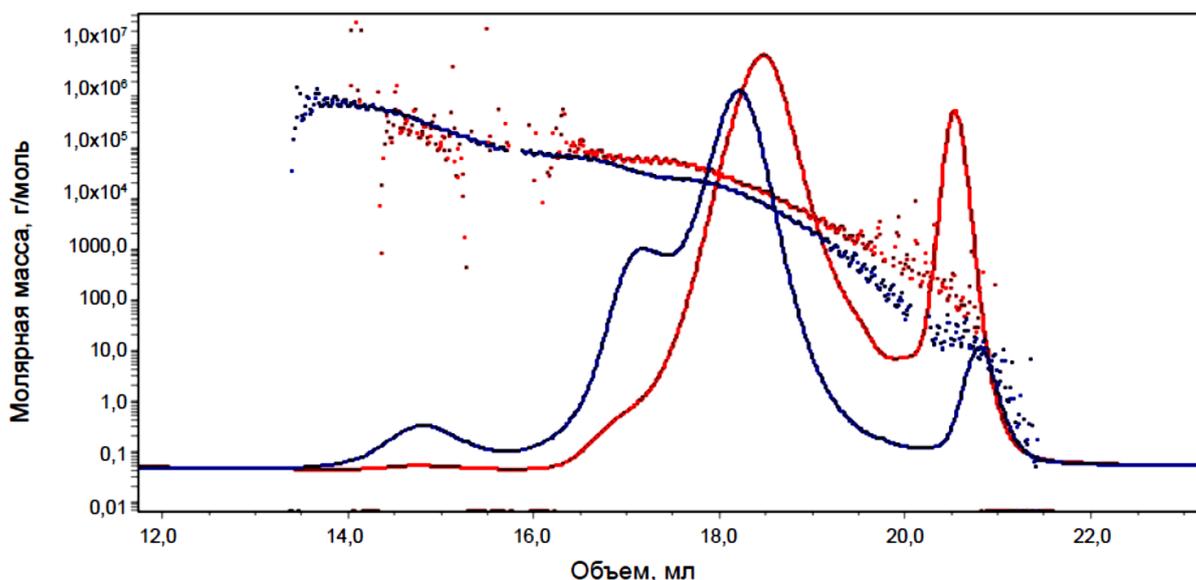
Как и следовало ожидать, из данных, приведенных в таблице 3.7, оба образца серицина выделяются спиртом в виде 3-х макромолекулярных популяций, которые элюируются при различных объемах (время удерживания на эксклюзивных сорбентах в колонке). Высокомолекулярные (пик 1) и низкомолекулярные фракции (пик 3) представляли небольшую долю макромолекулы белка, молекулярная масса которых соответственно была 202.72 и 1.74 кДа для образца СНД и 296.80 и 0.12 кДа для образца СУФ соответственно. Высокомолекулярные фракции также отличались высокими значениями характеристической вязкости и гидродинамического радиуса, в то время как низкомолекулярные фракции имели низкие значения этих параметров. Согласно известным данным [132], эти фракции можно отнести к полипептидам тяжелой и легкой цепи макромолекулы ФШ, которые сопутствуют серицину при экстракции.

Основная часть фракции полипептидов серицина, выделенная разными методами, приходится на фракцию, которая элюировалась вторым пиком для обоих образцов и составляла 44.30 и 40.90% от исходного количества растворенного белка серицина. Эти фракции почти не отличались по  $M_w$ , полидисперсности и гидродинамическим характеристикам.  $M_w$  для этих фракций была почти одинаковая (19.41 и 19.81 кДа), хотя оба образца полидисперсные в отличие от высоко- и низкомолекулярных фракций.

Растворимая в водно-спиртовом растворе фракция представляла собой полипептид с  $M_w = 53.10$  кДа и мономодальным ММР. Фракция серицина, прошедшая через мембранный фильтр с пропускающими по массе

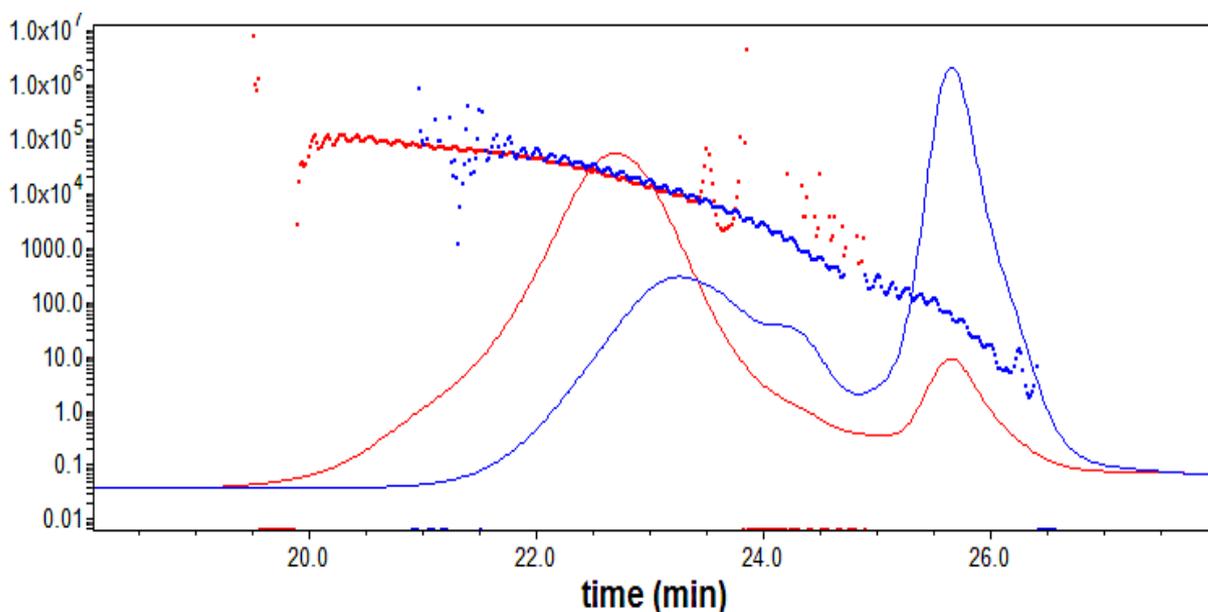
макромолекулами менее 20 кДа, отличалась от предыдущей фракции полидисперсностью и имела  $M_w = 32.90$  кДа.

На рисунке 3.8 представлены хроматограммы ВЭЭЖХ образцов серицина СНД и СУФ, а на рисунке 3.9 — хроматограммы образцов серицина ССУФ и ФУФ, построенные с использованием программы *ASTRA* в виде зависимости молекулярной массы от объема элюирования.



**Рисунок 3.8. - ВЭЭЖХ профиль элюирования образцов серицина СНД (красная линия) и СУФ (синяя линия) и кривые их молекулярно-массового распределения соответственно [3-А]**

Как видно из профиля хроматограммы ВЭЭЖХ, образец СНД (рисунок 3.8, красная линия) элюируется в виде двух пиков с широким молекулярно-массовым распределением (ММР). При этом первый крупный пик демонстрирует несимметричность и наличие небольшого плеча в начале, что свидетельствует о присутствии в образце небольшой третьей фракции. В то же время профиль элюирования образца СУФ показал более четкое разделение на четыре фракции полипептидов серицина с широкой полимодальной кривой распределения по ММР.



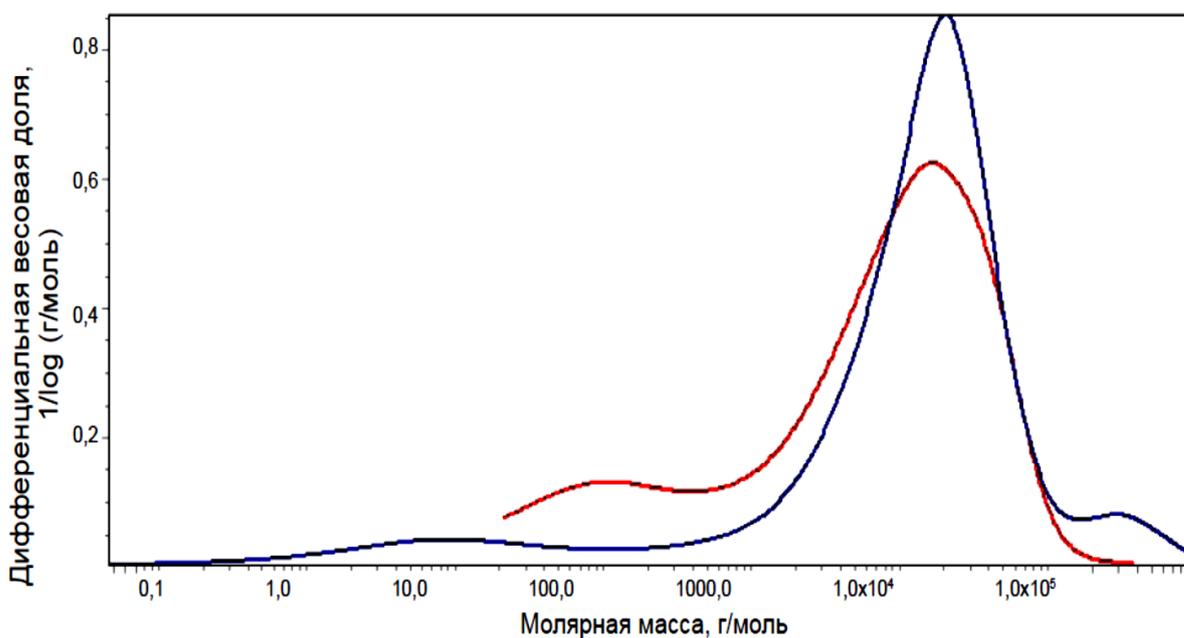
**Рисунок 3.9. - ВЭЭЖХ профиль элюирования образцов серицина ССУФ (красная линия) и ФУФ (синяя линия) и кривые их молекулярно-массового распределения соответственно [3-А]**

На ВЭЭЖХ хроматограммах образца ССУФ (рисунок 3.9, красная линия) наблюдаются два пика с широким молекулярно-массовым распределением (ММР). Первый крупный пик также является несимметричным и имеет небольшое плечо в начале, что указывает на наличие третьей фракции в небольшом количестве, аналогично профилю образца СНД. В отличие от СУФ, профиль элюирования образца ФУФ продемонстрировал три фракции полипептидов серицина, с более широким полимодальным распределением ММР в первом пике и мономодальным распределением ММР в третьем пике.

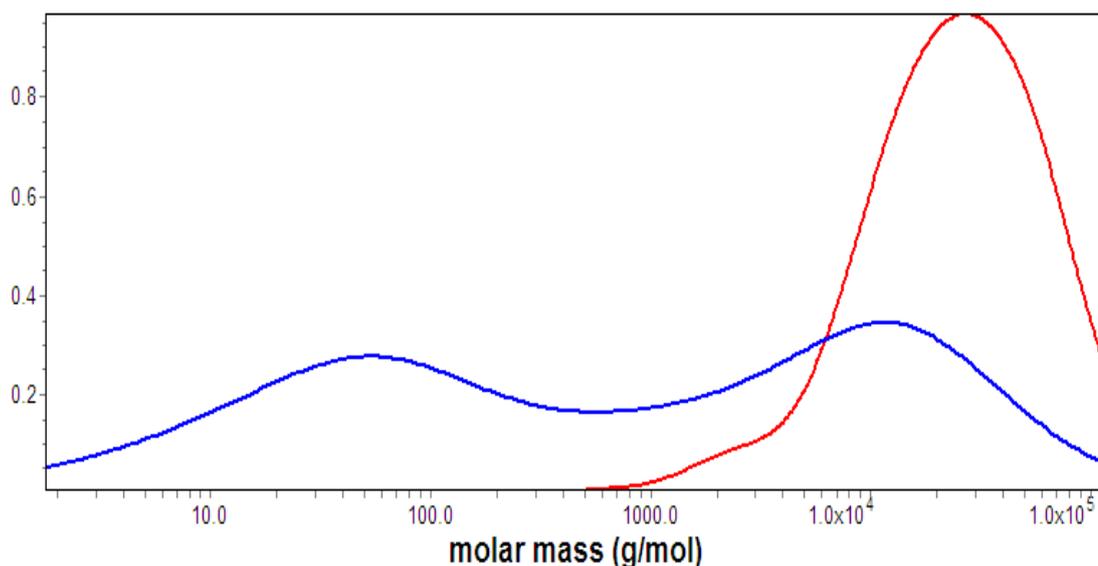
Представленная картина распределения белка по фракциям хорошо видна на кривых дифференциальной зависимости массовой фракции белка от их молекулярной массы (рисунок 3.10 и рисунок 3.11), полученной с помощью программы *ASTRA* для исследуемых образцов. Основная доля фракции полипептидов приходится на среднюю фракцию с молекулярной массой около 20 кДа. Хроматографический анализ молекулярной массы и молекулярно-массового распределения (ММР) серицина, проведённый с использованием ВЭЭЖХ, показывает значительные различия между образцом СУФ, полученным

методом ультрафильтрации при комнатной температуре, и образцом СНД, обработанным методом вакуум-выпаривания при температуре 50–60°C (рисунок 3.10). Образец СУФ характеризуется более широким диапазоном распределения макромолекул белка, с молекулярной массой от менее 1 до более 600 кДа, что свидетельствует о значительно более полидисперсном составе в сравнении с образцом СНД.

ВЭЖХ, хроматографический анализ молекулярной массы и ММР серицина, полученный спиртовым раствором после ультрафильтрацией ССУФ при комнатной температуре по сравнению с образцом из фильтрата ФУФ (рисунок 3.11), указывают на две популяции макромолекул белка по массе. Значения  $M_w$  варьируются от менее 0.1 до более 1 кДа для первой популяции и от 1 до 100 кДа для второй популяции полипептидов.

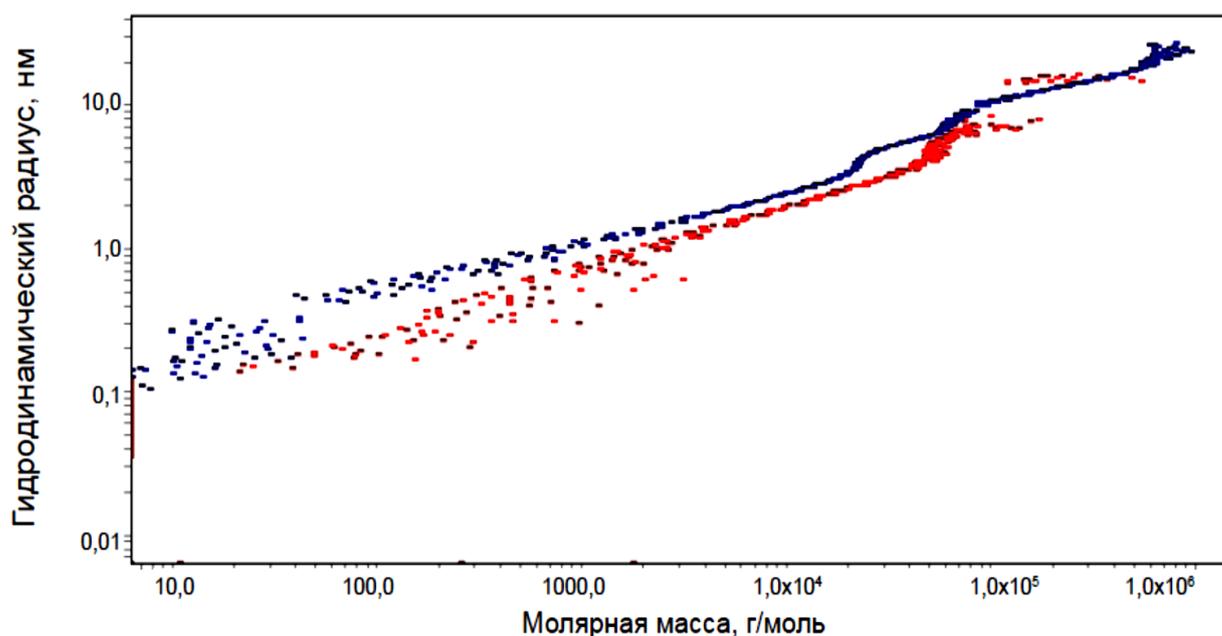


**Рисунок 3.10.** - Дифференциальные кривые распределения образцов серицина СНД (красная линия) и СУФ (синяя линия) по молекулярной массе [3-А]



**Рисунок 3.11. - Дифференциальные кривые распределения образцов серицина ССУФ (красная линия) и ФУФ (синяя линия) по молекулярной массе [3-А]**

Кроме того, в данной работе, нами, была оценена форма молекул серицина СНД и СУФ в растворе на основе их молекулярных масс и гидродинамических радиусов, полученных из характеристической вязкости с помощью программы *ASTRA*. Наклон кривой на графике (рисунок 3.12) позволяет оценить форму макромолекулы белка [136].



**Рисунок 3.12. - Зависимость гидродинамического радиуса ( $R_h(w)$ ) от молекулярной массы (конформационный график) [3-А]**

Для образцов СНД и СУФ наклон, равный 0.23 и 0.26 соответственно, указывает на свернутую конформацию белка в сферической форме, что ещё раз подтверждает агрегацию данного белка в растворе при исследуемых концентрациях (1–2 мг/мл).

Таким образом, результаты подтверждают и расширяют представления о влиянии различных факторов на ассоциацию белковых макромолекул в растворе. Полученные данные свидетельствуют, что не только параметры процесса экстракции серицина из шёлка определяют его молекулярную массу и агрегативное поведение, но и условия выделения из раствора, такие как температура, давление и степень концентрирования на ультрафильтрационной мембране. Анализ показывает, что полипептиды серицина находятся в изолированной  $\beta$ -конформации при низких концентрациях, однако начинают агрегироваться при концентрациях, превышающих 1–2 мг/мл.

Производимые белковые продукты могут быть использованы в различных областях, включая материалы для тканевой инженерии, покрытия для модификации поверхности, среды для культивирования клеток, а также в качестве пищевых добавок. Низкомолекулярные продукты переработки шелковых отходов находят применение в продуктах здорового питания, косметике и медицинских биоматериалах.

---

#### **3.2.4. Анализ поведения макромолекулы серицина в концентрированном растворе**

---

Сообщается, что серицин, характеризуется множеством полезных свойств и находит широкое применение начиная от функциональных пищевых продуктов до использования в косметической и медицинской областях [117, 135, 137]. Кроме того, биохимические и биофизические характеристики серицина различаются в зависимости от процесса, используемого для экстракции, а также его концентрации в растворе. Следовательно, различные факторы, такие как рН,

температура, время обработки и химические реагенты, оказывают большое влияние на поведение серицина в концентрированном рабочем растворе [138].

Поэтому эти знания имеют решающее значение при использовании серицина в различных отраслях, учитывая его потенциальное экологическое, социальное и экономическое преимущества как материала с добавленной стоимостью [139].

Для анализа ММР макромолекул серицина в концентрированном растворе применяли метод турбидиметрического титрования. Для исследования использовали три образца серицина:

1. серицин, экстрагированный 0.5%-ным раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (СШ);
2. серицин, экстрагированный дистиллированной водой (СВ);
3. экспериментальный серицин производства *Sigma*.

Предварительно, растворитель – дистиллированная вода и осадитель – этанол, очищали пропусканием через тонкопористую мембрану (0.2 мкм, *PVDF*, *Millipore Corp.*, США).

В первом эксперименте в 0.25 гр серицина (образцы 1, 2, 3) добавляли по 50 мл воды и перемешивали до полного растворения. Во 2-м эксперименте в 0.5 гр серицина (образцы 1, 2) добавляли по 50 мл воды и также перемешивали до полного растворения. Затем растворы центрифугировали при 5000 об/мин. После удаления механических примесей и осадка концентрации растворов составили 0.47% для серицина 1, 0.45% для серицина 2 и 0.50% для серицина 3 первого эксперимента; 0.98% для серицина 1 и 0.94% для серицина 2 второго эксперимента.

Турбидиметрическое титрование проводили на лабораторном турбидиметре *2100 AN IS (HACH, USA)* при температуре  $20 \pm 0.3^\circ\text{C}$ . Вначале проводили предварительное грубое титрование: 30 мл раствора серицина с концентрацией 0.47% помещали на магнитную мешалку *Variomag (Thermo Scientific, США)* и при перемешивании титровали раствором 96% спирта до появления еле заметного помутнения. Замеряли объём осадителя, израсходованного на грубое титрование.

Далее проводили точное титрование. Для этого в стаканчик наливали исходный раствор серицина, соответствующий приблизительно объёму измерительной ячейки, ставили на магнитную мешалку и при непрерывном перемешивании добавляли определенное количество осадителя – 96%-й этанол. После каждой порции осадителя переливали содержимое стаканчика в стандартный герметичный сосуд, который помещали в измерительную ячейку турбидиметра и определяли мутность в нефелометрических единицах (NTU). Отсчёты производили при добавлении осадителя до тех пор, пока мутность раствора не перестала изменяться. Обработка полученных данных проводилась по методике, описанной в работе [105].

В качестве примера в таблице 3.8 приведены данные турбидиметрического титрования раствора серицина 2 (первый эксперимент) и расчет параметров для построения интегральных и дифференциальных кривых молекулярно-массового распределения образцов серицина.

**Таблица 3.8. - Результаты турбидиметрического титрования раствора серицина 2, C=0.45% [7-A].**

V, мл	$\gamma=V/V_0+V$	$\Delta\gamma$	$1-\gamma$	T.NTU	$T_1=T-T_0$	$T_2=T_1/1-\gamma$	$\Delta T_2$	$\Delta T_2/\Delta\gamma$
0.5	0.016		0.984	35.5	0.1	0.10		
1	0.032	0.016	0.968	36.5	1.1	1.14	1.04	65.24
2	0.063	0.030	0.938	36.8	1.4	1.49	0.36	11.79
3	0.091	0.028	0.909	37.4	2.0	2.20	0.71	24.87
4	0.118	0.027	0.882	38.2	2.8	3.17	0.97	36.40
5	0.143	0.025	0.857	39.5	4.1	4.78	1.61	63.86
6	0.167	0.024	0.833	40.4	5.0	6.00	1.22	51.10
7	0.189	0.023	0.811	40.8	5.4	6.66	0.66	29.30
8	0.211	0.021	0.789	41.4	6.0	7.60	0.94	44.05
9	0.231	0.020	0.769	41.6	6.2	8.06	0.46	22.72
10	0.250	0.019	0.750	41.7	6.3	8.40	0.34	17.68
12	0.286	0.036	0.714	41.9	6.5	9.10	0.70	19.60
14	0.318	0.032	0.682	42.1	6.7	9.83	0.73	22.38
15	0.333	0.015	0.667	45.5	10.1	15.15	5.32	351.34
15.5	0.341	0.007	0.659	48.6	13.2	20.02	4.87	664.75

*Продолжение таблицы 3.8.*

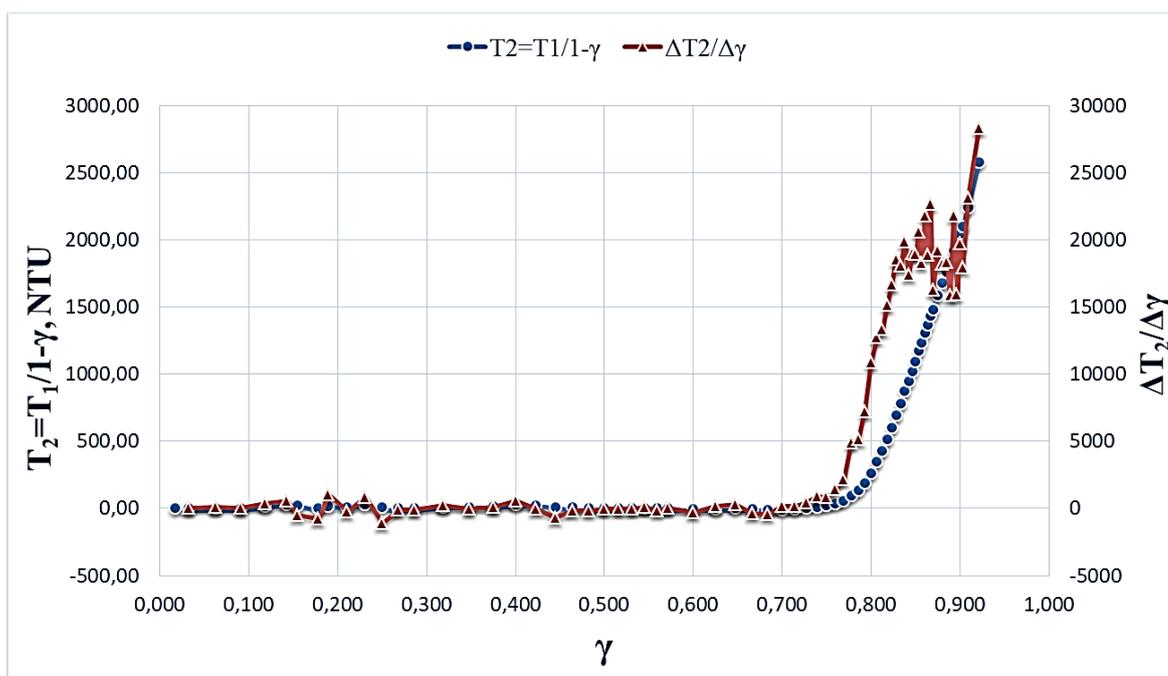
16	0.348	0.007	0.652	52.2	16.8	25.76	5.74	800.92
16.5	0.355	0.007	0.645	56.0	20.6	31.93	6.17	879.84
17	0.362	0.007	0.638	60.3	24.9	39.01	7.08	1031.56
17.5	0.368	0.007	0.632	65.4	30.0	47.50	8.49	1263.60
18	0.375	0.007	0.625	73.6	38.2	61.12	13.62	2070.24
18.5	0.381	0.006	0.619	84.2	48.8	78.89	17.77	2758.42
19	0.388	0.006	0.612	104.1	68.7	112.21	33.32	5278.47
19.5	0.394	0.006	0.606	128	92.6	152.79	40.58	6561.79
20	0.400	0.006	0.600	143	107.6	179.33	26.54	4379.65
20.5	0.406	0.006	0.594	155	119.6	201.33	21.99	3702.21
21	0.412	0.006	0.588	168	132.6	225.42	24.09	4136.83
21.5	0.417	0.006	0.583	177	141.6	243.08	17.66	3092.27
22	0.423	0.006	0.577	188	152.6	264.51	21.43	3825.37
22.5	0.429	0.005	0.571	196	160.6	281.05	16.54	3010.89
23	0.434	0.005	0.566	206	170.6	301.39	20.34	3773.69
23.5	0.439	0.005	0.561	212	176.6	314.94	13.54	2560.14
24	0.444	0.005	0.556	219	183.6	330.48	15.54	2993.65
24.5	0.450	0.005	0.550	222	186.6	338.99	8.51	1669.66
25	0.455	0.010	0.545	228	192.6	353.10	14.11	1396.89
26	0.464	0.010	0.536	236	200.6	374.45	21.35	2192.28
27	0.474	0.009	0.526	240	204.6	388.74	14.29	1520.10
28	0.483	0.009	0.517	248	212.6	411.03	22.29	2455.99
29	0.492	0.009	0.508	252	216.6	425.98	14.95	1705.68
30	0.500	0.008	0.500	256	220.6	441.20	15.22	1795.96
31	0.508	0.008	0.492	260	224.6	456.69	15.49	1889.37
32	0.516	0.008	0.484	263	227.6	470.37	13.69	1725.43
33	0.524	0.008	0.476	265	229.6	482.16	11.79	1534.62
34	0.531	0.007	0.469	267	231.6	494.08	11.92	1602.05
35	0.538	0.007	0.462	269	233.6	506.13	12.05	1671.40
36	0.545	0.007	0.455	270	234.6	516.12	9.99	1428.09
37	0.552	0.007	0.448	272	236.6	528.41	12.29	1811.05
38	0.559	0.007	0.441	274	238.6	540.83	12.42	1886.18
39	0.565	0.006	0.435	274	238.6	548.78	7.95	1243.90
40	0.571	0.006	0.429	277	241.6	563.73	14.95	2407.49
45	0.600	0.029	0.400	280	244.6	611.50	47.77	1671.83
50	0.625	0.025	0.375	278	242.6	646.93	35.43	1417.33

Продолжение таблицы 3.8.

55	0.647	0.022	0.353	279	243.6	690.20	43.27	1961.42
60	0.667	0.020	0.333	280	244.6	733.80	43.60	2223.60
70	0.700	0.033	0.300	280	244.6	815.33	81.53	2446.00

где  $V$  – объём добавленного осадителя;  $T$  – мутность раствора полимера;  $T_0$  – мутность прозрачного раствора полимера, равная 35,4 NTU;  $V_0$  – начальный объём раствора полимера, равный 30 мл;  $\gamma$  – объёмная доля осадителя;  $T_1$  – мутность, обусловленная выделенным полимером;  $T_2$  – мутность с поправкой на разбавление раствора.

На рисунке 3.13 приводятся интегральная ( $T_2$ ) и дифференциальная ( $\Delta T_2/\Delta\gamma$ ) кривые турбидиметрического титрования раствора серицина *I* с концентрацией 0.47%.



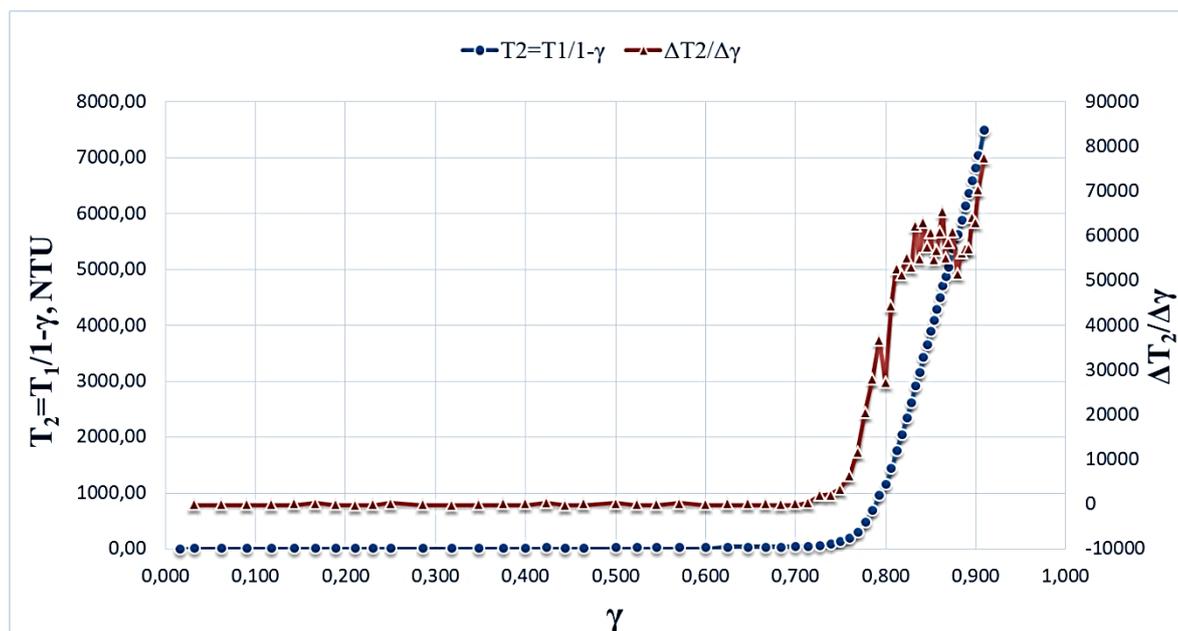
**Рисунок 3.13. - Интегральная ( $T_2$ ) и дифференциальная ( $\Delta T_2/\Delta\gamma$ ) кривые турбидиметрического титрования раствора серицина *I* (концентрация серицина 0.47%) [7-А]**

Как видно из рисунка 3.13, кривая зависимости мутности раствора серицина от объёмной доли осадителя (интегральная кривая турбидиметрического титрования) имеет резкий изгиб в области объёмной доли

( $\gamma$ ) осадителя в пределах 0.75-0.9, указывает на узкое распределение ММР макромолекул серицина 1 и фракции белка с низкой молекулярной массой.

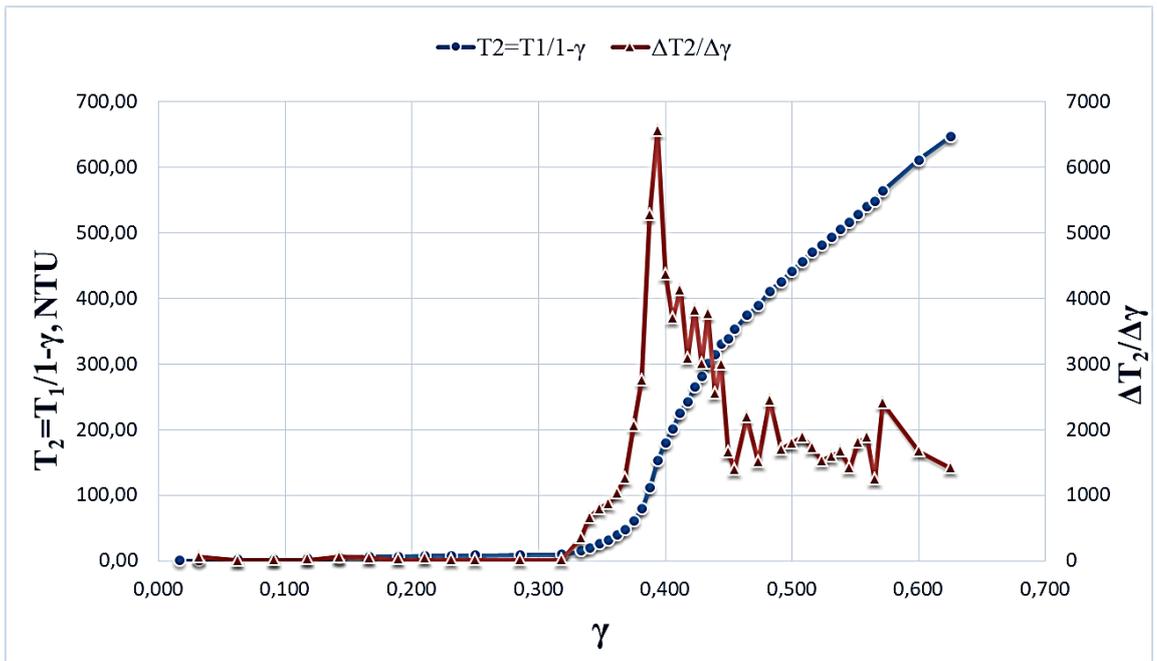
По дифференциальной кривой турбидиметрического титрования можно выявить, что у серицина 1 существуют 3 макромолекулярных фракций, которые имеют узкое молекулярно-массовое распределение.

С увеличением концентрации белка профиль распределения макромолекул (рисунок 3.15) несколько изменился с появлением небольшого пика при  $\gamma$  равной 0.78, указывающий на содержание белка с более высокой молекулярной массой.



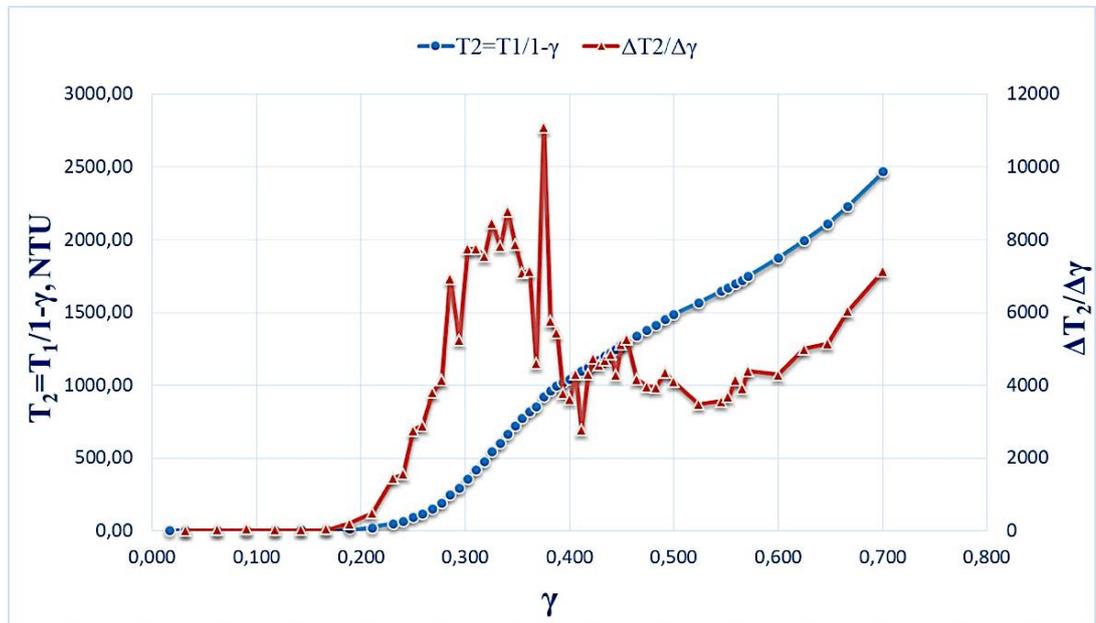
**Рисунок 3.14. - Интегральная ( $T_2$ ) и дифференциальная ( $\Delta T_2 / \Delta \gamma$ ) кривые турбидиметрического титрования раствора серицина 1 (концентрация серицина 0.98%) [7-A]**

На рисунке 3.15 представлены интегральная и дифференциальная кривые турбидиметрического титрования раствора серицина 2 с концентрацией 0.45%. Как видно с увеличением доли осадителя  $\gamma$  интегральные кривые имеют пологий вид, что указывает на широкое распределение ММР макромолекулы серицина 2. На дифференциальных кривых ММР данного образца проявляется большой пик в области  $\gamma$  0.35-0.41, три пика в области  $\gamma$  0.42-0.45, два пика в области  $\gamma$  0.45-0.49 и один пик при  $\gamma$  равной 0.57.



**Рисунок 3.15. Интегральная ( $T_2$ ) и дифференциальная ( $\Delta T_2/\Delta \gamma$ ) кривые турбидиметрического титрования раствора серицина 2 (концентрация серицина 0.45%) [7-А]**

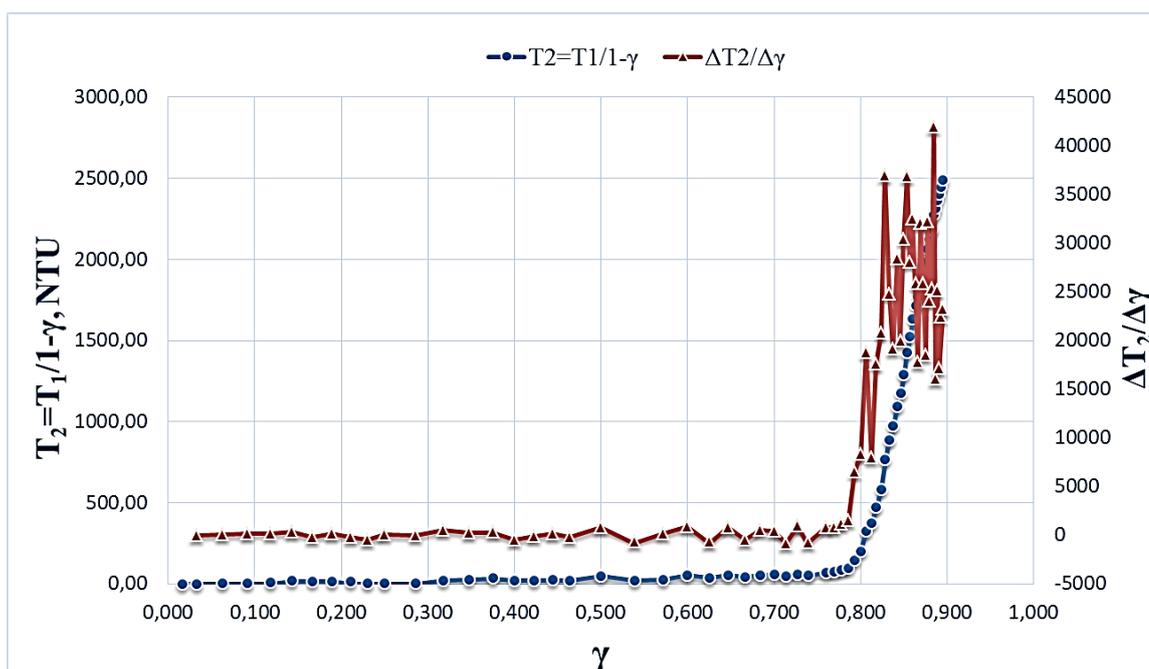
На рисунке 3.15 приводится интегральная и дифференциальная кривые турбидиметрического титрования раствора серицина 2 с концентрацией 0.98%.



**Рисунок 3.16. - Интегральная ( $T_2$ ) и дифференциальная ( $\Delta T_2/\Delta \gamma$ ) кривые турбидиметрического титрования раствора серицина 2 (концентрация серицина 0.94%) [7-А]**

С возрастанием концентрации серицина 2 в растворе (рисунок 3.16) высокомолекулярные фракции начинают осаждаться ещё раньше, как в случае с серицином 1. В данном случае происходит выделение более четырёх фракций с высокой молекулярной массой в области  $\gamma$  0.27-0.35, один узкий пик в области  $\gamma$  0.37, три небольших пика в области  $\gamma$  0.42-0.49 и дальнейший рост мутности до  $\gamma$  0.7.

В случае с коммерческим серицином 3 при концентрации белка равной 0.5% (рисунок 3.17) наблюдается схожая картина с образцом серицина 1. На турбидиметрических кривых осаждения данного белка видны 6 узких пиков в области  $\gamma$  0.8-0.9. Резкая форма интегральных кривых титрования говорит об узком распределении данного образца. Возможно, данный белок получен щелочной экстракцией и с разделением высокомолекулярных фракций.



**Рисунок 3.17. - Интегральная ( $T_2$ ) и дифференциальная ( $\Delta T_2/\Delta \gamma$ ) кривые турбидиметрического титрования раствора серицина 3 (концентрация серицина 0.50%) [7-А]**

Таким образом, анализируя полученные данные и данные литературы можно заключить, что серицин 1, полученный щелочным раствором, в основном, состоит из низкомолекулярных фракций с молекулярной массой менее 20 кДа и

имеет узкое распределение по молекулярной массе. В то время серицин, полученный горячей экстракцией водой отличается широким распределением по молекулярной массе, в которых могут содержаться макромолекулы от 20 до 200 кДа. Как и в нашем случае, средняя фракция серицина с  $M_w$  60-100 кДа, полученная водой была доминирующей фракцией белка в изученных образцах. Коммерческий образец 3 от компании *Sigma* также содержал белок с низкой молекулярной массой и узким ММР.

Обращает внимание на себя тот факт, что в концентрированном растворе доля высокомолекулярной фракции несколько возрастает, что подтверждает гипотезу об агрегации макромолекулы серицина, как было показано, нами, ранее [1-А], что на молекулярную массу и агрегативное поведение белка влияют также и условия выделения его из раствора. Результаты данной работы подтверждают и дополняют сведения о влиянии различных факторов на ассоциацию белковых макромолекул в растворе и согласуются с данными других авторов [140].

## **ГЛАВА 4. ПРИМЕНЕНИЕ СЕРИЦИНА В КАЧЕСТВЕ КОМПОЗИЦИОННОГО МАТЕРИАЛА**

### **4.1. Система доставки лекарств на основе серицина**

Доставка лекарственных веществ (ЛВ) и БАС является важнейшим аспектом современной медицины, поскольку она может повысить эффективность и безопасность терапевтических агентов. Однако доставка лекарственных ингредиентов (ЛИ) и БАС сопряжена с рядом сложностей, включая преодоление биологических барьеров, обеспечение стабильности ЛВ и БАС, повышение специфичности их доставки к целевому участку и минимизацию токсичности. Для решения указанных задач исследователи разработали различные стратегии и технологии, включая использование наноматериалов, 3D-печати, подходы омики и флуоресцентной визуализации NIR-II [141–143].

Одной из наиболее многообещающих технологий для доставки ЛВ и БАС являются наноматериалы, которые могут быть точно спроектированы с учётом необходимых свойств, таких как размер, форма, химическая структура поверхности и функциональная активность. Наноматериалы могут применяться для доставки различных типов ЛВ и БАС в целевые клетки и ткани. Однако их использование сопряжено с рядом проблем, включая быстрое выведение иммунной системой, накопление в нецелевых органах и потенциальную токсичность. В связи с этим, крайне важно изучать фармакокинетику и биологические реакции наноматериалов, а также разрабатывать наноматериалы, которые способны избегать или модулировать иммунную систему [144].

В настоящее время, рынок усовершенствованных систем доставки лекарств (УСДЛ) регистрирует среднегодовой темп роста в 5.3% в течение прогнозируемого периода (2022-2027). Ожидается, что пандемия COVID-19 окажет значительное влияние на рынок [145–149]. В нескольких исследованиях подчеркивалось, как УСДЛ поможет разработать улучшенные системы доставки (лекарственные формы) существующих терапевтических средств. Например, в

июне 2020 года Технологический университет Чалмерса в Швеции, Гетеборгский университет и компании «AstraZeneca» объявили о новом опорном исследовании, объединяющем множество многообещающих концепций для изучения назальной спреинной мРНК-вакцины против COVID-19. В настоящее время команда работает над биомиметической наночастицей, которая содержит как усилитель иммунитета, так и целевой белок для исследования принципов проектирования назальной иммунизации. Офис инноваций Чалмерса, область передовой медицинской инженерии Чалмерса, Шведский фонд стратегических исследований и Шведский исследовательский совет вносят свой вклад в эту инициативу [149].

В апреле 2020 года компания «Bioavanta-Bosti» разработала 48-часовой производственный процесс с использованием своей нанотехнологии полисахарида хитозана *Novochizol* для инкапсуляции программного интерфейса или биологических препаратов для локализованной доставки и формул с замедленным высвобождением для внутрилегочной доставки лекарств, которые подходят для лечения пациентов с COVID-19. Компания «Bioavanta-Bosti» также объявила в 2020 году, о поиске партнеров среди разработчиков лекарственных препаратов и клинических исследователей для производства перепрофилированного лекарства или новых молекулярных или биологических формул для лечения тяжелой инфекции COVID-19 в легких. УСДЛ помогла изучить новые идеи для выявления свободных областей для будущего целевого распространения, и она быстро набирает обороты в фармацевтическом секторе и академических учреждениях. Факторы, движущие этим рынком, включают разработку новых лекарств и биопрепаратов, достижения в понимании биологии и болезней человека, а также рост инвестиций в научные исследования и разработку технологий [149].

Одним из ключевых аспектов эффективного преодоления сложных патологических состояний является доставка желаемых терапевтических соединений с точностью, как в пространстве, так и во времени. Поэтому фокус на ядерно-направленные системы доставки стал многообещающей стратегией с

высоким потенциалом, особенно в генной терапии и лечении онкологических заболеваний [143].

Наночастичные лекарственные формы играют ключевую роль при лёгочной доставке лекарств. Наночастицы в форме диспергированных капель как в жидком виде, так и в форме сухого порошка показывают превосходные результаты для доставки лекарств внутриклеточно [145].

Современные достижения науки в области доставки лекарств сосредоточены на полимерных носителях и их композитах, поскольку они проявляют существенные преимущества по сравнению с традиционными формами и обладают различными биологическими функциями.

Серицин может быть использован в качестве носителя для доставки лекарственных препаратов, особенно при его комбинировании с другими природными или синтетическими полимерами. Серицин комбинируют с такими материалами, как органические (синтетические полимеры, биополимеры, клетки, белки, ферменты, углеводы, лекарства и т.д.), неорганические (наночастицы металлов, лазерные красители, квантовые точки и т.д.) или природные биоминералы и биоминеральный гидроксипатит для получения нанокристаллов различного размера и морфологии. Эти носители могут быть использованы для адресной доставки лекарств, такие как пептиды, ДНК и РНК, к пораженному участку [1, 3, 4, 117, 137–142].

---

#### **4.1.1. Эмульсионное микро- и нано- капсулирование БАС с применением серицина для лечебных целей и хранения пищевых продуктов**

---

Новые природные биоматериалы продолжают пользоваться большим спросом из-за их биоразлагаемости, биосовместимости, готовности к использованию, возобновляемости и низкой токсичности. Полимерные микроносители обеспечивают пролонгированное или контролируемое высвобождение лекарств, что приводит к увеличению терапевтической концентрации в плазме, уменьшению побочных эффектов и улучшению

соблюдения пациентами режима лечения (рисунок 1, Глава 1.). Микрочастицы также обеспечивают альтернативные пути введения БАС и ароматизаторов, которые могут улучшить абсорбцию и биодоступность, а также защитить БАС от факторов окружающей среды [147].

Известно, что для инкапсуляции активных веществ существует множество подходов, среди которых эмульсионные системы обладают значительным потенциалом.

Этот метод улучшает биодоступность функциональных соединений, защищая их от условий окружающей среды при хранении. В последние годы широко исследуется разработка микро- и наночастиц эмульсионными методами [148].

Наночастицы на основе поли лактата (сополимеры молочной и гликолевой кислоты) были синтезированы с помощью модифицированной техники одинарной эмульсии (*вода/масло*), как описано в работе [148]. Нагруженные ремдесивиром наночастицы (*RDV NC*) показали устойчивое высвобождение препарата ремдесивира в физиологических условиях. *RDV NC* проявил высокую противовирусную активность против *SARS-CoV-2*, а нанокompозитная платформа имеет потенциал для разработки в качестве ингаляционной системы доставки лекарств для других вирусных инфекций в лёгких [148].

Полимерные носители могут использоваться в качестве транспортных средств для обеспечения эффективной транспортировки вакцин к целевым участкам. Полимерные наногели оказались наиболее плодотворными в этом отношении на сегодняшний день. Они могут действовать как «интегрированные адъюванты», сочетая иммуномодулирующие свойства с функциями целевой доставки антигена [150].

Адъювант — это термин, используемый в иммунологических исследованиях для определения любого вещества, которое может ускорить, продлить или усилить антигенспецифический иммунный ответ [151]. Биоразлагаемые, биосовместимые и мукоадгезивные свойства наногелей *IPN*

могут сделать их перспективными адъювантами для повышения эффективности субъединичных вакцин [151, 152].

Разработаны различные технологии подготовки микро- и наночастиц для съедобных упаковок ЛВ и БАС фармацевтического применения и функциональной пищи [4, 139, 153–157]. В этом плане метод двойной эмульсии вода/масло/вода [106] является одним из самых популярных. Другие методы включают разделение фаз, распылительную сушку, сшивание макромолекул или полимеризацию мономеров и т.д. [153]. В отличие от нерастворимого фиброина, водорастворимая природа серицина открывает возможности в качестве структурно и химически отличающегося возобновляемого белка для «зеленого синтеза» инженерных микро- и наноструктур [154].

Наночастицы на основе белка уже много лет широко используются в биомедицинских целях благодаря их превосходным свойствам, таким как биоразлагаемость, нетоксичность и антигенность, а также высокой стабильности *in vivo*, длительному сроку хранения и простоте производства по сравнению с другими системами доставки. Разнообразие и обилие боковых цепей в химической структуре серицина позволяют модифицировать его в соответствии с целью исследования. Исследования показали, что серицинсодержащие структуры можно использовать в качестве несущей системы с длительным временем циркуляции в крови и высокой степенью стабильности [155].

В исследованиях доставки лекарств - природные биополимеры (белки и полисахариды животного или растительного происхождения) широко используются благодаря своим уникальным свойствам, таким как распространенность в природе, биоразлагаемость, биосовместимость и низкая токсичность [156]. Вышеуказанные свойства серицина позволяют использовать его в качестве оболочки для хранения пищевых продуктов [72, 139, 156–158].

Технологии капсулирования БАС и лекарственных препаратов продолжают совершенствоваться, находя широкое применение в текстильной, пищевой и фармацевтической промышленности, а также в медицине. Авторы [1, 3, 4, 7, 11, 117, 138, 140, 153–156] отмечают, что использование серицина шёлка

для формирования оболочки капсул открывает перспективы создания на текстильных материалах профилактических и лечебных покрытий, а также разработки лекарственных форм в виде серициновых нанокапсул.

Микро- и наноэмульсии можно рассматривать как инновационную и многообещающую стратегию защиты, инкапсулирования и контроля высвобождения активных соединений в пищевые рецептуры. Более того, эти методы в сочетании со съедобными покрытиями могут повысить функциональность всей системы.

Среди них полисахариды (такие, как целлюлоза, хитозан, пектин, инулин, альгинат и др.) представляют собой обширную группу соединений с разнообразными качествами и функциональными свойствами. Основным преимуществом этих материалов является их биоразлагаемость, биосовместимость и восприимчивость к биохимическим модификациям [107, 157–160].

Пектин содержится в стенках растительных клеток и межклеточных слоях наземных растений и является природным биополимером. Что касается структуры, гомогалактуронан (HG) является основным компонентом полисахаридов на основе пектина. В его состав входят также рамногалактуронан (RG-I, RG-II), арабиногалактан (AG) и ксилогалактан (XG) [157–159]. Источник пектина, методы экстракции и условия их проведения напрямую влияют на степень этерификации, молекулярную массу и процесс ацетилэтерификации. Пектин широко используется в качестве загустителя, стабилизатора и желирующего агента в пищевых продуктах [158].

---

#### **4.1.2. Потенциал белково-полисахаридного комплекса как средства доставки БАС**

---

Как известно, белки представляют собой высокомолекулярные соединения, состоящие из аминокислотных остатков, связанных между собой пептидными (амидными) связями. Они являются основными структурными

компонентами тканей человека. Полисахариды представляют собой высокомолекулярные соединения, состоящие из повторяющихся моносахаридных звеньев. Они представляют широкий спектр свойств и структур. Наличие реактивных боковых групп позволяет модифицировать их структуру, что еще больше расширяет возможности их применения [1, 3, 4, 107, 156–159].

В работе [106] рассматриваются основные типы взаимодействий между белками и полисахаридами, которые происходят либо путем ковалентных связей, либо за счет нековалентных взаимодействий. Ковалентные взаимодействия являются специфичными и осуществляются за счёт гликозилирования аминокрупп белков с карбоксильными группами полисахаридов, тогда как нековалентные взаимодействия являются неспецифичными и обычно включают электростатические взаимодействия, водородные связи, гидрофобные эффекты и ван-дер-ваальсовы силы.

Потенциал белково-полисахаридного комплекса как средства инкапсуляции и доставки биологически активных соединений, питательных веществ и лекарств [1, 3, 4, 107, 156–160] привлекает большое внимание в области пищевой, косметической и фармацевтической промышленности. Известно, что белки по своей природе являются поверхностно-активными веществами и благодаря амфифильной природе действуют как эмульгаторы, тогда как полисахариды гидрофильной природы могут действовать как загуститель и стабилизатор. Расщепление и адсорбция БАС зависят от физической и химической стабильности эмульсии, которая, в свою очередь, зависит от широкого спектра условий, таких как рН, температура, ионная сила и присутствие других поверхностно-активных компонентов и пищеварительных факторов.

Эмульсии, стабилизированные только белком, теряют стабильность в вышеупомянутых условиях, тогда как добавление полисахаридов в эмульсию, стабилизированную белком, приводит к стабильности капель эмульсии в условиях, моделирующих желудок [106]. Химически модифицирующие белки

посредством конъюгации полисахаридов могут поддерживать их молекулярную целостность и улучшать их растворимость и эмульгирующие характеристики, особенно при низких уровнях pH (например, изоэлектрической точки) [106, 1-А, 8-А].

В последнее время 3D-печать, также называемая аддитивным производством, привлекла большое внимание в пищевой промышленности благодаря своему потенциалу создавать продукты с индивидуальной геометрией, сенсорными характеристиками и питательными свойствами, адаптированными под потребности конкретных людей [160]. Белки имеют большой потенциал для разработки пищевых чернил, но их свойства должны быть оптимизированы для конкретных приложений 3D-печати, включая физическую, химическую или ферментативную модификацию белков или образование комплексов с другими съедобными веществами, такими как полисахариды. Использование пищевых чернил на основе белков может помочь пищевой промышленности разрабатывать персонализированные продукты с улучшенной функциональностью и питательными профилями [160].

Серицин десятилетиями считался отходом текстильной промышленности. В последнее время, серицин шёлка широко используется в косметических продуктах, и его дальнейшие исследования проводились на предмет его использования в медицинских целях, включая биомедицинскую инженерию. Следовательно, использование серицина в качестве эмульгатора и связующего биополимера представляет собой многообещающий подход благодаря его многочисленным биологическим свойствам. К ним относятся антиоксидантная и антиитерозиназная активность, которые способствуют разработке биоматериалов с терапевтическим потенциалом, включая противовоспалительное действие, ингибирование опухолевого роста и ускорение процессов заживления ран. Эти свойства делают серицин перспективным компонентом для применения в биоматериалах, активной упаковке пищевых продуктов, а также в пищевой и фармацевтической промышленности, что открывает широкие возможности для

его внедрения в экономику нашей республики [17-А, 19-А, 20-А, 21-А, 22-А, 24-А, 25-А].

#### **4.2. Формирование и характеристика микрокапсул, полученных на основе НМ- пектина и серицина для инкапсуляции ЛВ и БАС**

Микро- и нанокапсулирование как принцип создания систем направленной доставки и защиты пищевых ингредиентов и лекарственных веществ широко применяют в производстве различных продуктов и препаратов [155, 157–159, 161]. Поэтому создание терапевтических средств программированного и пролонгированного действия с включением серицина может обеспечить защиту биологически активных соединений (БАС), полипептидов, вакцин и других препаратов от воздействия различных факторов окружающей среды, таких как ферменты желудочного сока, изменения рН, температура и свет, за счёт использования биodeградируемой оболочки.

Целью данной части работы было изучение процесса формирования двухслойных микрокапсул на основе комплексообразования серицина и пектина, в системе эмульсии М/В, без использования поверхностно-активных соединений, способных эффективно захватывать ЛВ и БАС.

Объектом исследования являлись: низкометилованный (НМ)-пектин, полученный из яблочных выжимок согласно способу [161], с содержанием галактуроновой кислоты (ГК, %) 58.6, степенью этерификации (СЭ, %) 38.0 и молекулярной массой ( $M_w$ ) 110.2 кДа (далее обозначенные как НМПЯ); инулин, полученный из корнеклубней топинамбура [4-А] белок серицин экстрагированный щелочью (0.5 % раствором  $Na_2CO_3$ ) [12-А, 29-А, 30-А] из бракованных коконов тутового шелкопряда (*Bombyx mori*). Средневесовая молекулярная масса ( $M_w$ ) серицина, найденная методом ВЭЭЖХ составила 24.0 кД [3-А, 16-А, 19-А].

В качестве БАС были использованы полифенольные соединения (ПФС) прополиса из пчелиного хозяйства Яванского района Республики Таджикистан, полученные экстракцией 70% раствором этанола [15-А, 162].

#### 4.2.1. Эмульсионные микрокапсулы в системе масло в воде стабилизированные комплексом серицина и пектина

Микрокапсулы получали методом двухстадийного формирования в эмульсии масло в воде, при различных соотношениях серицина и пектина.

Эмульсии хранили при комнатной температуре в течение 24 часов, затем проводили оценку устойчивости по объёму, количеству микрокапсул в 1 мл, размеру и распределению частиц микроскопическим методом. Количество частиц и их размеры определяли на микроскопе *OLYMPUS BX53 (OLYMPUS U-TR30-2, Япония)*. Все измерения были выполнены на двух свежеприготовленных образцах, результаты представлены как средневычисленные.

Все эксперименты проводили дважды, в некоторых случаях трижды, с использованием свежеприготовленных эмульсий, результаты представлены как средне-стандартно вычисленные.

Микрокапсулы были оценены на устойчивость по объёму с течением времени. Для этого измеряли объём приготовленных эмульсий после охлаждения и в течение нескольких дней до момента постоянного объёма кремовидного слоя (таблица 4.1).

**Таблица 4.1. - Изменение объёма кремовидного слоя эмульсий с течением времени [1-А, 10-А, 17-А].**

СРЦ/НМП	10:1	5:1	3:1
Время, ч	$V_{\text{(крем. слоя), мл}}$	$V_{\text{(крем. слоя), мл}}$	$V_{\text{(крем. слоя), мл}}$
0	17.2	19.8	19.0
24	2.2	1.6	3.4
48	2.6	2.4	3.6
72	2.8	2.8	3.8
96	2.8	2.9	3.8
120	2.9	3.0	3.8
144	3.0	3.2	3.8

Продолжение таблицы 4.1.

216	3.2	3.4	4.0
288	3.2	3.4	4.0

Общие объёмы полученных эмульсий при всех соотношениях СРЦ/НМПЯ первоначально составляли 17-19.8 мл, на следующий день снижались, достигая стабильного состояния, а через несколько дней образовывался компактный кремовидный слой (3.2-4.0 мл).

Устойчивость микрокапсул в промытых эмульсиях оценивали микроскопически на микроскопе *OLYMPUS BX53 (OLYMPUS U-TR30-2, Япония)*. Количество макрочастиц и их размеры были определены с помощью компьютерной программы *OLYMPUS cellSens Standard*. Размер частиц представлял собой средневзвешенный по объёму средний диаметр  $d_{43}$ , который рассчитывали по формуле [4.1]:

$$d_{43} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (4.1),$$

где  $n_i$  - количество эмульсионных частиц с диаметром  $d_i$ . Согласно данному уравнению и объёму кремообразования, следует отметить, что минимальное значение размера частиц при хранении эмульсии и постоянном объёме является показателем стабильности эмульсии.

В качестве примера в таблице 4.2 приведены результаты расчёта размера частиц—эмульсионных микрокапсул серицин и НМ-пектин с весовым соотношением СРЦ/НМПЯ=10:1.

**Таблица 4.2. - Расчет размера частиц эмульсионных микрокапсул серицин и НМ-пектин с весовым соотношением СРЦ/НМПЯ=10:1 [1-А, 17-А, 27-А].**

<i>СРЦ/НМПЯ</i> <i>10:1</i> <i>d,um</i>	N	V%	Соотношение	Объёмная доля средний диаметр	
			$f=ni/N$	$n_i d_i^4$	$n_i d_i^3$
0.50	1	0.40	0.0040	0.06	0.13
0.56	2	0.80	0.0080	0.20	0.35
0.58	3	1.20	0.0120	0.34	0.59

Продолжение таблицы 4.2.

0.59	2	0.80	0.0080	0.24	0.41
0.60	3	1.20	0.0120	0.39	0.65
0.63	6	2.41	0.0241	0.95	1.50
0.65	2	0.80	0.0080	0.36	0.55
0.66	2	0.80	0.0080	0.38	0.57
0.69	2	0.80	0.0080	0.45	0.66
0.70	6	2.41	0.0241	1.44	2.06
0.72	2	0.80	0.0080	0.54	0.75
0.74	1	0.40	0.0040	0.30	0.41
0.77	3	1.20	0.0120	1.05	1.37
0.78	2	0.80	0.0080	0.74	0.95
0.80	7	2.81	0.0281	2.87	3.58
0.82	4	1.61	0.0161	1.81	2.21
0.84	7	2.81	0.0281	3.49	4.15
0.85	4	1.61	0.0161	2.09	2.46
0.87	5	2.01	0.0201	2.86	3.29
0.88	2	0.80	0.0080	1.20	1.36
0.89	3	1.20	0.0120	1.88	2.11
0.90	1	0.40	0.0040	0.66	0.73
0.91	8	3.21	0.0321	5.49	6.03
0.92	5	2.01	0.0201	3.58	3.89
0.93	2	0.80	0.0080	1.50	1.61
0.94	3	1.20	0.0120	2.34	2.49
0.95	3	1.20	0.0120	2.44	2.57
0.98	4	1.61	0.0161	3.69	3.76
1.00	6	2.41	0.0241	6.00	6.00
0.56-1.00		40.56			
1.02	1	0.40	0.0040	1.08	1.06
1.03	1	0.40	0.0040	1.13	1.09
1.05	7	2.81	0.0281	8.51	8.10
1.06	2	0.80	0.0080	2.52	2.38
1.07	5	2.01	0.0201	6.55	6.13
1.09	4	1.61	0.0161	5.65	5.18
1.11	2	0.80	0.0080	3.04	2.74
1.12	6	2.41	0.0241	9.44	8.43
1.13	3	1.20	0.0120	4.89	4.33
1.14	1	0.40	0.0040	1.69	1.48
1.15	1	0.40	0.0040	1.75	1.52
1.16	1	0.40	0.0040	1.81	1.56
1.17	2	0.80	0.0080	3.75	3.20
1.19	6	2.41	0.0241	12.03	10.11
1.20	1	0.40	0.0040	2.07	1.73
1.21	1	0.40	0.0040	2.14	1.77
1.22	1	0.40	0.0040	2.22	1.82
1.24	2	0.80	0.0080	4.73	3.81
1.25	1	0.40	0.0040	2.44	1.95
1.26	6	2.41	0.0241	15.12	12.00
1.27	3	1.20	0.0120	7.80	6.15
1.28	4	1.61	0.0161	10.74	8.39
1.29	3	1.20	0.0120	8.31	6.44
1.30	2	0.80	0.0080	5.71	4.39

Продолжение таблицы 4.2.

1.31	1	0.40	0.0040	2.94	2.25
1.32	3	1.20	0.0120	9.11	6.90
1.33	2	0.80	0.0080	6.26	4.71
1.34	4	1.61	0.0161	12.90	9.62
1.35	2	0.80	0.0080	6.64	4.92
1.36	1	0.40	0.0040	3.42	2.52
1.38	1	0.40	0.0040	3.63	2.63
1.40	4	1.61	0.0161	15.37	10.98
1.41	2	0.80	0.0080	7.91	5.61
1.42	4	1.61	0.0161	16.26	11.45
1.46	1	0.40	0.0040	4.54	3.11
1.47	3	1.20	0.0120	14.01	9.53
1.48	5	2.01	0.0201	23.99	16.21
1.50	1	0.40	0.0040	5.06	3.38
1.02-1.50		40.16			
1.51	1	0.40	0.0040	5.20	3.44
1.54	1	0.40	0.0040	5.62	3.65
1.55	3	1.20	0.0120	17.32	11.17
1.57	1	0.40	0.0040	6.08	3.87
1.58	1	0.40	0.0040	6.23	3.94
1.59	2	0.80	0.0080	12.78	8.04
1.60	3	1.20	0.0120	19.66	12.29
1.61	1	0.40	0.0040	6.72	4.17
1.62	2	0.80	0.0080	13.77	8.50
1.63	2	0.80	0.0080	14.12	8.66
1.67	1	0.40	0.0040	7.78	4.66
1.69	2	0.80	0.0080	16.31	9.65
1.73	1	0.40	0.0040	8.96	5.18
1.76	1	0.40	0.0040	9.60	5.45
1.82	1	0.40	0.0040	10.97	6.03
1.83	1	0.40	0.0040	11.22	6.13
1.85	1	0.40	0.0040	11.71	6.33
1.87	1	0.40	0.0040	12.23	6.54
1.91	1	0.40	0.0040	13.31	6.97
1.95	1	0.40	0.0040	14.46	7.41
1.51-2.00		11.24			
2.28	1	0.40	0.0040	27.02	11.85
2.32	1	0.40	0.0040	28.97	12.49
2.45	1	0.40	0.0040	36.03	14.71
2.46	1	0.40	0.0040	36.62	14.89
2.62	1	0.40	0.0040	47.12	17.98
2.66	1	0.40	0.0040	50.06	18.82
2.72	2	0.80	0.0080	109.47	40.25
2.28-3.00		3.21			
3.02	1	0.40	0.0040	83.18	27.54
3.29	1	0.40	0.0040	117.16	35.61
3.57	1	0.40	0.0040	162.43	45.50
3.95	1	0.40	0.0040	243.44	61.63
3.02-4.00		1.61			
4.06	1	0.40	0.0040	271.71	66.92
4.13	1	0.40	0.0040	290.94	70.44
4.15	2	0.80	0.0080	593.23	142.95
4.72	1	0.40	0.0040	496.33	105.15

Продолжение таблицы 4.2.

4.06-5.00		2.01			
5.05	2	0.80	0.0080	1299.52	257.39
5.73	1	0.40	0.0040	1074.49	187.67
5.05-6.00		1.20			
	249		1.0000		
				5498.27	1520.66
<b>d<sub>43</sub>*</b>	<b>(<math>\sum n_i d_i^4 / \sum n_i d_i^3</math>)</b>				<b>3.62</b>

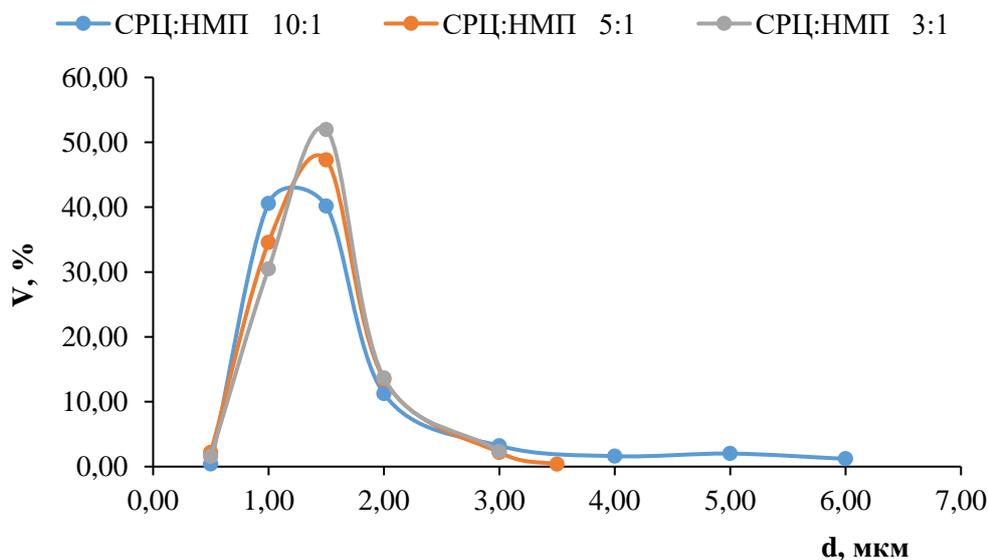
Таким образом, для каждого соотношения СРЦ:НМПЯ были получены средние размеры частиц в виде средневзвешенного по объёму среднего диаметра  $d_{43}$  с помощью программы *Excel*. Результаты расчёта среднего диаметра микрокапсул и объёмной доли частиц (V, %) для разных соотношений СРЦ:НМПЯ приведены в таблице 4.3.

**Таблица 4.3. - Средние размеры в виде средневзвешенного по объёму среднего диаметра  $d_{43}$  и объёмная доля частиц (V, %) для разных соотношений СРЦ:НМПЯ [2-А, 9-А, 21-А].**

СРЦ/НМПЯ 10:1		СРЦ/НМПЯ 5:1		СРЦ/НМПЯ 3:1	
d <sub>43</sub> , мкм	V, %	d <sub>43</sub> , мкм	V, %	d <sub>43</sub> , мкм	V, %
0.50	0.40	0.50	2.18	0.50	1.56
1.00	40.56	1.00	34.55	1.00	30.47
1.50	40.16	1.50	47.27	1.50	51.95
2.00	11.24	2.00	13.45	2.00	13.67
3.00	3.21	3.00	2.18	3.00	2.34
4.00	1.61	3.50	0.36		
5.00	2.01				
6.00	1.20				

Кривые зависимости среднего диаметра  $d_{43}$  и объёмной доли частиц (распределение микрочастиц) кремового слоя в эмульсионной системе серицин и НМ-пектин с весовыми соотношениями СРЦ/НМПЯ: 10:1, 5:1 и 3:1 представлены на рисунке 4.1. Из данных таблицы 4.3. и рисунка 4.1 видно, что максимальная доля микрочастиц, приблизительно от 11.0 до 52.0 приходится на популяцию с размерами 1-2 мкм. С уменьшением соотношения белок/пектин

максимумы несколько смещаются в сторону больших частиц, но их распределение принимает мономодальный вид.



**Рисунок 4.1. - Кривые распределения микрочастиц кремового слоя в эмульсионной системе серицин и НМ- пектин с весовыми соотношениями СРЦ/НМПЯ: 10:1, 5:1 и 3:1.**

**[18-А, 19-А, 21-А, 24-А, 28-А]**

Ранее в нашей лаборатории, разработаны технологии получения двухслойных микрокапсул на основе комплексообразования белка и различных пектинов, в присутствии противоионов натрия, для доставки ЛВ [106, 107, 158, 159, 163, 164]. В работах [163, 164] показано, что наибольшее количество микрочастиц было обнаружено для системы молочного белка (концентрата лактоглобулинов) с низкометилованным НМ- и высокометилованным ВМ-пектинами из яблок: максимальное число частиц превышало более 1.5 миллиона с наименьшим диаметром (6.5 мкм) формировалось при молярном соотношении LgC/ВМПЯ равном 22 моль, и в случае с LgC/НМПЯ достигало 44 моль.

В системе с ВМ-пектинами [163] эмульсии, вследствие добавления соли натрия, устойчивы за счёт усиления эффективности длины пектиновой цепи, соответствующей поверхности микрокапсул, путем уменьшения полиэлектролитного набухания полимерных цепей и образования плотного центра покрытой поверхности. Однако в системе с НМ-пектинами [107], где

плотность локального заряда высокая, требуется несколько большее количество противоионов, для частичного экранирования заряда, предотвращающего образование агрегатов между лактоглобулином молочной сыворотки на поверхности масляных частиц и свободным пектином. В данном случае полное экранирование избытка отрицательных зарядов на поверхности вторичной эмульсии маловероятно.

Кроме того, при добавлении достаточного количества пектина к вторичной эмульсии, предполагалось, что заряд образующихся частиц постепенно перейдет от положительного к отрицательному и могут быть получены кинетически устойчивые эмульсии, содержащие отрицательно заряженные (анионные) капли, как это показано для других типов эмульсионных систем [165–168]. Однако в нашем случае, с увеличением количества, протеина (серицина) вероятно, происходит агрегация молекул на поверхности слоя масляных частиц, что привело к уменьшению количества частиц и росту их размера.

Действительно, с применением новой технологии были получены эмульсионные микрокапсулы на основе белка серицина и НМПЯ для капсулирования ПФС. В таблице 4.4 представлены характеристики эмульсионных микрокапсул, полученных на основе комплексообразования НМ-яблочного пектина с белком серицином (СРЦ), по новой технологии, содержащие активное вещество ПФС.

**Таблица 4.4. - Характеристики микрокапсул в системе СРЦ/НМПЯ [5-А, 21-А].**

<b>Весовое соотношение СШ/НМПЯ, г/г</b>	<b>Молярное соотношение СШ/НМПЯ, моль/моль</b>	<b>Объём эмульсии в день приготовления, мл</b>	<b>Объём эмульсии на шестой день, мл</b>	<b>d<sub>43</sub>, мкм</b>	<b>Содержание ПФС в микрокапсулах, %</b>
1:1	1.17	18.7	16.6	5.65	42.81
3:1	3.50	18.4	18.4	5.67	47.43
5:1	5.80	18.4	15.4	6.79	46.29
10:1	11.70	17.4	13.4	7.14	37.99

Показано, что объёмы эмульсий при различных соотношениях остаются стабильны в течение нескольких дней, а с ростом доли белка серицина в системе СРЦ/НМПЯ стабильность эмульсии растёт, принимает максимальное значение при мольном соотношении белок/пектин равное 3.5 и снова падает. Также загрузка ПФС проходит через максимум, достигая значение 47.23% и уменьшается до 37.99 % с увеличением мольного соотношения СРЦ/НМПЯ

Таким образом, в результате проведённых исследований, нами, найдены оптимальные условия получения стабильных микрокапсул в эмульсионной системе масло/вода при различных соотношениях СРЦ/НМПЯ, с минимальным размером и максимальным количеством частиц в единице объёма, эффективно захватывающие БАС. Серицин шёлка способен формировать стабильные эмульсии с НМПЯ, в широком диапазоне соотношений СРЦ/НМПЯ 1-10.

### **4.3. Инкапсулирование ПФС в эмульсионных микрокапсулах и оценка антиоксидантной активности**

#### **4.3.1. Химический состав полифенольных соединений прополиса**

Характеристика ПФС была проведена с использованием спектроскопии *ATR-FTIR* и *UV-Vis*, а также с помощью капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ). Разновидность ПФС (флавоноиды и фенольные кислоты) и содержание фенольных соединений были установлены с использованием метода Фолина-Чокальтеу и КЗЭ [15-А].

Согласно исследованиям, в прополисе идентифицировано более 500 различных химических соединений, включая флавоноиды, фенилпропаноиды, терпеноиды, стилбены, лигнаны, кумарины и их пренилированные производные. Основными компонентами прополиса являются флавоноиды, которые в значительной степени определяют его фармакологические свойства [169].

Экстракция биохимических соединений прополиса, собранного из трёх регионов, проводилась в восемь этапов с использованием различных методов. На первых стадиях выполнялось обезжиривание, за которым следовало выделение

полифенольных соединений с применением 96% и 70% водно-этаноловых растворов. На последующих этапах из прополиса экстрагировались другие вещества, включая белки, моно-, олиго- и полисахариды, с использованием воды и кислотного раствора.

Определение общего содержания ПФС, включая флавоноиды и фенольные кислоты анализировалось с помощью КЗЭ. Эксперименты по КЗЭ проводились на системе капиллярного электрофореза *3D Agilent G1600AX* (Германия), оснащенной системой детектирования на основе диодной матрицы. Колонка была откалибрована с использованием стандарта 18 фенольных соединений [15-А].

Общее содержание фенольных соединений, извлечённых из прополиса органическими и водными растворителями, оказалось практически одинаковым, составляя 41.55% и 43.5% от всех соединений прополиса соответственно, в образцах, полученных из регионов Яван и Варзоб [162]. Анализ полученных образцов прополиса показал, что их состав преимущественно включает катехин, гомованиловую кислоту, 2-(гидроксифенил)этанол, кверцитрин и сиринговую кислоту. Установлено, что доминирующими фенольными соединениями прополиса из Варзоба являются катехин, гомованиловая кислота, кверцитрин, 2-(гидроксифенил)этанол, ванилин и сиринговая кислота. Результаты исследования продемонстрировали, что исследованные образцы прополиса отличаются по типу и количеству отдельных полифенолов. Прополис из Варзоба и Дарваза содержит одинаковое количество 2-(гидроксифенил) этанола и гидрата физетина, но различается по содержанию катехина, 3,4-диметоксибензойной кислоты, гомованиловой кислоты, ванилина, транс-коричной кислоты, кверцитрина, сиринговой, п-кумаровой и транс-феруловой кислот, а также гидрата физетина [15-А].

В образце прополиса из Явана были обнаружены дополнительные фенольные соединения, включая кофейную, галловую и 3,4-дигидроксibenзойную кислоты. В то же время фенольные соединения, такие как гомогентизиновая и галлиевая кислоты, присутствовали в одинаковых

количества во всех исследованных образцах. Полученные результаты состава полифенольных соединений из Яванского района представлены в таблице 4.5.

**Таблица 4.5. - Состав и количество фенольных кислот и флавоноидов экстракта прополиса Яванского района 70% водным раствором этанола [15-А].**

Пик №	Время удерживания [мин]	Площадь пика	Количество, мг/л (ppm)	ПФС Соединение
1	7.608	23.807	8.17	Ресвератрол
2	10.086	88.268	64.33	3,4-Диметоксибензойная кислота
3	10.732	58.445	60.39	Ванилин
4	10.905	194.770	25.27	Транс-коричная кислота
5	11.477	697.600	147.02	Кверцитрин
6	11.631	279.240	3312.24	Гомогентизиновая кислота
7	12.182	264.206	137.65	Сиринговая кислота
8	12.335	108.171	34.96	Транс-ферруловая кислота
9	13.173	1869.781	533.21	Физетин гидрат
10	13.418	95.337	17.23	п-кумаровая кислота
11	17.730	30.634	5.58	Кофейная кислота
12	19.746	264.177	49.48	Галловая кислота
13	22.264	337.448	76.31	3,4-дигидроксибензойная кислота
	<b>Всего:</b>		<b>4471.84</b>	

Таким образом, представленные данные позволяют выделить специфические маркеры для оценки качества мёда и прополиса из изученных регионов. Анализ показал, что исследуемый прополис преимущественно содержит гомогентизиновую кислоту (2,5-дигидроксибензойную кислоту) и сиринговую кислоту из группы фенольных кислот, а также физетин гидрат и кверцетин из группы флавоноидов. Кроме того, в образцах прополиса обнаружены фенольные соединения, такие как кофейная, галловая, 3,4-диметокси- и 3,4-дигидроксибензойные кислоты, ванилин и галлиевая кислота, что подтверждает богатый химический состав прополиса данного региона.

---

### 4.3.2. Определение антиоксидантной активности эмульсионных микрокапсул, содержащих ПФС

---

Антиоксидантный статус организма является универсальным показателем, отражающим общее состояние здоровья человека. Большинство патологических процессов, включая ишемическую болезнь сердца, атеросклероз и другие сердечно-сосудистые заболевания, сопровождаются развитием окислительного стресса и повышенным образованием свободных радикалов [170]. Активные формы кислорода запускают в клетках различные свободнорадикальные окислительные реакции, мишенями которых становятся липиды клеточных мембран, белки, ферменты, молекулы ДНК и в результате таких повреждений может развиваться широкий спектр заболеваний [171].

В этом контексте препараты, созданные на основе лекарственного растительного сырья, содержащие комплекс веществ с выраженной антиоксидантной активностью (АОА), представляют собой многообещающее направление для профилактики и лечения различных заболеваний. Согласно литературным данным, фенольные соединения занимают ведущую роль среди природных антиоксидантов, поскольку они обладают низкой токсичностью и высокой эффективностью в ингибировании процессов свободнорадикального окисления в живых организмах [172].

Как было отмечено ранее [18, 19, 124] белок серицин также обладает АОА, более того, для усиления АОА микрокапсул в них были внедрены ПФС. Общее содержание фенольных соединений прополиса определяли по методу Фолин-Чекалтеу на УФ-спектрофотометре при длине волны 765 нм [109]. Для оценки суммарной АОА мы определяли количество внедрившегося ПФС из экстракта прополиса [5-А].

Известно, что существует тесная корреляция между антиоксидантной активностью и фенольным содержанием экстрактов, полученных из различных природных источников. Это снижение антиоксидантной активности после инкапсуляции указывает на то, что большая часть полифенолов,

присутствующих в экстракте, находится в инкапсулированной форме, что приводит к разнице в антиоксидантной способности до и после инкапсуляции полифенолов.

Исследования АОА прополиса т.е. эффект улавливания свободных радикалов прополисом в системе свободных радикалов 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl: DPPH) проводили спектрофотометрическим методом при длине волны 517 нм [110].

Оценку антиоксидантной активности полифенольного экстракта до и после инкапсуляции проводили с помощью анализа DPPH. Спиртовой экстракт прополиса с содержанием ПФС в нём 5 мг/мл показал высокую антиоксидантную активность в процентах АОА по формуле [2.5] (Глава 2, раздел 2.7). Данные представлены в таблице 4.6.

**Таблица 4.6. – АОА эмульсионных микрокапсул с полифенольными соединениями прополиса, полученных экстракцией 70% раствором этанола [5-А].**

Образец	Разбавление*	D <sub>517 нм</sub> (ср. зн)	АОА, %
<b>ПФС экстракт из прополиса*</b>	1:10	0.147	54.32
	1:30	0.122	62.03
	1:50	0.117	63.71
	1:100	0.119	62.84
<b>Эмульсия-контроль (СРЦ/НМПЯ 5:1)</b>	1:10	0.293	9.01
	1:30	0.278	13.66
	1:50	0.263	18.32
	1:100	0.258	19.88
<b>СРЦ/НМПЯ 10:1</b>	1:10	0.044	86.34
	1:30	0.041	87.27
	1:50	0.037	88.51
	1:100	0.027	91.61
<b>СРЦ/НМПЯ 5:1</b>	1:10	0.052	83.85
	1:30	0.046	85.71
	1:50	0.033	89.75

Продолжение таблицы 4.6.

	1:100	0.029	90.99
<b>СРЦ/НМПЯ 3:1</b>	1:10	0.049	84.78
	1:30	0.039	87.89
	1:50	0.028	91.30
	1:100	0.023	92.86
	<b>контроль раствор</b>	0.322	

\*исходный раствор полифенольных соединений с концентрацией 5 мг/мл разбавлен 70 %-ным этиловым спиртом.

Как видно из данных таблицы 4.6 ПФС из экстракта прополиса показали АОА равную 54.32%, при разбавлении растворов АОА несколько увеличилась и оставалась постоянной при 30- и 100-кратном разбавлении, что связано с растворимостью ПФС в водно-спиртовом растворе. АОА эмульсионных микрокапсул без содержания ПФС показали низкие значения ингибирования DPPH радикала 9.01% и при 100-кратном разбавлении это значение достигло 19.88%.

Нами обнаружено, что инкапсулирование ПФС в виде эмульсии в системе «масло в воде», проявляет незначительную ( $P < 0.05$ ) антиоксидантную активность в исходном состоянии. В то время как при 10-кратном разбавлении инкапсулированные ПФС в эмульсионные микрокапсулы, стабилизированные белком серицина и яблочным пектином, способствовали высоким значениям ингибирования DPPH радикала. После разбавления эмульсии водой процент улавливания свободных радикалов заметно увеличивается, вследствие интенсификации диффузии ПФС из микрокапсул. Такая тенденция роста активности почти одинакова у микрокапсул с различным соотношением СРЦ/НМПЯ: АОА микрокапсул увеличивается с  $78 \pm 1.7\%$  при 10-кратном разбавлении до  $92 \pm 1.2\%$  по мере дальнейшего разбавления, сохраняя высокую активность даже при 100-кратном разбавлении эмульсии.

Таким образом, в результате проведённых исследований, нами установлено, что экстракты прополиса содержат наибольшее количество ПФС и флавоноидов. ПФС инкапсулированные в виде эмульсионных микрокапсул,

стабилизированные белком серицина и яблочным пектином, показали высокую антиоксидантную активность с минимальной концентрацией ПФС, что подтверждает сохранение их терапевтических свойств. Установлено, что получение эмульсий с высокой степенью инкапсулирования полифенольных соединений, при 100-кратном разбавлении показала высокую антиоксидантную активность, что связано с растворимостью ПФС и их диффузии из микрокапсул.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан эффективный метод выделения серицина из шелковых отходов водной экстракцией в автоклаве при высокой температуре за короткое время, с определенной структурой, способного стабилизировать эмульсии в системе «масло/вода» с инкапсулированным активным ингредиентом [1-А, 9-А, 12-А, 14-А, 26-А, 27-А, 28-А, 29-А].
2. Показано, что высокий выход качественного, высокомолекулярного серицина можно достичь путем экстракции серицина в автоклаве при 7-минутной обработке коконов водой [12-А, 14-А].
3. Исследована вторичная структура серицина методом ИК-Фурье спектроскопии. Впервые установлено существование структуры  $\beta$ -листа для образца из водного экстракта и структуры случайных клубков для солевого экстракта [6-А, 14-А].
4. Проведён анализ молекулярной массы и гидродинамических свойств серицина в растворе методом ВЭЖХ. Обнаружено, что полипептиды серицина элюируются в 3-х макромолекулярных популяциях, основная часть которых, приходится на вторую фракцию со средним значением  $M_w$  19.4 – 19.8 кДа [3-А, 4-А, 7-А].
5. Установлено, что на молекулярную массу и агрегативное поведение серицина шёлка оказывают влияние как параметры процесса экстракции, так и условия его выделения из раствора [4-А, 14-А, 16-А, 19-А, 26-А, 29-А].
6. Показано, что полипептиды серицина присутствуют в виде изолированной  $\beta$ -конформации при низком содержании в растворе, а при концентрациях более 1–2 мг/мл они агрегируются. Анализ поведения полипептидов серицина в концентрированном растворе (4-10 мг/мл) подтверждает гипотезу об агрегации макромолекулы серицина [3-А, 7-А, 14-А, 33-А].
7. Оптимальные условия для получения стабильных микрокапсул в эмульсионной системе «масло/вода» были определены при различных соотношениях серицин/пектин. Эти условия обеспечивают минимальный размер капсул и максимальное количество частиц в единице объёма,

эффективно инкапсулирующих биологически активные вещества (ПФС) [1-А, 8-А, 13-А, 20-А, 21-А].

8. Инкапсулированные полифенольные соединения в форме эмульсионных микрокапсул, стабилизированные белком серицина и яблочным пектином, показали высокую антиоксидантную активность с минимальной концентрацией ПФС, что подтверждает сохранение их терапевтических свойств [5-А, 10-А, 17-А, 22-А].
9. Обоснование возможности применения серицина и композитов на его основе в пищевой и фармацевтической отраслях.

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

Доставка ЛВ и БАС в кишечник является ключевым аспектом современной медицины, поскольку способствует повышению эффективности и безопасности терапевтических агентов. Однако этот процесс сопровождается рядом сложностей, включая преодоление биологических барьеров, обеспечение стабильности ЛВ и БАС, специфичность их доставки к месту назначения и минимизацию токсичности.

Одной из наиболее перспективных технологий для доставки лекарственных веществ (ЛВ) и биологически активных соединений (БАС) является применение микро- и наноматериалов, которые могут быть точно спроектированы с учетом заданных характеристик, таких как размер, форма, химическая структура поверхности и функциональная активность.

Серицин представляет собой перспективный материал для создания средства доставки лекарственных и косметических средств, особенно при его сочетании с другими природными или синтетическими полимерами.

В проведённой работе определены оптимальные условия для формирования стабильных микрокапсул в эмульсионной системе масло/вода при различных соотношениях серицин/пектин. Данные условия позволяют получить микрокапсулы с минимальным размером и максимальной концентрацией частиц в единице объёма, обеспечивая эффективную инкапсуляцию ПФС, которые

могут быть применены для приготовления биологически активных добавок и пищевых продуктов функционального назначения, фортификации пищевых продуктов антиоксидантами и витаминами.

Потенциал применения белково-полисахаридного комплекса как средства инкапсуляции и доставки биологически активных соединений, питательных веществ и лекарственных препаратов открывает возможность внедрения результатов данной работы в пищевую, косметическую и фармацевтическую промышленность Республики и стран региона.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Saad, M. A comprehensive review of recent advances in silk sericin: Extraction approaches, structure, biochemical characterization, and biomedical applications/M. Saad, L.M. El-Samad, R.A. Gomaа, M. Augustyniak, M.A. Hassan // International Journal of Biological Macromolecules. – 2023. – V. 250. – P. 126067. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126067>.
2. Seylan, A. S. Recovery of sericin protein from silk processing wastewaters by membrane technology [Text]: A thesis submitted to the graduate school of natural and applied sciences of middle east technical university in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science in engineering sciences / A. S. Seylan. – July 2008. – 182 pages.
3. Kumar, S.S.D. Sericin-based nanomaterials and their applications in drug delivery / S.S.D. Kumar, H. Abrahamse // Bio-Based Nanomaterials, Elsevier. – 2022. – P. 211–229. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85148-0.00008-7>
4. Yang, C. Silk sericin-based biomaterials shine in food and pharmaceutical industries / C. Yang, L. Yao, L. Zhang // Smart Materials in Medicine. – 2023. – V. 4. – P. 447–459. <https://doi.org/10.1016/j.smain.2023.01.003>
5. Яминова, З.А. Использование шелковых отходов для шлихтования и получения комбинированной пряжи [текст]: автореф. дисс. на соискание уч. степени кандидата тех. Наук / З.А. Яминова. – Иванов, 2017.
6. Ишматов, А.Б. Экстракционные характеристики оболочки кокона тутового шелкопряда / А.Б. Ишматов, З.К. Мухидинов // Сб. материалов Международной научно- технической конференции. - 27-28 июля 2017 года. – Т: «Fan va texnologiya», 2017. – С. 260-263
7. Padamwar, M.N. Silk sericin and its applications: A review / M.N. Padamwar, A.P. Pawar // Journal of Scientific & Industrial Research. – 2004. – V. 63. – P. 323–329.
8. Kundu, S.C. Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: Potential for biomedical and biotechnological applications / S.C. Kundu, B.C.

- Dash, R. Dash, D.L. Kaplan // Progress in Polymer Science (Oxford). – 2008. – V. 33, № 10. – P. 998–1012. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.08.002>
9. Aramwit, P. Potential applications of silk sericin, a natural protein from textile industry by-products / P. Aramwit, T. Siritientong, T. Srichana // Waste Management and Research. – 2012. – V. 30, № 3. – P. 217–224. <https://doi.org/10.1177/0734242X11404733>
  10. Srivastava, C.M. Recent developments in regenerated silk fibroin fibers / C.M. Srivastava, R. Purwar // International Journal of Research in Advent Technology. – 2014. – V. 2, - № 1. – P. 267–277.
  11. Rocha, L.K.H. Sericin from Bombyx mori cocoons. Part I: Extraction and physicochemical-biological characterization for biopharmaceutical applications / L.K.H. Rocha, L.I.L. Favaro, A. C. Rios, E. C. Silva, W. F. Silva, T.P. Stigliani, M. Guilger, R. Lima, J.M. Oliveira Jr., N. Aranha, M. Tubino, M.M.D.C. Vila, V. M. Balcão // Process Biochemistry. – 2017. – V. 61. – P. 163–177. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.019>
  12. Cao, T.-T. Processing and characterization of silk sericin from *Bombyx mori* and its application in biomaterials and biomedicines / T.-T. Cao, Y.-Q. Zhang // Materials Science and Engineering: C. Elsevier Ltd. – 2016. – V. 61. – P. 940–952. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.082>
  13. El-Fakharany, E.M. In vitro assessment of the bioactivities of sericin protein extracted from a bacterial silk-like biopolymer / E. M. El-Fakharany, G. M. Abu-Elreesh, E.A. Kamoun, S. Zaki, D.A. Abd-EL-Haleem // RSC Advances. Royal Society of Chemistry. – 2020. – V. 10, - № 9. – P. 5098–5107. DOI: 10.1039/c9ra09419a
  14. Chaudhary, H. Multifunctional dyeing and finishing of polyester with Sericin and Basic dyes / H. Chaudhary, D. Gupta, C. Gupta // Journal of the Textile Institute. Taylor and Francis Ltd. – 2016. – V. 108, - № 3. – P. 314–324. <https://doi.org/10.1080/00405000.2016.1165401>
  15. Салимджанов, С. Шёлк [текст]: монография / С. Салимджанов, А. Б. Ишматов. – Худжанд. – 2010. – 308 с.

16. Программа развития шелководства и выработки шелка в республике Таджикистан на 2012-2020 годы, Министерство промышленности и новых технологий РТ. № 408. – 2011г. – 23с.
17. Программа «Развития отраслей шелководства и переработки коконов тутового шелкопряда в Республике Таджикистан на 2020-2024 годы» [электронный ресурс]. Режим доступа: [http://narodnaya.tj/index.php?option=com\\_content&view=article&id=17597:2023-04-20-03-54-55&catid=54:selskoe-khozyastvo&Itemid=68](http://narodnaya.tj/index.php?option=com_content&view=article&id=17597:2023-04-20-03-54-55&catid=54:selskoe-khozyastvo&Itemid=68).
18. Kunz, R.I. Silkworm Sericin: Properties and Biomedical Applications / R. I. Kunz, R.M.S. Brancalhão, L.F.C. Ribeiro, M.R.M. Natali // BioMed Research International. – 2016. – V. 2016. – P. 1–19. <https://doi.org/10.1155/2016/8175701>
19. Aramwit, P. Properties and antityrosinase activity of sericin from various extraction methods / P. Aramwit, S. Damrongsakkul, S. Kanokpanont, T. Srichana // Biotechnology and Applied Biochemistry. – Wiley, 2010. – V. 55, - № 2. – P. 91–98. <https://doi.org/10.1042/BA20090186>
20. Butkhup, L. Phenolic composition and antioxidant activity of Thai and Eri silk sericins / L. Butkhup, M. Jeenphakdee, S. Jorjong, S. Samappito, W. Samappito, J. Butimal // Food Science and Biotechnology. – 2012. – V. 21, - № 2. – P. 389–398. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0050-0>
21. Kundu, B. Isolation and processing of silk proteins for biomedical applications / B. Kundu, N.E. Kurland, V. K. Yadavalli, S.C. Kundu // International Journal of Biological Macromolecules. – 2014. – V. 70. – P. 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.022>
22. Inoue, S. Silk Fibroin of Bombyx mori Is Secreted, Assembling a High Molecular Mass Elementary Unit Consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 Molar Ratio / S. Inoue, K. Tanaka, F. Arisaka, S. Kimura, K. Ohtomo, S. Mizuno // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – V. 275, - № 51. – P. 40517–40528. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006897200>

23. Koh, L.D. Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials / L.D. Koh, Y. Cheng, C.P. Teng, Y.W. Khin, X.J. Loh, S.Y. Tee, M. Low, E.Y. Ye, H.D. Yu, Y.W. Zhang, M.Y. Han // Progress in Polymer Science. – 2015. – V. 46. – P. 86–110. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.001>
24. Qi, Y. A review of structure construction of silk fibroin biomaterials from single structures to multi-level structures / Y. Qi, H. Wang, K. Wei, Y. Yang, R.-Y. Zheng, I. S. Kim, K.-Q. Zhang // International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG. – 2017. – V. 18, - № 3. – P. 237–258. <https://doi.org/10.3390/ijms18030237>
25. Calamak, S. Ag/silk fibroin nanofibers: Effect of fibroin morphology on Ag+ release and antibacterial activity / S. Calamak, E. A. Aksoy, N. Ertas, C. Erdogdu, M. Sagiroglu, K. Ulubayram // European Polymer Journal. Elsevier Ltd. – 2015. – V. 67. – P. 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.03.068>
26. Siavashani, A.Z. Silk fibroin/sericin 3D sponges: The effect of sericin on structural and biological properties of fibroin / A. Z. Siavashani, J. Mohammadi, M. Rottmar, B. Senturk, J. Nourmohammadi, B. Sadeghi, L. Huber, K. Maniura-Weber // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – V. 153. – P. 317–326. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.316>
27. Rajput, S.K.. Sericin-A Unique Biomaterial / S.K. Rajput, M. Kumar Singh // Journal of Polymer and Textile Engineering. – 2015. – V. 2. - № 3. – P. 29–35. e-ISSN: 2348-019X, p-ISSN: 2348-0181
28. Dash, R. Purification and biochemical characterization of a 70 kDa sericin from tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* / R. Dash, S.K. Ghosh, D.L. Kaplan, S.C. Kundu // Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier Inc. – 2007. – V. 147, - № 1. – P. 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.01.009>
29. Chouhan, D. Silk biomaterials in wound healing and skin regeneration therapeutics: From bench to bedside / D. Chouhan, B.B. Mandal // Acta Biomaterialia. Acta Materialia Inc. – 2020. – V. 103. – P. 24–51. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.11.050>

30. Kweon, H.Y. Effects of poloxamer on the gelation of silk sericin / H. Y. Kweon, J.H. Yeo, K.G. Lee, Y.W. Lee, Y.H. Park, J.-H. Nahm, C.-S. Cho // *Macromolecular Rapid Communications*. – 2000. - V. 21, - № 18. - P. 1302–1305. [https://doi.org/10.1002/1521-3927\(20001201\)21:18%3C1302::AID-MARC1302%3E3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1521-3927(20001201)21:18%3C1302::AID-MARC1302%3E3.0.CO;2-6)
31. Lamboni, L. Silk sericin: A versatile material for tissue engineering and drug delivery / L. Lamboni, M. Gauthier, G. Yang, Q. Wang // *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc. – 2015. – V. 33, - № 8. – P. 1855–1867. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.014>
32. Mase, K. A New Silkworm Race for Sericin Production, “SERICIN HOPE” and its Product, “VIRGIN SERICIN” / K. Mase, T. Iizuka, E. Okada, T. Miyajima, T. Yamamoto // *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*. – 2006. – V. 75. – P. 85–88. ISSN: 13468073
33. Wu, J.H. Preparation and characterization of sericin powder extracted from silk industry wastewater / J.H. Wu, Z. Wang, S.Y. Xu // *Food Chemistry*. – 2007. – V. 103, - № 4. – P. 1255–1262. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.042>
34. Deepthi, M. Nair. Biodegradable hydrogels from silk sericin: Development and characterization for medical applications [Text]: a dissertation submitted by Deepthi M. Nair in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of philosophy / Deepthi. M. Nair. – 2015. – 100 pages.
35. Nayak, S. Silk sericin-alginate-chitosan microcapsules: Hepatocytes encapsulation for enhanced cellular functions / S. Nayak, S. Dey, S.C. Kundu // *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V. – 2014. – V. 65. – P. 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.042>
36. Panthong, J. Effect of spray drying conditions on the characteristics of sericin powder from eri silk boiling water / J. Panthong, C. Eamchotchawalit, S. Songsermpong // *International Journal of Health and Life-Sciences*. – 2015. – V. 1, - № 1. – P. 151–160. ISSN 2454-5872.
37. Балтаева, М.М. Серицин и его значение / М.М. Балтаева, Д.Д. Бабаджанова, Х.О. Эшчанов // *Universum: технические науки: электрон. научн. журн.*

- <https://7universum.com/ru/tech/archive/item/12898>. - 2022. - V. 94, - № 1–2.  
DOI: 10.32743/UniTech.2022.94.1.12898
38. Takasu, Y. Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori* / Y. Takasu, H. Yamada, K. Tsubouchi // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 2002. – V. 66, - № 12. – P. 2715–2718.  
<https://doi.org/10.1271/bbb.66.2715>
  39. Dong, Z. Antimicrobial components in the cocoon silk of silkworm, *Bombyx mori* / Z. Dong, Q. Xia, P. Zhao // International Journal of Biological Macromolecules. – 2023. – V. 224. – P. 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.103>
  40. Takasu, Y. Extraction and Chromatographic Analysis of Cocoon Sericin of the Silkworm, *Bombyx mori* / Y. Takasu, H. Yamada, K. Tsubouchi // Journal of Insect Biotechnology and Sericology. – 2002. – V. 71. – P. 151–156. ISSN: 13468073
  41. Takasu, Y. Identification of Ser2 proteins as major sericin components in the non-cocoon silk of *Bombyx mori* / Y. Takasu, T. Hata, K. Uchino, Q. Zhang // Insect Biochemistry and Molecular Biology. – 2010. – Vol. 40, - № 4. – P. 339-344.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.02.010>
  42. Guo, K. Identification and characterization of sericin5 reveals non-cocoon silk sericin components with high  $\beta$ -sheet content and adhesive strength / K. Guo, X. Zhang, D. Zhao, L. Qin, W. Jiang, W. Hu, X. Liu, Q. Xia, Z. Dong, P. Zhao // Acta Biomaterialia. – 2022. – V. 150. – P. 96–110.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.07.021>
  43. Zhu, L.J. Gelation of silk sericin and physical properties of the gel / L.J. Zhu, M. Arai, K. Hirabayashi // Journal of Sericultural Science of Japan. – 1995. – V. 64, - № 5. – P. 415-419.
  44. Komatsu, K. Recent advances in sericin research / K. Komatsu // Journal of Sericulture Science of Japan. – 1980. – V. 69, - № 1. – P. 457–465.
  45. Gimenes, M.L. High Molecular Sericin from *Bombyx mori* Cocoons: Extraction and Recovering by Ultrafiltration / M.L. Gimenes, V.R. Silva, M.G.A. Vieira, M.G.C. Silva, A.P. Scheer // International Journal of Chemical Engineering and

- Applications. – 2014. – V. 5, - № 3. – P. 266–271. DOI: 10.7763/IJCEA.2014.V5.391
46. Bascou, R. Detailed investigation on new chemical-free methods for silk sericin extraction / R. Bascou, J. Hardouin, M.A.B. Mlouka, E. Guénin, A. Nesterenko // *Materials Today Communications*. – 2022. – V. 33. – P. 104491-104523. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.104491>
47. Aramwit, P. The effect of sericin from various extraction methods on cell viability and collagen production / P. Aramwit, S. Kanokpanont, T. Nakpheng, T. Srichana // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2010. – V. 11, - № 5. – P. 2200–2211. <https://doi.org/10.3390/ijms11052200>
48. Tokutake, S. Isolation of the Smallest Component of Silk Protein / S. Tokutake // *Biochem. J*. – 1980. – V. 187. – P. 413–417.
49. Tamada, Y. Sulfation of silk sericin and anticoagulant activity of sulfated sericin / Y. Tamada , M. Sano , K. Niwa , T. Imai, G. Yoshino // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 2004. – V. 15, - № 8. – P. 971–980. <https://doi.org/10.1163/1568562041526469>
50. Vaithanomsat, P. Sericin separation from silk degumming wastewater / P. Vaithanomsat, V. Kitpreechavanich // *Separation and Purification Technology*. – 2008. – V. 59, - № 2. – P. 129–133. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.05.039>
51. Puerta, M. Influence of ethanol post-treatments on the properties of silk protein materials / M. Puerta, M.C. Arango, N. Jaramillo-Quiceno, C. Alvarez-Lopez, A. Restrepo-Osorio // *Springer Nature Applied Sciences*. – 2019. – V. 1, - № 11. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1486-0>
52. Chirila, T. V. Further development of silk sericin as a biomaterial: comparative investigation of the procedures for its isolation from *Bombyx mori* silk cocoons / T. V. Chirila, S. Suzuki, N. C. McKirdy // *Progress in Biomaterials*. – 2016. – V. 5, - № 2. – P. 135–145. <https://doi.org/10.1007/s40204-016-0052-8>
53. Kurioka, A. Characterization of sericin powder prepared from citric acid-degraded sericin polypeptides of the silkworm, *Bombyx Mori* / A. Kurioka, F.

- Kurioka, M. Yamazaki // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. – 2004. – V. 68, - № 4. – P. 774–780. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.774>
54. Yang, M. Tuning molecular weights of *Bombyx mori* (*B. mori*) silk sericin to modify its assembly structures and materials formation / M. Yang, Y. Shuai, G. Zhou, N. Mandal, L. Zhu, C. Mao // *ACS Applied Materials and Interfaces*. – 2014. – V. 6, - № 16. – P. 13782–13789. <https://doi.org/10.1021/am503214g>
55. Aramwit, P. Formulation and characterization of silk sericin-PVA scaffold crosslinked with genipin / P. Aramwit, T. Siritientong, S. Kanokpanont, T. Srichana // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2010. – V. 47, - № 5. – P. 668–675. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.08.015>
56. Aramwit, P. Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericin / P. Aramwit, S. Kanokpanont, W. De-Eknamkul, T. Srichana // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2009. – V. 107, - № 5. – P. 556–561. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.12.012>
57. Wang ,Y. A Novel AgNPs/Sericin/Agar Film with Enhanced Mechanical Property and Antibacterial Capability / Y. Wang, R. Cai, G. Tao, P. Wang, H. Zuo, P. Zhao, A. Umar, H. He // *Molecules*. MDPI AG. – 2018. – V. 23, - № 7. – P. 1821- 1835. <https://doi.org/10.3390/molecules23071821>
58. He, H. Preparation and characterization of silk sericin/PVA blend film with silver nanoparticles for potential antimicrobial application / H. He, R. Cai, Y. Wang, G. Tao, P. Guo, H. Zuo, L. Chen, X. Liu, P. Zhao, Q. Xia // *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V. – 2017. – V. 104. – P. 457–464. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.009>
59. Vineis, C. Synergistic effect of sericin and keratin in gelatin based nanofibers for in vitro applications / C. Vineis, I. Cruz Maya, S. Mowafi, A. Varesano, D.O. S´anchez Ram´irez, M. Abou Taleb, C. Tonetti, V. Guarino, H. El-Sayed // *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V. – 2021. – V. 190. – P. 375–381. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.007>
60. Chirila, T. V. Evaluation of silk sericin as a biomaterial: in vitro growth of human corneal limbal epithelial cells on *Bombyx mori* sericin membranes / T.V. Chirila,

- S. Suzuki, L. J. Bray, N. L. Barnett, D. G. Harkin // *Progress in Biomaterials*. – 2013. – V. 2, - № 1. – P. 14-24.
61. Kumar, J.P. Cross-linked silk sericin-gelatin 2D and 3D matrices for prospective tissue engineering applications / J. P. Kumar, N Bhardwaj and B. B. Mandal // *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry. – 2016. – V. 6, - № 107. – P. 105125–105136. <https://doi.org/10.1039/C6RA18654H>
62. Wang, S., Li, X., Xu, W., Yu, Q., & Fang, S. (2023). Advances of regenerated and functionalized silk biomaterials and application in skin wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2024. – V. 254, 128024. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128024>
63. Chen, P. Synergic Fabrication of Gold Nanoparticles Embedded Dextran/ Silk Sericin Nanomaterials for the Treatment and Care of Wound Healing / P. Chen, L. Bian, X. Hu // *Journal of Cluster Science*. – 2022. – V. 33, - № 5. – P. 2147–2156. <https://doi.org/10.1007/s10876-021-02131-3>
64. Teramoto, H. Preparation of gel film from Bombyx mori silk sericin and its characterization as a wound dressing / H. Teramoto, T. Kameda, Y. Tamada // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. – 2008. – V. 72, - № 12. – P. 3189–3196. <https://doi.org/10.1271/bbb.80375>
65. Zhaorigetu, S. Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse / S. Zhaorigetu, N. Yanaka, M. Sasaki, H. Watanabe, N. Kato // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2003. – V. 71, - № 1–3. – P. 11–17. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(03\)00092-7](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(03)00092-7)
66. Terada, S. Preparation of silk protein sericin as mitogenic factor for better mammalian cell culture / S. Terada, M. Sasaki, K. Yanagihara, H. Yamada // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2005. – V. 100, - № 6. – P. 667–671. <https://doi.org/10.1263/jbb.100.667>
67. Jiang, L.B. Injectable sericin based nanocomposite hydrogel for multi-modal imaging-guided immunomodulatory bone regeneration / L. B. Jiang, S. L. Ding, W. Ding, D. H. Su, F. X. Zhang, T.W. Zhang, X. F. Yin, L. Xiao, Y. L. Li, F. L.

- Yuan, J. Dong // Chemical Engineering Journal. – 2021. – V. 418.  
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.129323>
68. Ontong, J.C. Potential of antimicrobial topical gel with synthesized biogenic silver nanoparticle using *Rhodomyrtus tomentosa* leaf extract and silk sericin / J. C. Ontong, S. Singh, O. F. Nwabor, S. Chusri, S. P. Voravuthikunchai // Biotechnology Letters. – 2020. – V. 42, - № 12. – P. 2653–2664.  
<https://doi.org/10.1007/s10529-020-02971-5>
69. Mahmoudi, J. Sericin Alleviates Thermal Stress Induced Anxiety-Like Behavior and Cognitive Impairment Through Regulation of Oxidative Stress, Apoptosis, and Heat-Shock Protein-70 in the Hippocampus / J. Mahmoudi, L. Hosseini, S. Sadigh-Eteghad, F. Farajdokht, S. M. Vatandoust, M. Ziaee // Neurochemical Research. – 2021. – V. 46, - № 9. – P. 2307–2316. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03370-6>
70. Cai, Y. Effect of silk sericin on assembly of hydroxyapatite nanocrystals into enamel prism-like structure / Y. Cai, J. Jin, D. Mei, N. Xia, J. Yao // Journal of Materials Chemistry. – 2009. – V. 19, - № 32. – P. 5751–5758.  
<https://doi.org/10.1039/B901620A>
71. Sasaki, M. Development of a novel serum-free freezing medium for mammalian cells using the silk protein sericin / M. Sasaki, Y. Kato, H. Yamada, S. Terada // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2005. – V. 42, - № 2. – P. 183–188.  
<https://doi.org/10.1042/BA20050019>
72. Purwar, R. Antimicrobial gelatin/sericin/clay films for packaging of hygiene products / R. Purwar, A. Verma, R. Batra // Journal of Polymer Engineering. – 2019. – V. 39, - № 8. – P. 744–751. <https://doi.org/10.1515/polyeng-2018-0406>
73. Belhaj Khalifa, I. Crosslinking of Sericin on air atmospheric plasma treated polyester fabric / I. Belhaj Khalifa, N. Ladhari, B. Nemeshwaree, C. Campagne // Journal of the Textile Institute. – 2017. – V. 108, - № 5. – P. 840–845.  
<https://doi.org/10.1080/00405000.2016.1193983>
74. Яминова, З. А. Исследование технологии приготовления основы с использованием экстракта серицина полученного из отходов шелка / З.А.

- Яминова, О.И. Одинцова, А.Ф. Плеханов, Н.Е. Федорова // Современные инженерные проблемы ключевых отраслей промышленности. Сборник научных трудов Международного научно-технического симпозиума и Международного Косыгинского Форума. – 2019. – С. 178–182.
75. Ганиева, Д.Ф. Исследование природы полимерной композиции на основе поличетвертичных аммониевых солей и серицина / Д.Ф. Ганиева, Р.М. Давлатов // *Universum: технические науки : электрон. научн. журн.* – 2021. – Т. 12, - № 93. URL: <https://7universum.com/ru/tech/archive/item/12881>
76. Purwar, R. Electrospun Sericin/PVA/Clay nanofibrous mats for antimicrobial air filtration mask / R. Purwar, K. S. Goutham, C. M. Srivastava // *Fibers and Polymers.* - 2016. – V. 17, - № 8. – P. 1206–1216. <https://doi.org/10.1007/s12221-016-6345-7>
77. Barcelos da Costa, T. Development of a natural polymeric bioadsorbent based on sericin, alginate and poly(vinyl alcohol) for the recovery of ytterbium from aqueous solutions / T. Barcelos da Costa, M. G. Carlos da Silva, M. G. Adeodato Vieira // *Journal of Cleaner Production.* - 2021. – V. 279. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123555>
78. Khosa, M.A. Metal sericin complexation and ultrafiltration of heavy metals from aqueous solution / M. A. Khosa, S. S. Shah, X. Feng // *Chemical Engineering Journal.* – 2014. – V. 244. – P. 446–456. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2014.01.091>
79. Thongpool, V. Preparation of Thai Silk Sericin/Poly (Vinyl Alcohol) Hybrid Films for Drug Delivery Control: Study on Amoxicillin Trihydrate / V. Thongpool, A. Phunpueok, N. Barnthip, K. Nilgumhang, S. Limsuwan // *Journal Of Applied Sciences Research.* – 2013. – V. 9, № 12. – P. 6189-6192.
80. Соотц, Ю.Н. Применение серицина для формирования оболочки микрокапсул, включающих БАВ / Ю.Н. Соотц, З.А. Яминзода, О.И. Одинцова, А.А. Липина, Л.С. Петрова // *Физика волокнистых материалов: структура, свойства, наукоемкие технологии и материалы (SMARTEX).* – 2022. - № 1. – С. 310–313.

81. Zhao, R. Towards understanding the distribution and tumor targeting of sericin regulated spherical calcium phosphate nanoparticles / R. Zhao, X. Ren, C. Xie, X. Kong // *Microscopy Research and Technique*. – 2017. – V. 80, - № 3. – P. 321–330. <https://doi.org/10.1002/jemt.22800>
82. Wang, F. Fabrication of the FGF1-functionalized sericin hydrogels with cell proliferation activity for biomedical application using genetically engineered *Bombyx mori* (*B. mori*) silk / F. Wang, Y. Wang, C. Tian, S. Xu, R. Wang, R. Hou, W. Chen, P. Zhao, L. Yu, Z. Lu, D. L. Kaplan, Q. Xia // *Acta Biomaterialia*. - 2018. – V. 79. – P. 239–252. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.031>
83. Huang, L. Design and Fabrication of Multifunctional Sericin Nanoparticles for Tumor Targeting and pH-Responsive Subcellular Delivery of Cancer Chemotherapy Drugs / L. Huang, K. Tao, J. Liu, C. Qi, L. Xu, P. Chang, J. Gao, X. Shuai, G. Wang, Z. Wang, L. Wang // *ACS Applied Materials and Interfaces*. – 2016. – V. 8, - № 10. – P. 6577–6585. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b11617>
84. Yalcin, E. Preparation and characterization of novel albumin-sericin nanoparticles as siRNA delivery vehicle for laryngeal cancer treatment / E. Yalcin, G. Kara, E. Celik, F. A. Pinarli, G. Saylam, C. Sucularli, S. Ozturk, E. Yilmaz, O. Bayir, M. H. Korkmaz, E. B. Denkbaz // *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. – 2019. – V. 49, - № 7. – P. 659–670. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1599395>
85. Boyuklieva, R.. Micro- and Nanosized Carriers for Nose-to-Brain Drug Delivery in Neurodegenerative Disorders / R. Boyuklieva, B. Pilicheva // *Biomedicines*. – 2022. – V. 10, - № 7. – P. 1706–1724. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071706>
86. Ayyaril, S.S. Recent progress in micro and nano-encapsulation techniques for environmental applications: A review / S. S. Ayyaril, A. Shanableh, S. Bhattacharjee, M. Rawas-Qalaji, R. Cagliani, A. G. Shabib, M. Imran khan // *Results in Engineering*. – 2023. – V. 18. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2023.101094>

87. Wang, F. Protein composites from silkworm cocoons as versatile biomaterials / F. Wang, C. Guo, Q. Yang, C. Li, P. Zhao, Q. Xia, D. L. Kaplan // *Acta Biomaterialia*. – 2021. – V. 121. – P. 180–192. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.11.037>
88. Wang, Y. Human-derived cytokine functionalized sericin/agarose composite gel material with cell proliferation-promoting activity fabricated using genetically engineered silk for medical application / Y. Wang, F. Wang, R. Wang, C. Tian, X. Hua, P. Zhao, Q. Xia // *Materials and Design*. – 2022. – V. 224. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.111362>
89. Shah, A. The wound healing and antibacterial potential of triple-component nanocomposite (chitosan-silver-sericin) films loaded with moxifloxacin / A. Shah, M. A. Buabeid, El-S. A. Arafa, I. Hussain, L. Li, G. Murtaza // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2019. – V. 564. – P. 22–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.046>
90. Fang, Z. Encapsulation of polyphenols - A review / Z. Fang, B. Bhandaria // *Trends in Food Science and Technology*. – 2010. – V. 21, - № 10. – P. 510–523. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>
91. Банникова, А. В. Научные и практические аспекты создания технологий молочных продуктов с повышенным содержанием белка [Текст]: диссертация на соискание ученой степени доктора технических наук / Банникова Анна Владимировна. – Ставрополь, 2015. – 381 с.
92. Divakaran, D. Preparation and characterization of nanoemulsions encapsulating polyphenol extracts [Text]: thesis submitted to the national dairy research institute, Karnal (deemed university) in partial fulfilment of the requirement for the award of the degree of master of technology in dairying (dairy chemistry) by Divya Divakaran. – Karnal, 2012. – 113 p.
93. Cerro, D. Nanoencapsulation of Food-Grade Bioactive Compounds using a Supercritical Fluid Extraction of Emulsions Process: Effect of operational variables on the properties of nanocapsules and new perspectives / D. Cerro, A. Rojas, A. Torres, C. Villegas, M. J. Galotto, A. Guarda, J. Romero // *Journal*

LWT-Food Science and Technology. – 2023. – V. 184. –37 p.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115115>

94. Лурье, Ю.Ю. Справочник по аналитической химии / Ю.Ю. Лурье. – М.: Химия, 1965. – 390 с.
95. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. –V. 72, № 1-2. – P. 248–254.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
96. Невмержицкая, Ю.Ю. Практикум по физиологии и биохимии растений (белки и ферменты) [Текст]: Учебно-методическое пособие / Ю.Ю. Невмержицкая, О.А. Тимофеева. – Казань: Казанский университет, 2012. – 36 с.
97. Muhidinov, Z.K. Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of different pectins / Z. K. Muhidinov, M. L. Fishman, Kh. Kh. Avloev, M. T. Norova, A. S. Nasriddinov, D. Kh. Khalikov // Polymer Sciences Journal. Series A. – 2010. – V. 52, № 12. – P. 1257-1263.
98. Феденко В.С. Определение белка в растворах по поглощению в ультрафиолетовой области / В.С. Феденко // Химия природных соединений. –1989. – №7. – С. 693-795.
99. Касимова Г.Ф., Бобокалонов Д.Т., Халикова М.Д. Выделение и характеристика зеинов кукурузы, произрастающей в Таджикистане / Г.Ф. Касимова, Д.Т. Бобокалонов, М.Д. Халикова // Изв. АН РТ. – Душанбе, 2007. – №2 (127). – С. 42-50.
100. Muhidinov, Z.K. Structural characterization of pectin obtained by different purification methods / Z.K. Muhidinov, Kh.I. Ikromi, A.S. Jonmurodov, A.S. Nasriddinov, S.R. Usmanova, J.T. Bobokalonov, G.D. Strahan, L.S. Liu // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – V. 183. – P. 2227-2237.

101. Мухидинов, З.К. Молекулярная масса пектинов, полученных в автоклаве / З.К. Мухиддинов, М.Л. Fishman, Р.М. Горшкова, А.С. Насриддинов, Д.Х. Халиков // Химический журнал Казахстана. - Спец. вып. (21). – 2008. – С. 60-65.
102. Muhidinov, Z. K. Physico-chemical characterization of pectin polysaccharides from various sources obtained by steam assisted flash extraction (SAFE) / Z. K. Muhidinov, Kh. Teshae, A. Jonmurodov, D. Khalikov, M. Fishman // Macromolecular Symposia. – 2012. – V. 317-318. - №1. – P. 142-148. <https://doi.org/10.1002/masy.201100108>.
103. Strop P., Brunger A.T. Refractive index-based determination of detergent concentration and its application to the study of membrane proteins / P. Strop, A.T. Brunger // Protein Sci. – 2005. – V. 14, - № 8. – P. 2207–2211. <https://doi.org/10.1110/ps.051543805>
104. Ашуров, А.И. Макромолекулярный состав инулина различного происхождения в концентрированном растворе / А.И. Ашуров, З.У. Шерова, А.С. Насриддинов, С.Р. Усманова, Х.И. Икромии, З.К. Мухидинов // Изв. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2022. – Т. 12. – №2. – С. 279–290. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-2-279-290>.
105. Усманова С.Р. Комплексообразование пектиновых веществ с лактоглобулинами молочной сыворотки [Текст]: дисс... канд. Хим. Наук: 02.00.04/ Усманова Сураё Рахматджановна. – Душанбе, 2015. – 100 с.
106. Shamsara, O. Development of double layered emulsion droplets with pectin/  $\beta$ -lactoglobulin complex for bioactive delivery purposes / O. Shamsara, S. M. Jafari, Z.K. Muhidinov // Journal of Molecular Liquid. – 2017. – V. 243. – P. 144-150. <http://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.08.036>
107. Бобокалонов, Дж.Т. Фармакокинетика новых лекарственных форм пироксикама: дисс. на соискание уч. степени канд. Биол. Наук / Бобокалонов Джашед Т. – 2011. - 100 с.
108. Singleton, V. L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent / V. L. Singleton, R. Orthofer,

- R. M. Lamuela-Raventos // *Methods in Enzymology*. – 1999. – V. 299. – P. 152-178.
109. Bobokalonov, J.T. Phenolic composition of Propolis growing in three different region of Tajikistan / J.T. Bobokalonov, A.S. Jonmurodov, S.R. Usmanova, O.I. Shomirzoeva, Z.K. Muhidinov, L.S. Liu // *Abstract of the 6th International Symposium on Edible & Medical Plant Resources and Bioactive Ingredients*, 14-17 Oct 2018, Nanjing, China. – P. 16-17.
110. Marinova, G. Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH / G. Marinova, V. Batchvarov // *Bulg. J. Agric. Sci.* – 2011. – V. 17, - № 1. – P. 11–24.
111. Khire, T.S. The fractal self-assembly of the silk protein sericin / T.S. Khire, J. Kundu, S.C. Kundu, V.K. Yadavalli // *Soft Matter*. – 2010. – V. 6, №9. – P. 2066-2071. <https://doi.org/10.1039/B924530H>
112. Yang, Y. Recovery of Silk Sericin from Soap-Alkaline Degumming Solution / Y. Yang, S.M. Lee, H.S. Lee, K.H. Lee // *Int. J. Ind. Entomol.* – 2013. – V. 27. – P. 203–208. <https://doi.org/10.7852/ijie.2013.27.1.203>
113. Srinivas, N. Extraction & characterization of sericin and its immobilization on hydroxylapatite nanoparticles for tissue engineering applications / N. Srinivas, R. Kumar, N. Merchant, D. Subramanya, D. Pruthvika, P. Jain, L. Mariappan, R. Rao, M. Rajyalakshmi // *International Journal of ChemTech Research*. – 2014. – V. 7(5). – P. 2117-2124.
114. Belhaj Khalifa, I. Application of sericin to modify textile supports / I. Belhaj Khalifa, N. Ladhari, M. Touay // *J. Text. Inst.* – 2011. – V. 103(4). – P. 370-377. <https://doi.org/10.1080/00405000.2011.580539>
115. Tarangini, K. Application of sericin-based edible coating material for postharvest shelf-life extension and preservation of tomatoes / K. Tarangini. P. Kavi. K. Jagajjanani Rao // *eFood*. – 2022. – V. 3. – 11 pages. <https://doi.org/10.1002/efd2.36>

116. Seo, S.J. Silk Sericin Protein Materials: Characteristics and Applications in Food-Sector Industries / S.J. Seo, G. Das, H.S. Shin, J.K. Patra // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – V. 24. – P. 4951 - 4978. <https://doi.org/10.3390/ijms24054951>.
117. Silva, A.S. Silk Sericin: A Promising Sustainable Biomaterial for Biomedical and Pharmaceutical Applications / A.S. Silva, E.C. Costa, S. Reis, C. Spencer, R.C. Calhelha, S.P. Miguel, M.P. Ribeiro, L. Barros, J.A. Vaz, P. Coutinho // *Polymers.* – 2022. – V. 14. – P. 4931-4953. <https://doi.org/10.3390/polym14224931>
118. Tsukada, M. Conformation of liquid silk sericin / M. Tsukada, T. Komoto, T. Kawai // *Polymer Journal.* – 1979. – V. 11. – P. 503–505.
119. Dash, R. Isolation, purification and characterization of silk protein sericin from cocoon peduncles of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* / R. Dash, S. Mukherjee, S.C. Kundu // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2006. – V. 38. – P. 255–258. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.03.001>.
120. Gupta, D. Extraction and characterization of silk sericin / D. Gupta, A. Agrawal, A. Rangi // *Indian Journal of Fibre and Textile Research.* – 2014. – V. 39. – P. 364-372.
121. Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins / A. Barth // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2007. – V. 1767(9). – P.1073–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>.
122. Fabian, H. Infrared Spectroscopy of Protein / H. Fabian, W. Mantele // *Biochemical Application.* John Wiley and Sons Ltd. – 2002. – P. 3399-3425. <https://doi.org/10.1002/0470027320.s8201>
123. Brauner, J.W. A quantitative reconstruction of the Amide I contour in the IR spectra of globular proteins: from structure to spectrum / J.W. Brauner, C.R. Flach, R. Mendelsohn // *Journal of the American Chemical Society.* – 2005. – V. 127. – P. 100–109. <https://doi.org/10.1021/ja0400685>
124. Chlapanidas, T. Sericins exhibit ROS-scavenging, anti-tyrosinase, anti-elastase, and in vitro immunomodulatory activities / T. Chlapanidas, S. Farago, G. Lucconi, S. Perteghella, M. Galuzzi, M. Mantelli, M.A. Avanzini, M.C. Tosca, M. Marazzi, D. Vigo, M.L. Torre, M. Faustini // [International Journal of Biological](#)

[Macromolecules](#). – 2013. – V. 58. – P. 47–56.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.054>

125. Saha, J. Extraction, Structural and Functional Properties of Silk Sericin Biopolymer from *Bombyx mori* Silk Cocoon Waste / J. Saha, I.H. Mondal, R.K. Sheikh, A. Habib // J. Text. Sci. Eng. – 2019. – V. 9(1). – P. 390-394.  
<https://dx.doi.org/10.4172/2165-8064.1000390>
126. Lizuka, E. Silk sericin of *Bombyx mori* L / E. Lizuka // Biochem. Biophys. Acta. – 1969. – V. 181. – P. 477-479.
127. Kim, M.K. Effect of lyoprotectant on the solubility and structure of silk sericin / M.K. Kim, H.W. Kwak, J.Y. Lee, H. Yun, M.H. Kim, K.H. Lee // International Journal of Industrial Entomology. – 2012. – V. 25(1). – P. 133-137.  
<https://dx.doi.org/10.7852/ijie.2012.25.1.133>
128. Song, Y. Preparation and Characterization of Graft Copolymers of Silk Sericin and Methyl Methacrylate / Y. Song, D. Wei // Polymers and Polymer Composites. – 2006. – V. 14. – P. 169–174. <https://doi.org/10.1177/096739110601400206>
129. Teramoto, H. Analysis of structural properties and formation of sericin fiber by infrared spectroscopy / H. Teramoto, M. Miyazawa // J. Insect Biotechnol. Sericology. – 2003. – V. 72. – P. 157–162.
130. Fedic, R. The silk of Lepidoptera / R. Fedic, M. Zurovec, F. Sehnal // J. Insect Biotechnol. Sericology. – 2002. – 71. – P. 1–15.
131. Costa, F. Fibrous protein- based biomaterials (silk, keratin, elastin, and resilin proteins) for tissue regeneration and repair / F. Costa, R. Silva, A. Boccaccini // Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair. – 2018. – P. 175–204. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100803-4.00007-3>
132. Su, D. *Bombyx mori* silk-based materials with implication in skin repair: Sericin versus regenerated silk fibroin / D. Su, S. Ding, W. Shi, X. Huang, L. Jiang // Journal of Biomaterials Applications. – 2019. – V. 34(1). – P. 36-46.  
<https://doi.org/10.1177/0885328219844978>.
133. Inoue, S. Nanostructure of natural fibrous protein: in vitro nanofabric formation of *Samia cynthia ricini* wild silk fibroin by self- assembling / S. Inoue, H. Tsuda,

- T. Tanaka // Nano Letters. – 2003. – V. 3. -№ 10. – P. 1329–1332.  
<https://doi.org/10.1021/nl0340327>.
134. Villar-Piqué, A. Molecular and clinical aspects of protein aggregation assays in neurodegenerative Diseases / A. Villar-Piqué, M. Schmitz, N. Candelise, S. Ventura, F. Llorens, I. Zerr // Molecular Neurobiology. – 2018. – V. 55. – P. 7588–7605. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0926-y>.
135. Das, G. Sericin based nanoformulations: a comprehensive review on molecular mechanisms of interaction with organisms to biological applications / G. Das, H.S. Shin, E.V.R. Campos, L.F. Fraceto, M. P. Rodriguez- Torres, K.C.F. Mariano, D.R. Araujo, F. Fernández-Luqueño, R. Grillo, J.K. Patra // Journal of Nanobiotechnology. – 2021. – V. 19. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00774-y>.
136. Насриддинов, А.С. Самоагрегирующие свойства инулина в разбавленном растворе / А. С. Насриддинов, А. И. Ашуров, Ш. Ё. Холов, И.Б. Исмоилов, С.Р. Усманова, З.К. Мухидинов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2022. – Т. 12. - № 1. – С. 38–49.  
<https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-1-38-49>.
137. Ghosh, S. Sericin, a dietary additive: Mini review / S. Ghosh, R.S. Rao, K.S. Nambiar, V.C. Haragannavar, D. Augustine, S.V. Sowmya // J. Med. Radiol. Pathol. Surg. – 2019. – V. 6. – P. 4–8. <https://dx.doi.org/10.15713/ins.jmrps.89>
138. Zhang, Y.-Q. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials / Y.-Q. Zhang // Biotechnol. Adv. – 2002. – V. 20. – P. 91–100.  
[https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00003-4](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00003-4)
139. Fatahian, R. A critical review on application of silk sericin and its mechanical properties in various industries / R. Fatahian, A. Fatahian, E. Fatahian, H. Fatahian // Journal of Research and Applications in Mechanical Engineering (JRAME). – 2021. – V. 9. – P. 1-11. <https://doi.org/10.14456/jrame.2021.19>.
140. Some, D. Characterization of proteins by size-exclusion chromatography coupled to multi-angle light scattering (SEC-MALS) / D. Some, H. Amartely, A. Tsadok,

- M. Lebediker // Journal of Visualized Experiments. – 2019. – V. 148. – P. e59615. <https://doi.org/10.3791/59615>.
141. Advanced Drug Delivery Systems Market - Growth, Trends, and Forecast (2019 – 2027), Aug. 29. – 2022. (<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/advanced-drug-delivery-systems-market>)
142. Nguyen, J. Emerging Voices in Drug Delivery – Breaking Barriers (Issue 1) / J. Nguyen, S.C. Owen // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2024. – V. 208. – P. 115273. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2024.115273>.
143. Wen, P. Stealth and pseudo-stealth nanocarriers / P. Wen, W. Ke, A. Dirisala, K. Toh, M. Tanaka, J. Li // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2023. – V. 198. – P. 114895. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114895>
144. Mittal, N. Role of Novel Drug Delivery Systems in Coronavirus Disease-2019 (COVID-19): Time to Act Now / N. Mittal, V. Garg, S.K. Bhadada, O.P. Katare // Current Drug Delivery. – 2021. – V. 18(3). – P. 289-296. <https://doi.org/10.2174/1567201817666200916090710>.
145. Chowdhury, N.K. Nanoparticles as an effective drug delivery system in COVID-19 / N.K. Chowdhury, Deepika, R. Choudhury, G.A. Sonawane, S. Mavinamar, X. Lyu, R.P. Pandey, C.M. Chang // Biomed Pharmacother. – 2021. – V. 143. – P. 112162. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112162>
146. Barclay, T.G. Review of polysaccharide particle-based functional drug delivery / T.G. Barclay, C.M. Day, N. Petrovsky, S. Garg // Carbohydrate polymers. – 2019. – V. 221. – P. 94-112. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.067>
147. McClements, D.J. Advances in nanoparticle and microparticle delivery systems for increasing the dispersibility, stability, and bioactivity of phytochemicals / D.J. McClements // Biotechnology Advances. – 2020. – V. 38. – P. 107287. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.08.004>.
148. Chintapula, U. A novel nanocomposite drug delivery system for SARS-CoV-2 infections / U. Chintapula, Sh.Ul. Karim, P.R. Iyer, H. Asokan-Sheeja, B. Neupane, F. Nazneen, H. Dong, F. Bai, K.T. Nguyen // Nanoscale Adv. – 2024. – V. 6. – P. 3747-3758. <https://doi.org/10.1039/d4na00361f>.

149. Aldaais, E.A. A comprehensive review on the COVID-19 vaccine and drug delivery applications of interpenetrating polymer networks / E.A. Aldaais // *Drug Delivery and Translational Research*. – 2023. – V. 13. – P. 738–756. <https://doi.org/10.1007/s13346-022-01254-y>.
150. Rice-Ficht, A.C. Polymeric particles in vaccine delivery / A.C. Rice-Ficht, A.M. Arenas-Gamboa, M.M. Kahl-McDonagh, T.A. Ficht // *Current Opinion in Microbiology* – 2010. – V. 13(1). – P. 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.12.001>
151. Guo, W. Sericin Nanomicelles with Enhanced Cellular Uptake and pH-Triggered Release of Doxorubicin Reverse Cancer Drug Resistance / W. Guo, L. Deng, J. Yu, Z. Chen, Y. Woo, H. Liu, T. Li, T. Lin, H. Chen, M. Zhao, L. Zhang, G. Lia, Y. Hu // *Drug Deliv.* – 2018. – V. 25. – P. 1103–1116. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1469686>
152. Gagliardi, A. Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors / A. Gagliardi, E. Giuliano, E. Venkateswararao, M. Fresta, S. Bulotta, V. Awasthi, D. Cosco // *Frontiers in Pharmacology*. – 2021. – V. 12. – P. 601–626. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.601626>
153. Cazón, P. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review / P. Cazón, G. Velazquez, J.A. Ramírez, M. Vázquez // *Food Hydrocoll.* – 2017. – V. 68. – P. 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.009>
154. Mohamed, S.A.A. Polysaccharides, protein and lipid-based natural edible films in food packaging: A review / S.A.A. Mohamed, M. El-Sakhawy, M.A.M. El-Sakhawy // *Carbohydr. Polym.* – 2020. – V. 238. – P. 116178. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116178>
155. Devi, N. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates / N. Devi, M. Sarmah, B. Khatun, T.K. Maji // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2017. – V. 239. – P.136–145. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.05.009>
156. Rahman, S. Guar gum-chitosan composite film as excellent material for packaging application / S. Rahman, A. Konwar, G. Majumdar, D. Chowdhury //

- Carbohydr. Polym. Technol. Appl. – 2021. – V. 2. – P. 100158.  
<https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100158>
157. Chevalier, L.M. Study of the interactions between pectin in a blueberry puree and whey proteins: Functionality and application / L.M. Chevalier, L. Rioux, P. Angers, S.L. Turgeon // Food Hydrocolloids. – 2019. – V. 87. – P. 61-70.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.038>
158. Мухидинов, З.К. Пектин – основа для создания функциональной пищи / З.К. Мухидинов, Д.Т. Бобокалонов, С.Р. Усманова. - Душанбе, ООО «Сифат-Офсет», 2019. – 192 с.
159. Shamsara O. Fabrication, characterization and stability of oil in water nano-emulsion produced by apricot gum-pectin complex / O. Shamsara, S.M. Jafari, Z.K. Muhidinov // International Journal of Biological Macromolecules. – 2017. – V. 103. – P. 1285-1293. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.164>.
160. Wang, Y. Application of proteins in edible inks for 3D food printing: A review / Y. Wang, D.J. McClements, C. Bai, X. Xu, Q. Sun, B. Jiao, S. Miao, Q. Wang, L. Dai // Trends in Food Science & Technology. – 2024. – V. 153. – P. 104691.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104691>
161. Патент ТҶ 563 Флэш способ производства пектина из растительного сырья / Мухидинов З.К., Тешаев Х.И., Джонмуродов А.С., Лиу Л.С. – НПИЦентр РТ, 2011. Блю. № 3 (11).
162. Bobokalonov, J.T. Phenolic composition of Propolis growing in three different region of Tajikistan / J.T. Bobokalonov, A.S. Jonmurodov, S.R. Usmanova, O.I. Shomirzoeva, Z.K. Muhidinov, L.S. Liu // Abstract of the 6th International Symposium on Edible & Medical Plant Resources and Bioactive Ingredients, 14-17 Oct 2018, Nanjing, China. – 2018. – P.16-17.
163. Шарифова З.Б. Характеристика микрокапсул, полученных на основе яблочного пектина и лактоглобулинов молочной сыворотки / З.Б. Шарифова, С.Р. Усманова, З.К. Мухиддинов, Д.Т. Бобокалонов, Р.М. Горшкова, Д.Х. Халиков, Л.Ш. Лиу // Известия АН РТ. – 2009. – Т. 2. - № 135. – С. 72–78.

164. Мухидинов, З.К. Микрокапсулы на основе цитрусовых пектинов и лактоглобулина молочной сыворотки / З.К. Мухидинов, С.Р. Усманова, З.Б. Шарифова, Д.Т. Бобокалонов, Д.Х. Халиков, Л.Ш. Лиу // Известия АН РТ. – 2010. – Т. 2. - № 139. – С. 68–74.
165. Matalanis, A. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds / A. Matalanis, O.G. Jones, D.J. McClements // Food Hydrocoll. – 2011. – V. 25. - № 8. – P. 1865–1880. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.04.014>
166. Tolstoguzov, V. Thermodynamic aspects of biopolymer functionality in biological systems, foods, and beverages / V. Tolstoguzov // Crit. Rev. Biotechnol. – 2002. – V. 22. - № 2. – P. 89–174. <https://doi.org/10.1080/07388550290789478>
167. McClements, D.J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components / D.J. McClements, E.A. Decker, J. Weiss // J. Food Sci. – 2007. – V. 72. – №8. – P. R109–R124. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x>
168. Dickinson, E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers / E. Dickinson // Food Hydrocoll. – 2009. – V. 23 – №6. – P. 1473–1482. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.08.005>
169. Мухидинов, З.К. Перспективы изучения прополиса в Таджикистане / З.К. Мухидинов, С.Р. Усманова, Ф.Ю. Носирова // Вестник Авиценны. – 2017. – Т. 19. – № 3. – С. 413-421.
170. Gupta, D. Methods for determination of antioxidant capacity: a review / D. Gupta // Intern. J. of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2015. – V. 6(2). – P. 546-566. [https://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(2\).546-66](https://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(2).546-66)
171. Пристом, А.М. Оксидативный стресс и сердечнососудистые заболевания. Часть 1. / А.М. Пристом, М. Бенхамед // Лечебное дело: научно-практический терапевтический журнал. – 2012. – Т. 1. - № 23. – С. 21-28.
172. Меньщикова, Е.В. Фенольные антиоксиданты в биологии и медицине. Строение, свойства, механизмы действия / Е.В. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.В. Кандалинцева // LAP. – 2012. – 495 с.

## Список публикаций по теме диссертации:

### I. Статьи в журналах, индексируемые в международной базе данных (*Web of Science* и *Scopus* и иностранные издания)

[1-A] Шерова З.У. Эмульсионные микро- и нанокапсулы в системе LgC/пектин с эфирным маслом лаванды *Lavandula angustifolia*, стабилизированные ультразвуком / Ш.Р. Алиева, Г.А. Кодирова, З.У. Шерова, С.Р. Усманова, З.К. Мухидинов. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. - 2024. - Т.14, № 4, - С. 482-494. <https://doi.org/10.21285/achb.944>

[2-A] Sherova Z. U. A new approach to the treatment of acute infection diseases with antibiotic-pectin formulae / Z. K. Muhidinov, J.T. Bobokalonov, R. S. Kimatov, E. R. Rahmonov, G. I. Komilova, Z. U. Sherova, L. S. Liu // The Journal of Infection in Developing Countries. -2024. – V. 18, - №3. - P. 407-419. DOI: <https://doi.org/10.3855/jidc.18473>

[3-A] Шерова З.У. Молекулярная масса и молекулярно-массовое распределение белка серицина, экстрагированного из отходов коконов *Bombyx mori* / З.У. Шерова, А.С.Насриддинов, Ш.Ё.Холов, С.Р. Усманова, З.К. Мухидинов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. - 2022. - Т. 12. - № 4. - С. 547–556. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-4-547-556> .

[4-A] Шерова З.У. Макромолекулярный состав инулина различного происхождения в концентрированном растворе / А.И. Ашуров, З.У. Шерова, А.С. Насриддинов, С.Р. Усманова, Х.И. Икромии, З. К. Мухидинов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. - 2022. - Т. 12. № 2. - С. 279–290. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-2-279-290>

### II. Статьи, опубликованные в других изданиях, рекомендуемых ВАК при Президенте Республики Таджикистан

[5-A] Шерова З.У. Антиоксидантная активность эмульсионных микрокапсул, содержащих полифенольные соединения из прополиса / З. У. Шерова, Шабнами Хуршед, Б. С. Ёрова, С. Р. Усманова, Х. И. Икромии, З. К. Мухидинов // Вестник Технологического университета Таджикистана. - 2024. - № 4 (59). - С. 80-88.

**[6-А] Шерова З.У.** Изучение структуры образцов серицина из коконов тутового шелкопряда (*Bombyx mori*), экстрагированные при различных условиях методом ИК-Фурье спектроскопии / З. У. Шерова, Шабнами Хуршед, А. И. Ашуров // Вестник Филиала Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова в городе Душанбе. – 2024. – Т. 1. - № 4(43). – С. 67-79.

**[7-А] Шерова З.У.** Макромолекулярный состав серицина коконов шелкопряда (*Bombyx mori*) в концентрированном растворе / З.У. Шерова, С.Р. Усманова, З.К. Мухидинов // Вестник Филиала Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова в городе Душанбе. – 2024. – Т. 1. - № 3(41). – С. 99-110.

**[8-А] Шерова З.У.** Влияние соотношения биополимеров на стабильность эмульсионных макрокапсул пектина и лактоглобулина молочной сыворотки / З. У. Шерова, М. А. Олимов, С. Р. Усманова, З. К. Мухидинов // Вестник Филиала Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова в городе Душанбе. - 2023. - Т. 1. - № 3 (33). - С. 66-75.

**[9-А] Шерова З.У.** Эмульсионные нано- и макрокапсулы эфирного масла лаванды / Ш.Р. Алиева, З.У. Шерова, С.Р. Усманова, З.К. Мухидинов // Вестник филиала МГУ имени М. В. Ломоносова в городе Душанбе. - 2023. - Т. 1. - № 1 (29). - С. 84-92.

**[10-А] Шерова З.У.** Пищевые консерванты на основе эфирные масла растений Таджикистана / Ш. Р. Алиева, З. У. Шерова, А. С. Джонмуродов, З. К. Мухидинов // Вестник Технологического университета Таджикистана. - 2022. - № 4-2 (51). - С. 10-15.

**[11-А] Шерова З.У.** Инкапсулирование эфирного масла *THYMUS VULGARIS*, произрастающего в Таджикистане, эмульсионным способом / С. Р. Усманова, З. У. Шерова, А. С. Джонмуродов, З. К. Мухидинов // Актуальная биотехнология. - 2020. - № 3 (34). - С. 618-621.

**[12-А] Шерова З.У.** Сравнительный анализ серицина, экстрагированного водным и солевым растворами / З. У. Шерова, А. Б. Ишматов, А. С. Джонмуродов, С. Р. Усманова, З. К. Мухидинов // Доклады АНРТ. - 2018. - Т. 61. - № 1. - С. 54-58.

**[13-А] Шерова З.У.** Изучение полифенольных соединений корнеклубней Эремурса Гиссарского (*E Hissaricus*) методом капиллярного зонного электрофореза / Д. Т. Бобокалонов, С. Р. Усманова, И. Б. Исмоилов, З. У. Шерова // Актуальная биотехнология. - 2018. - № 3 (26). - С. 274-278.

### **III. Патенты на изобретения**

**[14-А] Шерова З.У.** Патент ТЈ 1570 Республики Таджикистан. Способы выделения серицина из отходов коконов тутового шелкопряда / З. К. Мухидинов, З. У. Шерова, С. Р. Усманова, Д. Т. Бобокалонов, А. И. Ашуров. – НПИЦентр РТ, 2024. Блю. № 215.

### **IV. Список работ в материалах международных конференций**

**[15-А] Шерова З.У.** Состав полифенольных соединений образца прополиса методом капиллярного зонного электрофореза / З.У. Шерова, Дж. Т. Бобокалонов, С.Р. Усманова, З.К. Мухидинов // Сборник материалов III Международной научной конференции «Инновационное развитие науки», 12 октября 2024 г., г. Душанбе, Республика Таджикистан. - С. 14-16.

**[16-А] Шерова З.У.** Макромолекулярный состав белка серицина, экстрагированного из отходов коконов тутового шелкопряда (*Bombix mori*) / З. У. Шерова, Ш. Ё.Холов, З. К. Мухидинов // Сборник статей VI международной научной конференции: «Вопросы физической и координационной химии», - Душанбе, 2024. - С. 122-127.

**[17-А] Шерова З.У.** Инкапсулирование полифенольных соединений из корок граната / З. У. Шерова, Ш. Хуршед, С. Р. Усманова, З. К. Мухидинов // Материалы XIII Национальной научно-практической конференции с международным участием «Технологии и продукты здорового питания». - Саратов: Вавиловский университет, 2024 г. - С. 372-376.

**[18-А] Sherova Z.U.** Microencapsulation of bioactive compounds for the creation of functional foods / Z. U. Sherova, Kh. Ikromi, J. T. Bobokalonov, Z. K. Muhidinov

// 31st International Conference of FFC, September 29- October 1st, 2023. - Yerevan, Armenia, 2023. - P. 281-282.

**[19-A] Шерова З.У.** Молекулярная масса и конформационные изменения макромолекулы серицина в растворе / З. У. Шерова, С. Р. Усманова, И. Б. Исмоилов, Д. Х. Холиков, З. К. Мухидинов // Материалы международной научно-практической конференции на тему «Современные проблемы физики и химии полимеров», 10 октября 2023 года. – Душанбе, 2023. – С. 22-25.

**[20-A] Sherova Z.U.** Macro- and nanocapsules of essential oil in the protein/pectin system stabilized by ultrasound / Sh. R. Alieva, G. A. Kodirova, J. T. Bobokalonov, Z. U. Sherova, Z. K. Muhidinov // ACS Fall 2023, August 13-17, 2023, in San Francisco, CA., USA. [www.acs.org/meetings](http://www.acs.org/meetings).

**[21-A] Шерова З.У.** Эмульсионные макрокапсулы серицин-пектин для систем доставки лекарственных веществ и пищевых ингредиентов / З. У. Шерова, С. Р. Усманова, З. К. Мухидинов // III Международная научно-практическая конференция «Медико-биологические и нутрициологические аспекты здоровьесберегающих технологий», 28 апреля 2023г. – Кемерово, 2023. – С. 25-29.

**[22-A] Шерова З.У.** Антиоксидантная активность эмульсионных нано- и макрокапсул эфирных масел / Ш. Р. Алиева, З. У. Шерова, С. Р. Усманова, Г. С. Кодирова, Ф. С. Шаропов, З. К. Мухидинов // Материалы международной научно-практической конференции «XIII Ломоносовские чтения», посвященной 115-летию академика Бободжона Гафурова (28-29 апреля 2023 года). Часть III. Естественные науки. – Душанбе, 2023. - С.134-139.

**[23-A] Шерова З.У.** Эмульсионные нано- и микрокапсулы эфирных масел стабилизированных лактоглобулином молочной сыворотки и яблочным пектином / Ш. Р. Алиева, Г. А. Кодирова, З.У. Шерова, С. Р. Усманова, З. К. Мухидинов // Материалы международной научно-технической конференции молодых ученых «Инновационные материалы и технологии – 2023», 21-23 марта 2023 года. - Минск, Республика Беларусь, 2023. - С. 152-156.

**[24-А] Шерова З.У.** Эмульсионные нано- и макрокапсулы серицин-пектин как система доставки биологически активных веществ / З. У. Шерова, С. Р. Усманова, З. К. Мухидинов // Мат.научно-практической конференции с международным участием «Достижения и проблемы фундаментальной науки и клинической медицины», пос.30-летию Государственной независимости Республики Таджикистана «Годам развития села, туризма и народных ремёсел (2019-2021)», ТГМУ им. Абуали ибни Сино.- Душанбе, 2021г. - С. 679.

**[25-А] Шерова З.У.** Профилактические продукты на основе пектина / З. У. Шерова, Ш. Р. Алиева, С. Р. Усманова // Сборник статей, докладов и материалов II-ой Международной научно-практической конференции «Роль женщин-ученых в развитии науки, инноваций и технологий», 16.08.2021 -20.08.2021, г. Гулстан. - С. 188-194.

**[26-А] Шерова З.У.** Количественное изучение комплекса белков молочной сыворотки и яблочного пектина методом капиллярного электрофореза / С. Р. Усманова, З. У. Шерова, А. С. Джонмуродов, Дж. Т. Бобокалонов, З. К. Мухидинов // Тезисы докладов участников Международной конференции «Физико-химическая биология как основа современной медицины», 21 мая 2021г. – Минск, 2021. - С. 306- 307.

**[27-А] Шерова З.У.** Микрокапсулы на основе белка серицина и яблочного пектина с антиоксидантной активностью / З. У. Шерова, С. Р. Усманова, Ш. Р. Алиева, З. К. Мухидинов // Сборник статей XII Национальной научно-практической конференции с международным участием «Технологии и продукты здорового питания» / Под общей ред. Неповинных Н.В., Поповой О.М., Фатьянова Е.В. – Саратов: СГАУ. - 2021. - С. 802-809.

**[28-А] Шерова З.У.** Микрокапсулирование полифенольных соединений на основе серицина и пектина / З. У. Шерова, С. Р. Усманова, З. К. Мухидинов // Физико-химическая биология как основа современной медицины. Тезисы докладов участников Республиканской конференции с международным участием, 29 мая 2020г. - Минск, 2020. - С. 236- 237.

[29-A] Sherova Z.U. Physicochemical characteristics of sericin extracted by water and alkaline solutions / Z. U. Sherova, A. B. Ishmatov, Z. K. Mukhidinov // XII International Symposium "Actual problems of chemistry, biology and technology of natural compounds", September 7-8, 2017. - Tashkent, 2017. - P.265.

#### V. Список работ в материалах республиканских конференций

[30-A] Шерова З.У. Выделение белка серицина из коконов тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) / З. У. Шерова, А. И. Ашуров, С. Р. Усманова, З. К. Мухидинов // Материалы XIX Нумановские чтения «Развитие фундаментальной и прикладной химии и её вклад в индустриализацию страны», Душанбе, 16-октября 2024 г.– Душанбе, 2024. - С.238-243.

[31-A] Шерова З.У. Нано- и макрокапсулы на основе серицина/пектина / З. У. Шерова, С. Р. Усманова, З. К. Мухидинов // Материалы XVI Нумановские чтения «Достижение химической науки за 30 лет государственной независимости Республики Таджикистан», 27-октябрь 2021 г. – Душанбе, 2021. - С.121-124.

[32-A] Шерова З.У. Эмульсионные нано- и микрокапсулы на основе низкометилированного пектина и лактоглабулина / С. Р. Усманова, З. У. Шерова, Д. Т. Бобокалонов, З. К. Мухидинов // Материалы XV Нумановские чтения «Современное состояние химической науки и использование ее достижений в народном хозяйстве Республики Таджикистан», 24-октябрь 2019 г. – Душанбе, 2019. - С.114-116.

[33-A] Шерова З.У. Сравнительный анализ выхода серицина из коконных оболочек при различных условиях экстракции / З. У. Шерова, А. С. Джонмуродов, С. Р. Усманова, А. Б. Ишматов, З. К. Мухидинов // Материалы XIV Нумановские чтения, «Вклад молодых ученых в развитие химической науки», 22-ноября 2017 г.- Душанбе, 2017. - С.153-155.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

ҶУМҲУРИИ  
ТОҶИКИСТОН



ИДОРАИ  
ПАТЕНТӢ

# ШАҲОДАТНОМА

Шахрванд Шерова З.У.

муаллифи ихтирои *Тарзи ҷудокунии серитсин аз партовҳои пиллаи  
абрешим*

Ба ихтирои нахустпатенти № Т.Ҷ 1570 дода шудааст.

Дорандаи Институти кимиёи ба номи В.И. Никитини Академияи  
нахустпатент миллии илмҳои Тоҷикистон

Сарзамин Ҷумҳурии Тоҷикистон  
Ҳаммуаллиф(он) Мухидинов З.К., Усманова С.Р., Бобокалонов Ҷ.Т.,  
Ашуров А.И.

Аввалияти ихтирои 25.09.2024

Таърихи рӯзи пешниҳоди ариза 25.09.2024

Аризаи № 2401999

Дар Феҳристи давлатии ихтироҳои Ҷумҳурии Тоҷикистон

30 декабри с. 2024 ба қайд гирифта шуд

Нахустпатент  
этибор дорад аз 25 сентябри с. 2024 то 25 сентябри 2034с.

Ин шаҳодатнома ҳангоми амали гардонидани ҳуқуқи  
имтиёзхое, ки барои муаллифони ихтироот бо конулузории  
ҷорӣ муқаррар гардидаанд, нишон дода мешавад

ДИРЕКТОР

Исмоилзода М.Х.

