

## Секция: Пищевая и сельскохозяйственная биотехнология

УДК 66.017.2:577.15.08:547.458.8

DOI: <http://doi.org/10.20914/2304-4691-2025-3-24-26>

### ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ФЕРУЛОВОЙ КИСЛОТОЙ ХИТОЗАНА ПРИ УЧАСТИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДВУХДОМЕННОЙ ЛАККАЗЫ SCASL

А.Р. Дмитрук, О.Н. Понаморева

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия

В последние годы особое внимание уделяется разработке новых материалов, которые могут сочетать биосовместимость, биоразлагаемость и функциональные свойства для применения в медицине и пищевой промышленности. Хитозан — природный полисахарид, благодаря способности удерживать воду, представляет интерес для получения гидрогелевых покрытий с антимикробными свойствами. Однако для того, чтобы гидрогели хитозана обладали необходимыми потребительскими характеристиками, требуется их модификация.

Перспективным направлением является использование ферментативной модификации с помощью лакказ — медьсодержащих ферментов, встречающихся у бактерий, грибов, растений. Эти ферменты способны окислять широкий спектр фенольных соединений с образованием феноксильных радикалов, которые участвуют в реакциях кросс-сшивки с биополимерами. Особый интерес представляет окисление лакказами феруловой кислоты (3-метокси-4-гидроксикоричная кислота), которая является компонентом клеточных стенок растений, проявляет антиоксидантные свойства и участвует в образовании природных кросс-сшивок. Процессы при участии биополимеров, феруловой кислоты и лакказы нашли применение для разработки антиоксидантных и антибактериальных материалов для практического применения в пищевой промышленности и медицине [1].

Обычно для модификации полимеров путем их кросс-сшивки, в частности, хитозана, используют грибную лакказу, проявляющую наибольшую активность при окислении фенольных субстратов в кислой среде (рН 4.5). В этих условиях количество реакционноспособных аминогрупп хитозана снижено из-за протонирования, в следствии чего степень сшивки получаемого гидрогеля недостаточно высока. Бактериальные лакказы, в отличие от грибных, способны окислять фенольные субстраты в нейтральной и слабощелочной среде (оптимум рН 7-9). Использование этих оксидаз для модификации хитозана в нейтральной среде позволит значительно увеличить количество непротонированных аминогрупп, способных участвовать в нуклеофильных реакциях кросс-сшивки, что обеспечит более высокую степень сшивки биополимера.

Целью настоящего исследования является оценить перспективы применения бактериальных лакказ для модификации хитозана ФК и подобрать условия модификации феруловой кислотой для получения формоустойчивых гидрогелей как потенциальных покрытий для заживления ран и для разработки пищевых упаковочных материалов.

В работе использовали хитозан высокой степени очистки (BLDpharm, степень деацетилирования  $\geq 95\%$ ), феруловую кислоту (Sigma-Aldrich, чистота 99%), буферные растворы Tris-HCl (рН 4.5–9.0; 50 ммоль/дм<sup>3</sup>) и Бриттона–Робинсона (рН 10.0–11.0; 50 ммоль/дм<sup>3</sup>). Для растворения хитозана использовали 1%-ный раствор уксусной кислоты (СН<sub>3</sub>СООН). Все реактивы имели степень чистоты хч и применялись без дополнительной очистки. В работе использовали рекомбинантную бактериальную двухдоменную лакказу *Streptomyces carpinensis* ВКМ Ас-1300 (ScaSL), которая ранее была выделена и охарактеризована Трубициной Л.И. с коллегами [2] и любезно предоставлена для исследований. В работе использовали раствор фермента с содержанием белка 5 г/л и удельной активностью 17 ед/мг белка. За единицу активности (ед) принимали количество 2,2'-азинобис(3-этил- бензотиазолин сульфоната) (АБТС), окисленного ферментативным препаратом за одну минуту при рН 4,5 и комнатной температуре.

Влияние pH среды на модификацию хитозана феруловой кислотой под действием лакказы ScaSL определяли визуально по увеличению вязкости геля при pH от 4.5 до 9.0. Гель, полученный в нейтральной среде (pH 7.0), обладал формоустойчивостью, по сравнению с другими образцами. В свою очередь, в щелочной среде (pH > 8) наблюдается коагуляция хитозанового геля, вызванная снижением растворимости хитозана за счёт депротонирования аминогрупп. Это приводит к образованию агрегатов и неоднородной структуре материала. В кислой среде реакция кросс-сшивки не протекала из-за протонирования аминогрупп хитозана (рисунок 1).

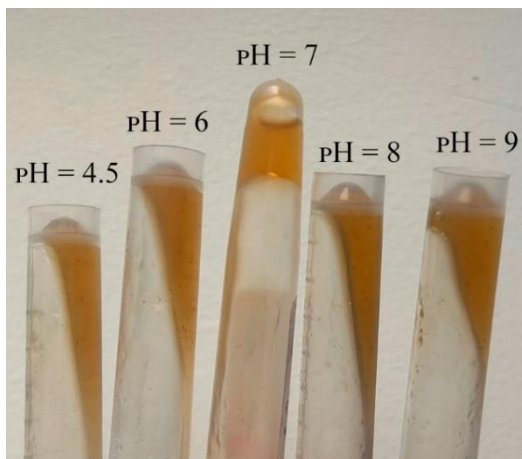


Рисунок 1 – Образцы гидрогелей, полученные в разных условиях

Таким образом, в нейтральной среде проявляется максимальная активность фермента и достигается достаточное количество нуклеофильных центров в биополимере для обеспечения равномерного распределения и сшивки полимерных цепей, что критично для получения формоустойчивого гидрогеля.

В настоящем исследовании установлено, что образование кросс-сшивок происходит на основе механизма присоединения по Михаэлю, где в результате атаки аминогруппы хитозана ( $-NH_2$ ) по  $\beta$ -углероду  $\alpha,\beta$ -ненасыщенной карбонильной системы, образованной в результате окисления феруловой кислоты, затем образуется промежуточная структура, в которой происходит реорганизация и стабилизация электронной плотности (Рис 2). Этот процесс приводит к образованию ковалентной связи между хитозаном и феноксильным радикалом, образованным в результате окисления феруловой кислоты лакказой. Полученные структуры вступают во взаимодействия друг с другом в результате чего образуются кросс-сшитые структуры биополимера.

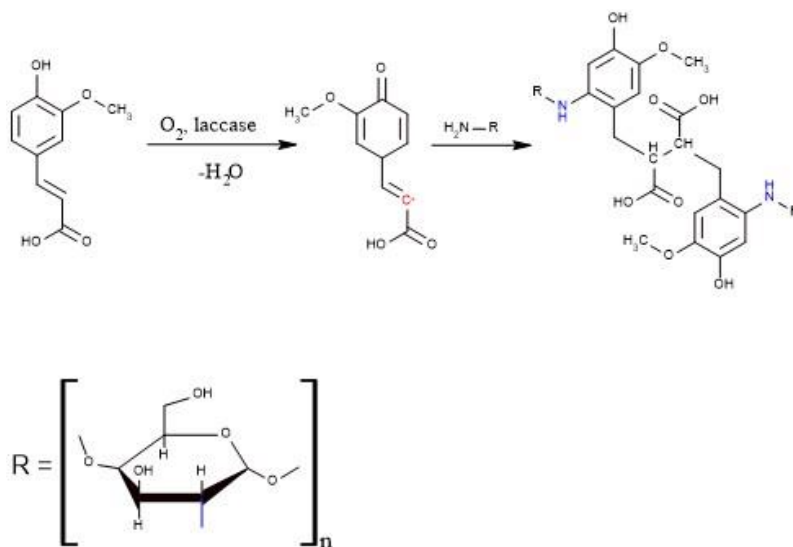


Рисунок 2 – Механизм кросс-сшивки хитозана феруловой кислотой под действием лакказы на основе механизма присоединения по Михаэлю

Такой механизм обеспечивает формирование прочных межцепочечных мостиков и является одной из причин образования формоустойчивых гидрогелей.

Важным фактором, определяющим свойства полученных материалов, является соотношение аминогрупп хитозана и молекул феруловой кислоты, поскольку именно оно влияет на формирования сшитой структуры. Для выбора оптимального соотношения реагирующих веществ определяли степень сшивки гидрогеля, используя два метода: определение потери массы после экстракции раствором 3% уксусной кислоты несшитого хитозана и остаточного содержания аминогрупп по реакции с нингидрином. Из исследованного диапазона от 1/20 до 1/2.5 наилучшим оказалось соотношение 10:1, при котором степень сшивки достигала 83%. Избыток феруловой кислоты может приводить к избытку феноксильных радикалов в реакционной системе и образованию побочных продуктов окисления феруловой кислоты. Таким образом, важно поддерживать баланс между нуклеофильными центрами хитозана и феноксильными радикалами в реакционной смеси.

Равновесная набухаемость модифицированного гидрогеля в физиологическом растворе составляет около 270%, что позволяет ему поглощать количество воды, почти в три раза превышающее его сухую массу, при этом сохраняя структурную целостность. Высокая проницаемость кислорода, при которой снижение проницаемости составило лишь 9%, также играет важную роль, обеспечивая доступ кислорода в медицинских покрытиях и регулируя его поступление в упаковке пищевых продуктов, что позволяет адаптировать гели под разные виды товаров.

Сравнение с другими методами модификации показывает, что ферментативная сшивка хитозана с феруловой кислотой имеет ряд существенных преимуществ. В отличие от глутарового альдегида, который даёт жёсткие, но потенциально токсичные сети, и генипина, который менее токсичен, но дорог и даёт плотные сшивки, ферментативный подход обеспечивает мягкую и регулируемую структуру с высокой биосовместимостью [3-5]. Особое внимание заслуживает экологическая безопасность этого метода. Реакции проходят в водной среде, без органических растворителей и агрессивных реагентов, при комнатной температуре и нейтральном pH, снижая энергозатраты и экологическую нагрузку. Феруловая кислота — природный продукт, получаемый из растительных отходов, а ферментативные процессы соответствуют принципам зелёной химии.

Таким образом, проведённые исследования показали, что ферментативная модификация хитозана феруловой кислотой с использованием бактериальной лакказы — это наиболее перспективный метод получения гидрогелей, за счёт высокой степени сшивки в сравнении с методами основанных на использовании грибных лакказ. Особое значение имеет тот факт, что pH среды критичен как для активности фермента, так и для поведения хитозана, обеспечивая баланс между реакционной способностью аминогрупп и коллоидной стабильностью геля. Полученные результаты набухаемости и пропускания кислорода открывают широкие перспективы применения модифицированных хитозановых гидрогелей в медицине, например, в виде повязок, матриц для доставки лекарств и биосовместимых покрытий, а также в пищевой промышленности для создания активной упаковки, повышающей безопасность и срок хранения продуктов.

***Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 24-14-20013, <https://rscf.ru/project/24-14-20013> и Комитета по науке и инноватике Тульской области.***

#### Литература

1. Kaczmarek-Szczepańska B., Grabska-Zielińska S., Michalska-Sionkowska M. The Application of Phenolic Acids in The Obtainment of Packaging Materials Based on Polymers—A Review // *Foods*. 2023. V. 12. № 6. P. 1343. doi: 10.3390/foods12061343.
2. Trubitsina L.I., Ignatov V.V., Koroleva I.K., Kolomytseva M.P. Genetic Control of Protocatechuic Acid Metabolism in the Mutant Strain *Pseudomonas fluorescens* AR 4.2 // *Biochemistry (Moscow)*. 2023. V. 88. № 10. P. 1658–1667. doi: 10.1134/S0006297923100139.
3. Mndlovu H., Du Toit L.C., Kumar P., Marimuthu T., Kondiah P.P.D., Choonara Y.E., Pillay V. Bioplatfrom fabrication approaches affecting chitosan-based interpolymer complex properties and performance as wound dressings // *Molecules*. 2020. V. 25. № 1. P. 222. doi: 10.3390/molecules25010222.
4. Ciarlantini C., Cirillo G., Curcio M., Spizzirri U.G., Picci N., Iemma F., Paolino D., Restuccia D. Development of antioxidant and antimicrobial membranes based on functionalized and crosslinked chitosan for tissue regeneration // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. V. 25. № 4. P. 1961. doi: 10.3390/ijms25041961.
5. Fernandes S.C., de Oliveira Santos D.M.P., Vieira I.C. Genipin-Cross-Linked Chitosan as a Support for Laccase Biosensor // *Electroanalysis*. 2013. V. 25. № 2. P. 557–566. doi: 10.1002/elan.201200529.