

ВЫДЕЛЕНИЕ ХИТИНСОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКСОВ ИЗ ТАЛЛОМА ЛИШАЙНИКА ВИДА *PELTIGERA APHTHOSA*

О.С. Бровко — Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лаверова УрО РАН, Архангельск, Россия. ORCID: 0000-0002-1961-7831. Эл. почта: brovko-olga@rambler.ru

А.Д. Ивахнов — Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лаверова УрО РАН, Архангельск, Россия; Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, Архангельск, Россия. ORCID: 0000-0003-2822-9192. Эл. почта: ivahnov-tema@yandex.ru (для переписки)

Д.В. Жильцов — Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лаверова УрО РАН, Архангельск, Россия. ORCID: 0000-0002-1155-4135. Эл. почта: dnorton.usa@gmail.com

Т.А. Бойцова — Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лаверова УрО РАН, Архангельск, Россия. ORCID: 0000-0002-3899-7243. Эл. почта: tboitsova@yandex.ru

©2022 г. Поступила в редакцию 24.02.2022 г. Прошла рецензирование 10.03.2022 г.
Принята к публикации 10.03.2022 г.

Из талломов листоватого лишайника *Peltigera aphthosa* методами сверхкритической флюидной экстракции (СКФЭ) и кислотно-щелочного гидролиза получены хитинсодержащие комплексы. С использованием активного планированного эксперимента определены оптимальные условия СКФЭ, позволяющие получить комплекс с выходом 96 % и сорбционной емкостью по метиленовому синему 125 мг/г. Показана полиамфолитная природа полученных комплексов-сорбентов, охарактеризованы их морфология и химический состав. Показана высокая эффективность переработки лишайникового сырья с получением хитинсодержащих комплексов методом СКФЭ в сравнении с методом кислотно-щелочного гидролиза.

Ключевые слова: сверхкритическая флюидная экстракция, диоксид углерода, кислотно-щелочной гидролиз, эпигейный лишайник, *Peltigera aphthosa*, хитинсодержащий комплекс.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы во многих странах мира широкое развитие получили исследования по созданию нового класса сорбентов, состоящих или включающих в себя вещества биогенного происхождения (биосорбенты). Наибольшее распространение находят полимерные материалы на основе хитина (хитозана), имеющих широкую сырьевую базу (панцири морских ракообразных, грибы, пчелиный подмор и т. д.), которая постоянно расширяется за счет вовлечения новых альтернативных источников. Уникальными свойствами хитина (хитозана) являются высокая сорбционная способность, низкая зольность, биоразлагаемость до безопасных для живой природы веществ, возможность получения сорбентов, состоящих из частиц с заданной геометрией и большой поверхностью.

Наибольшее количество хитина содержится в покрывных оболочках камчатского краба и криля [1, 2]. Выделение хитина из панциря ракообразных

сопровождается образованием большого количества отходов, что приводит к загрязнению окружающей среды и считается серьезным недостатком. Альтернативой для решения этих проблем является производство хитина из различных классов грибов, которое является потенциально экологически более чистым [3]. Свойства (молекулярная масса, растворимость, степень кристалличности) и структура выделяемого хитина могут существенно различаться в зависимости от источника сырья и способа получения полимера.

Содержание хитина в клеточной стенке высших грибов находится в пределах от 5,2 до 80 %, причем оно зависит от вида гриба, возраста грибной клетки и условий ее роста. Для низших грибов содержание хитина составляет 0,2–26,2 %; наибольшее его количество характерно для аспергиллов — 20–22 % [4–6].

Особый тип грибов — лишенизированные аскомицеты (лишайники), клеточная стенка которых также сформирована из микрофибрилл хитина. Это группа живых организмов, включающая более 20 тыс. видов. В лишайниках гриб (микобионт) и одноклеточная зеленая водоросль (фитобионт) образуют единый организм, в который дополнительно могут быть вовлечены цианобактерии (цианобионт) [7, 8]. Клеточные стенки этих симбиотических ассоциаций на 90–98 % сформированы из микобионта [9–11].

В клеточной стенке высших грибов и некоторых видов лишайников хитин находится в виде хитин-глюканового комплекса, в котором он связан с β -1,3- и β -1,6-глюканами, выполняя защитные функции [12]. В некоторых видах грибов и лишайников в структуру хитинсодержащего комплекса (ХСК) встроен пигмент меланин, который является важным биологически активным компонентом клеточной стенки; он проявляет антиоксидантные, гепатопротекторные и антимуtagenные свойства, способен сорбировать тяжелые металлы, органические загрязнители и нейтрализовать продукты перексидного окисления липидов [13].

Исследования, посвященные изучению хитина и ХСК в лишайниках, немногочисленны [9, 14, 15] и направлены на определение физико-химических свойств хитина лишайников и сравнение их со свойствами хитинов, полученных из других источников.

Для выделения ХСК из аскомицетов обычно применяют последовательную гидролитическую обработку кипящей водой с добавкой ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты), этанолом со щелочью и соляной кислотой. Данный метод применим и к микромицетам [16, 17]. При выделении ХСК из высших базидиальных грибов используют многостадийные схемы последовательного кислотного-щелочного гидролиза грибной биомассы с включением стадии депигментации:



Установлено, что четырехстадийной обработки достаточно для получения хитина высокого качества [18].

Помимо традиционных схем получения ХСК из различных видов грибов также может быть осуществлен экстракционный метод, основанный на извлечении низкомолекулярных компонентов с получением ХСК в виде шрота.

Одним из современных методов экстракции является метод сверхкритической флюидной экстракции (СКФЭ), позволяющий одновременно с получением ХСК извлекать и малоизмененные экстрактивные биологически активные вещества (БАВ) [19–24].

Преимуществом использования диоксида углерода в качестве экстрагента при СКФЭ является его дешевизна и возможность рециркуляции [25]. Несмотря на многочисленные работы в области получения экстрактов БАВ из лишайников [19–22], в литературе отсутствуют данные о применении СКФЭ для выделения хитина и его комплексов.

В настоящее время для оптимизации технологических процессов, в том числе и для СКФЭ, часто используют методы активного планированного многофакторного эксперимента с построением униформ-планов второго порядка, позволяющих получить квадратичную регрессионную модель в виде полинома второй степени, учитывающую влияние на процесс не менее трех факторов [22, 24, 26–32].

Цель данной работы — сравнение морфологических и физико-химических свойств ХСК, выделяемых методами кислотно-щелочного гидролиза и сверхкритической флюидной экстракции из лишайника вида *P. aphthosa*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве сырья для выделения ХСК использовали эпигейный листоватый лишайник вида *P. aphthosa* (рис. 1), отобранный на территории Холмогорского района Архангельской области. Он относится к трехкомпонентным лишайникам; функцию ассимиляции углерода у него осуществляют в основном зеленые водоросли, а цианобактерии находятся в специфических образованиях — цефалодиях и фиксируют атмосферный азот.

Слоевница лишайника в лаборатории очищали от посторонних примесей (частичек коры) и высушивали на воздухе в отсутствие прямого солнечного света. Влажность талломов ($6,2 \pm 0,2$ %) и зольность ($2,1 \pm 0,1$ %) определяли по стандартным методикам [33]. Перед выделением ХСК таллом лишайника был предварительно размолот на лабораторной мельнице ЛН-201. Для

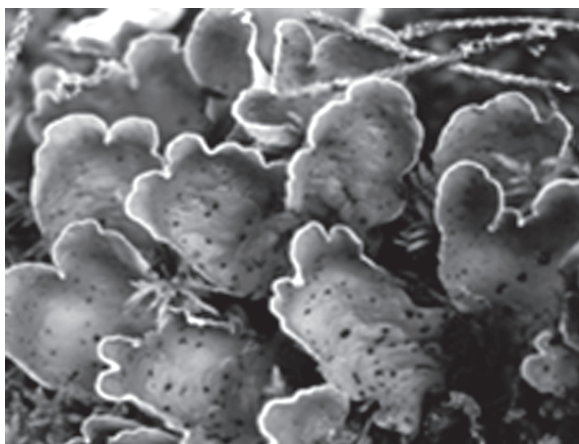


Рис. 1. Внешний вид таллома лишайника вида *P. aphthosa*

Таблица 1

Уровни факторов при оптимизации процесса выделения хитинсодержащего комплекса (ХСК) из лишайника *P. aphthosa* методом СКФЭ

Переменные факторы	Обозначение фактора	Уровни факторов и интервалы варьирования					
		шаг варьирования	интервалы варьирования				
			-1,682 ($-\alpha$)	-1	0	1	1,682 (α)
Давление, МПа.	X	10,0	8,2	15,0	25,0	35,0	41,8
Температура, °С	Y	20	26	40	60	80	93,5
Гидро модуль	Z	15	9,8	20	35	50	60,2

исследования использовали фракцию размером 0,2–0,5 мм, составляющую по массе 90 % от размолотого образца.

Для выделения ХСК из лишайников *P. aphthosa* применяли методы сверхкритической флюидной экстракции и кислотно-щелочного гидролиза (КЩГ). СКФЭ проводили на установке SCFE-5000 (Waters, США), оснащенной экстракционной ячейкой объемом 100 мл, навеска сырья составила 100 г абсолютно сухого сырья.

Для математического описания СКФЭ лишайника *P. aphthosa* и определения оптимальных параметров проведения процесса осуществлен планированный эксперимент с построением центрального композиционного ротатбельного равномерного плана второго порядка [34]. В качестве основных уровней параметров обработки выбраны: давление (X) 25,0 МПа, температура (Y) +60 °С, гидро модуль (удельный массовый расход экстрагента) (Z) 35 при скорости потока экстрагента 50 г/мин; интервалы варьирования параметров — 6,0 МПа, 15 °С и 10, соответственно. Звездное плечо плана 1,682. Уровни факторов представлены в табл. 1.

Матрица планирования в кодированном и натуральном виде и полученные результаты — выход ХСК (в %) и его сорбционная емкость (СЕ) по метиленовому синему (МС), в мг/г — представлены в табл. 2.

Для выделения ХСК из таллома лишайника методом КЩГ применяли методику [35], исключив стадию депигментации, в ходе которой удаляется пигмент меланин, обладающий высокими сорбционными свойствами относительно органических загрязнителей и тяжелых металлов [36]. Для извлечения ХСК из таллома лишайника *P. aphthosa* применяли схему, приведенную на рис. 2.

Выход конечного продукта (в процентах от массы исходного сырья с учетом влажности) определяли взвешиванием после высушивания в лиофилизаторе Lyovarov L-200 (Buchi, Швейцария).

Элементный анализ (С, Н, N) таллома лишайника и ХСК проводили сжиганием пробы в токе чистого кислорода при температуре печи 1200 °С в трубке сжигания (внутренний диаметр 24 мм) на анализаторе элементного состава Elementar Vario MICRO cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Германия). За окончательный результат принимали среднее арифметическое результатов трех параллельных определений, расхождение между параллельными определениями не превышало $\pm 10\%$ по отношению к среднему арифметическому.

Таблица 2

Матрица планирования эксперимента в натуральном виде

№ опыта	Величина фактора			Выход хитинсодержащего комплекса (ХСК), <i>W</i> , %	Сорбционная емкость, <i>CE</i> , мг/г
	<i>X</i> , МПа	<i>Y</i> , °C	<i>Z</i>		
1	15,0	40	20	100	76,4
2	35,0	40	20	99,5	82,1
3	15,0	80	20	100	38,2
4	35,0	80	20	95,6	127,4
5	15,0	40	50	100	72,2
6	35,0	40	50	98,2	117,4
7	15,0	80	50	100	70,8
8	35,0	80	50	98,8	116,0
9	8,2	60	35	100	72,2
10	41,8	60	35	99,4	82,1
11	25,0	26	35	100	97,6
12	25,0	93,5	35	100	106,1
13	25,0	60	9,8	100	66,5
14	25,0	60	60,2	94,5	131,6
15	25,0	60	35	96,4	124,5
16	25,0	60	35	100	101,9
17	25,0	60	35	99,6	113,2
18	25,0	60	35	100	102,2
19	25,0	60	35	100	109,0
20	25,0	60	35	98,8	116,0

Для определения содержания экстрактивных веществ в объектах исследования была проведена исчерпывающая экстракция смесью растворителей (гексан : хлороформ = 1 : 1) в аппарате Сокслета [37].

Определение содержания меланина проводили методом депигментации раствором аммиака в присутствии пероксида водорода [35, 38]. Степень депигментации оценивали по изменению оптической плотности растворов на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) при длине волны 450 нм. Содержание меланина определяли по убыли массы образца в процессе депигментации.

Содержание белков в исследуемых объектах определяли по методу Лоури [38], в качестве стандарта использовали кристаллический альбумин (Sigma-Aldrich).

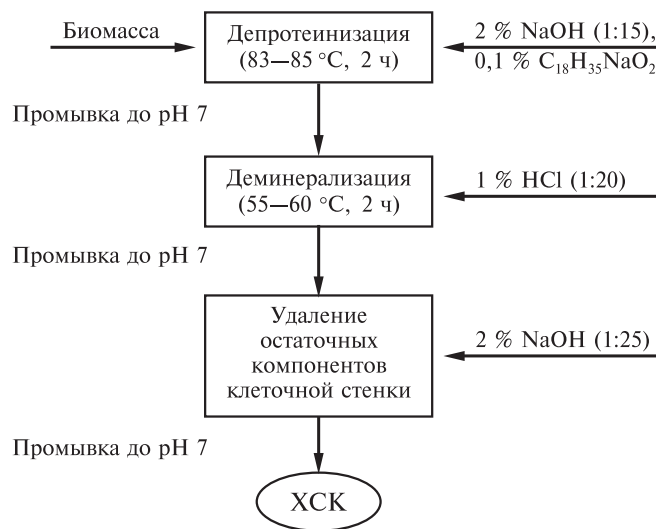


Рис. 2. Схема выделения хитинсодержащего комплекса из биомассы *P. aphthosa* методом кислотно-щелочного гидролиза

Содержание хитина оценивали методом спектроскопии в видимой области спектра по образованию хромогенов между продуктами кислотного гидролиза объектов (глюкозамин) и щелочным раствором ацетилацетона и реактивом Эрлиха (4-диметиламинобензальдегид) [40].

ИК-спектроскопические исследования образцов хитина и ХСК, спрессованных в таблетки с KBr, проводили с помощью ИК Фурье-спектрометра Irtaffinity-1 (Shimadzu, Япония). Диапазон сканирования от 4000 до 400 см⁻¹, число сканирований 50, разрешение 4 см⁻¹.

Снимки лиофильно высушенных образцов хитина и ХСК получали на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) SEM Sigma VP (Zeiss, Германия). Для повышения контрастности снимков на поверхность исследуемых образцов с помощью устройства для подготовки образцов Q150TES (QUORUM) наносили платиново-палладиевое покрытие толщиной до 5 нм.

Дифрактограммы предварительно размолотых на планетарной шаровой мельнице Retsch PM100 образцов хитина и ХСК записывали на дифрактометре XRD-7000S (Shimadzu, Япония), оборудованном приставкой для вращения образца и системой поликапиллярной оптики. Параметры работы рентгеновской трубки: ускоряющее напряжение 50 кВ, ток 30 мА, материал мишени — Cu. Диапазон сканирования по углу 2θ — 10°–70°, скорость сканирования 0,5 град/мин, шаг 0,02 градуса.

Сорбционную способность (емкость) ХСК оценивали статическим методом [41] по отношению к эталонным красителям: метиленовому синему (МС) и конго красному (КК), которые являются моделями эндотоксинов и органических загрязнителей средней и малой молекулярных масс [42–47].

Результаты экспериментов представлены в виде средней арифметической величины и ее абсолютной ошибки в трех параллельных измерениях. Для установления статистической взаимосвязи между параметрами использовали t-критерий Стьюдента при доверительном уровне P = 95 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения оптимальных параметров процесса выделения хитинсодержащего комплекса методом СКФЭ из талломов лишайников *P. aphthosa* проведено 20 опытов (табл. 2). Выход ХСК изменялся от 94,5 до 100 %, а СЕ получаемого материала по МС — от 38 до 132 мг/г. В центре плана проведено шесть опытов, анализ результатов которых показал высокую их сходимость — отклонение от среднего выхода не превышало 2,5 отн. %. При реализации планированного эксперимента минимальный выход ХСК, соответствующий наиболее полному извлечению экстрагируемых веществ, был установлен при гидромодуле 60 и нулевом уровне факторов давления и температуры экстракции (т. е. при 25,0 МПа и 60 °С) и составил 94,5 % (табл. 1). Разброс величин сорбционной емкости материалов в центре плана оказался на порядок выше, а отклонение от среднего достигло 12 %. Материал с наибольшей сорбционной емкостью получен в условиях максимального извлечения экстрагируемых веществ.

В результате математической обработки результатов с помощью пакета MS Excel получены уравнения регрессии (1 и 2), адекватно (с достаточной точностью) описывающие зависимости выхода ХСК (W , %) и его сорбционной емкости по отношению к МС (СЕ, мг/г) от условий проведения процесса экстракции и содержащие только значимые коэффициенты. Уравнения проверены на адекватность по критерию Фишера, при уровне значимости 0,1.

$$W = 99,9 - 4,1x - 3,3z - 2,9xy + 0,3yz + 3,6x^2 + 1,2y^2 + 1,5z^2, \quad (1)$$

$$CE = 111,1 + 14,8x + 11,8z + 10,4xy - 1,2yz - 12,8x^2 - 4,1y^2 - 5,1z^2, \quad (2)$$

где $x = (X - 250)/100$; $y = (Y - 60)/20$; $z = (Z - 35)/15$.

Коэффициенты множественной корреляции экспериментальных и расчетных значений выхода и СЕ составили соответственно 0,90 и 0,85 при относительных ошибках моделей (σ) 2,7 и 12,4 %.

При анализе полученных уравнений регрессии определены оптимальные значения факторов процесса, соответствующих максимально возможному удалению экстрагируемых веществ (минимальный выход ХСК) и максимальному значению СЕ получаемого материала. Давление, температура и гидромодуль в оптимальном эксперименте составляют для обоих параметров оптимизации 35,0 МПа, 80 °С и 50, соответственно. Ожидаемый выход ХСК 96,3 % при сорбционной емкости 125,1 мг/г. При проведении подтверждающего эксперимента получен образец ХСК с выходом 96,0 % при СЕ 125 мг/г. Относительная ошибка модели составила менее 1 %.

Выделение ХСК методом КЩГ включало две основные стадии — депротенинизацию и деминерализацию, и заключительную стадию щелочной обработки (рис. 2). Обработки осуществляли методом настаивания, после каждой стадии материал промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции среды. Депротенинизацию проводили в течение двух часов водным раствором, содержащим 2 % гидроксида натрия и 0,1 % стеарата натрия (ПАВ) при температуре 83—85 °С и гидромодуле 15. Деминерализацию осуществляли в течение двух часов 1 %-ным водным раствором соляной кислоты при температуре 55—60 °С и гидромодуле 20. Заключительную щелочную обработку проводили в течение двух часов 2 %-ным водным раствором гидроксида

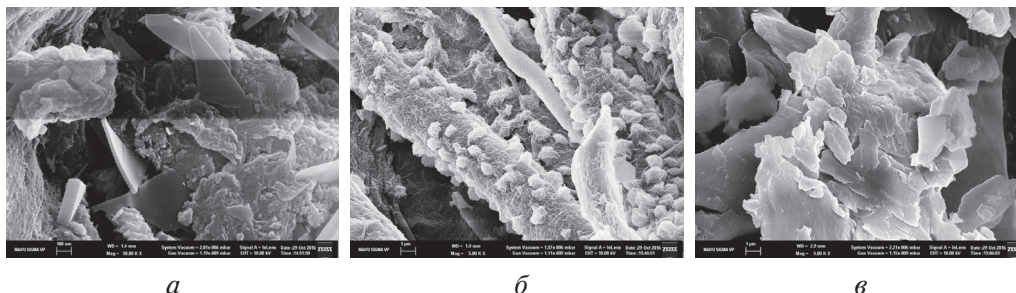


Рис. 3. Ультрамикроскопическое строение поверхности хитина краба и хитинсодержащих комплексов:

a — хитин краба; *б* — ХСК_{СКФЭ}; *в* — ХСК_{КЩГ}

натрия при температуре 83—85 °С и гидромодуле 25. Выход ХСК составил $24,9 \pm 0,2$ %.

ХСК, выделенные методами СКФЭ и КЩГ (ХСК_{СКФЭ} и ХСК_{КЩГ}), представляли собой мелкодисперсные порошки черного цвета, внешне не отличающиеся друг от друга. На рис. 3 представлены СЭМ-снимки поверхности полученных ХСК в сравнении с хитином краба.

ХСК_{СКФЭ} в значительной степени сохраняет структуру клеточной стенки исходного лишайника (элементы структуры отчетливо видны на рис. 3б). ХСК_{КЩГ} имеет более измененную структуру, аналогичную структуре хитина краба (рис. 3а и 3в) ввиду его получения по сходным методикам кислотно-щелочной обработки. На поверхности хитина краба, ХСК_{СКФЭ} и ХСК_{КЩГ} присутствуют аналогичные кристаллические структуры, но большая часть поверхности состоит из аморфных областей.

Сравнение состава ХСК, выделенных методами СКФЭ и КЩГ, и исходного таллома лишайника представлено в табл. 3.

Таблица 3

Компонентный и элементный состав талломов лишайника *P. aphthosa* и хитинсодержащих комплексов

Компонент	Содержание компонента, % / Степень удаления компонента*, %		
	таллом лишайника	ХСК _{СКФЭ}	ХСК _{КЩГ}
N	$3,6 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$
C	$48,9 \pm 2,0$	$59,9 \pm 0,3$	$57,0 \pm 0,3$
H	$6,5 \pm 0,3$	$5,8 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,2$
Зольность (минеральные вещества)	$2,1 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,4/0$	$3,5 \pm 0,3/58,5$
Хитин	$1,02 \pm 0,09$	$1,20 \pm 0,10/0$	$3,15 \pm 0,09/23,1$
Меланин	$9,0 \pm 0,6$	$9,4 \pm 0,4/0$	$12,5 \pm 1,0/65,4$
Белок	$7,5 \pm 0,9$	$7,8 \pm 0,1/0,35$	$0,45 \pm 0,06/98,5$
Экстрактивные вещества	$2,9 \pm 0,9$	$<0,1/>97,5$	$0,9 \pm 0,2/92,3$

*Доля компонента, удаляемая в ходе обработки, отн. %.

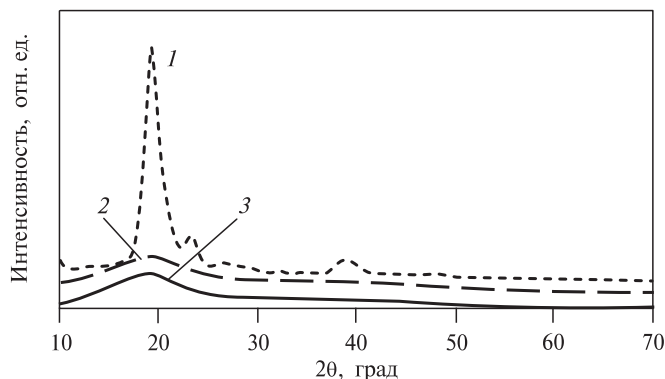


Рис. 4. Дифрактограммы образцов хитина и хитинсодержащих комплексов:
1 — хитин краба; 2 — ХСК_{СКФЭ}; 3 — ХСК_{КЩГ}

В ходе СКФЭ наблюдается практически полное удаление экстрактивных веществ (97,5 %). При этом такие компоненты как хитин, меланин, белок, минеральные компоненты (зольность) практически не удаляются и сохраняются в структуре ХСК_{СКФЭ}. Выявленная закономерность вызвана практически полной нерастворимостью данных компонентов в сверхкритическом диоксиде углерода (СК-СО₂). В противоположность этому, в ходе жесткой кислотнo-щелочной обработки, наблюдается значительное удаление хитина (23 %), меланина (65,4 %), белка (98,5 %) и минеральных компонентов (58,5 %). Удаление белка и минеральных компонентов при КЩГ является положительным результатом, так как их содержание в энтеросорбенте регулируется [42, 48] и не должно превышать 2 и 3 % соответственно. Таким образом, ХСК_{СКФЭ} не удовлетворяет требованиям к энтеросорбентам по содержанию остаточного белка и минеральных компонентов.

Оценка структуры ХСК в сравнении с хитином краба выполнена методом рентгеновской дифрактометрии (РФА). Дифрактограммы образцов, представленные на рис. 4, показывают, что хитин краба имеет значительно более высокую степень кристалличности. На дифрактограммах ХСК из лишайника *P. aphthosa* отсутствуют выраженные рефлексы, а в области $2\theta = 19^\circ - 21^\circ$, где обычно наблюдаются главные рефлексы кристаллического хитина, присутствует размытое аморфное гало. Надмолекулярная структура ХСК более дефектна, чем хитина животного происхождения, имеет мезоморфный характер с преобладанием аморфных областей, что согласуется с результатами исследований методом СЭМ.

Изучение структуры ХСК в сравнении с хитином краба проводили также методом ИК-спектроскопии (см. рис. 5). В ИК-спектре хитина краба (спектр *a*) наблюдаются характеристические полосы поглощения при $3435 - 3444 \text{ см}^{-1}$ (валентные колебания ОН-групп), при $3260 - 3270 \text{ см}^{-1}$ (валентные колебания NH₂-групп), в областях $2800 - 2920$ и $1305 - 1400 \text{ см}^{-1}$ (колебания связи С—Н), при 1655 см^{-1} (валентные колебания связи С=О в амидной группе — полоса «Амид I») и 1560 см^{-1} (деформационные колебания связи С—N в амидной группе — полоса «Амид II»), при $1000 - 1050 \text{ см}^{-1}$ (колебания связи С—О—С). Спектроскопические данные дополнительно показывают близость химической структуры хитиновой части исследованных образцов.

На ИК-спектрах образцов ХСК (рис. 5б, в) помимо основных характеристических полос присутствует слабое поглощение при $890 - 880$ и $800 - 790 \text{ см}^{-1}$,

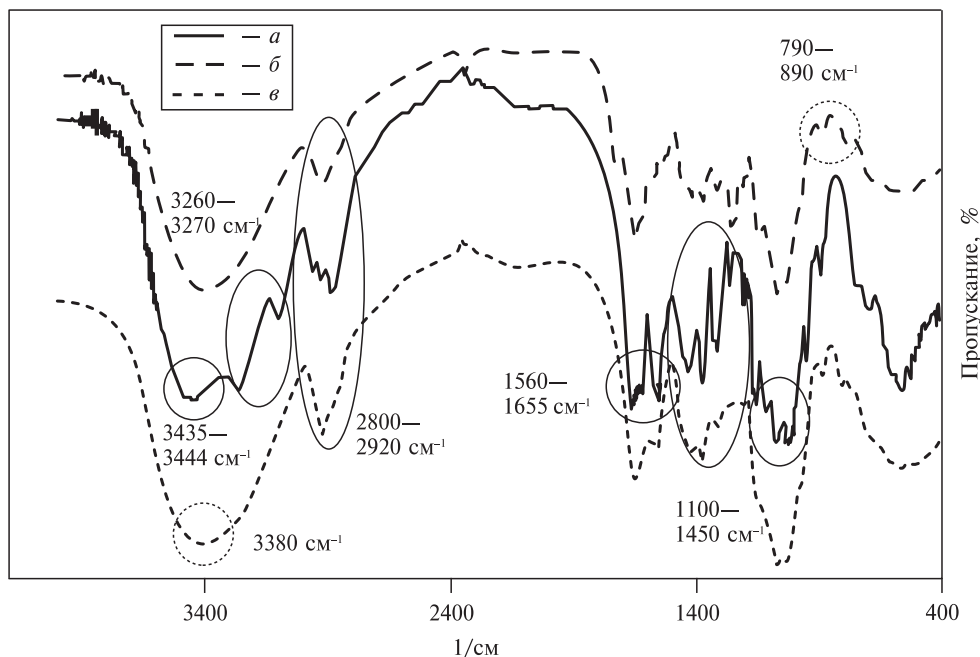


Рис. 5. ИК-спектры хитина краба и хитинсодержащих комплексов:
a — хитин краба; *b* — ХСК_{СКФЭ}; *c* — ХСК_{КШГ}

соответствующие деформационным колебаниям С—Н-связи в β-сахарах, что может свидетельствовать о присутствии в образцах ХСК глюканов. Кроме того, в ИК-спектрах обоих выделенных ХСК присутствует широкая полоса в области 3380 см⁻¹, которая является характеристической для меланина и обусловлена валентными колебаниями ОН-групп [49, 50]. При этом интенсивность пиков значительно снижается в спектре ХСК_{КШГ} в сравнении со спектром ХСК_{СКФЭ} поскольку в процессе кислотно-щелочной обработки значительная часть белков и пигментов удаляется (табл. 3).

Потенциальными адсорбционными центрами ХСК могут быть первичные аминогруппы (—NH₂) и ацетамидные группы (—NHС(О)СН₃), входящие в состав хитина, карбоксильные (—СООН) и гидроксильные группы (—ОН) меланина и глюкопиранозных циклов хитина и глюкана.

Для оценки сорбционных свойств полученных ХСК и исходного лишайникового сырья использованы модельные органические сорбаты — водорастворимые красители МС и КК. Выбор данных красителей в качестве модельных сорбатов обусловлен их широким использованием для оценки адсорбционных свойств пористых материалов [51, 52]. Установление закономерностей адсорбции МС и КК на поверхности ХСК позволяет прогнозировать процессы адсорбции эндотоксинов и органических соединений средней (10–20 кДа) и низкой (до 900 Да) молекулярных масс. МС, являясь катионным сорбатом, проявляет сродство преимущественно к материалам кислотной природы, КК, как анионный сорбат, содержащий в своей структуре сульфогруппу, в водном растворе находится в виде аниона и проявляет сродство к материалам с основными группами.

На рис. 6*a* представлены изотермы адсорбции МС и КК полученными ХСК, которые в соответствии с классификацией С. Брунауэра, Л. Деминга,

У. Деминга и Э. Теллера могут быть отнесены к I типу и описаны уравнением Ленгмюра [53]. В табл. 4 приведены параметры адсорбции — предельная адсорбция (A_{∞} , мг/г) и константа сорбционного равновесия (K_L , л/мг), рассчитанные исходя из линеаризованной формы уравнения Ленгмюра (линейные анаморфозы изотерм представлены на рис. 6б).

Исходный таллом лишайника обладает низкой сорбционной способностью по отношению как к МС, так и к КК; предельная адсорбция составляет 90 и 10 мг/г соответственно. Удаление низкомолекулярных экстрактивных веществ в ходе СКФЭ способствует увеличению СЕ. Предельная емкость достигает 125 мг/г по отношению к МС и 18 мг/г по отношению к КК. Одновременно

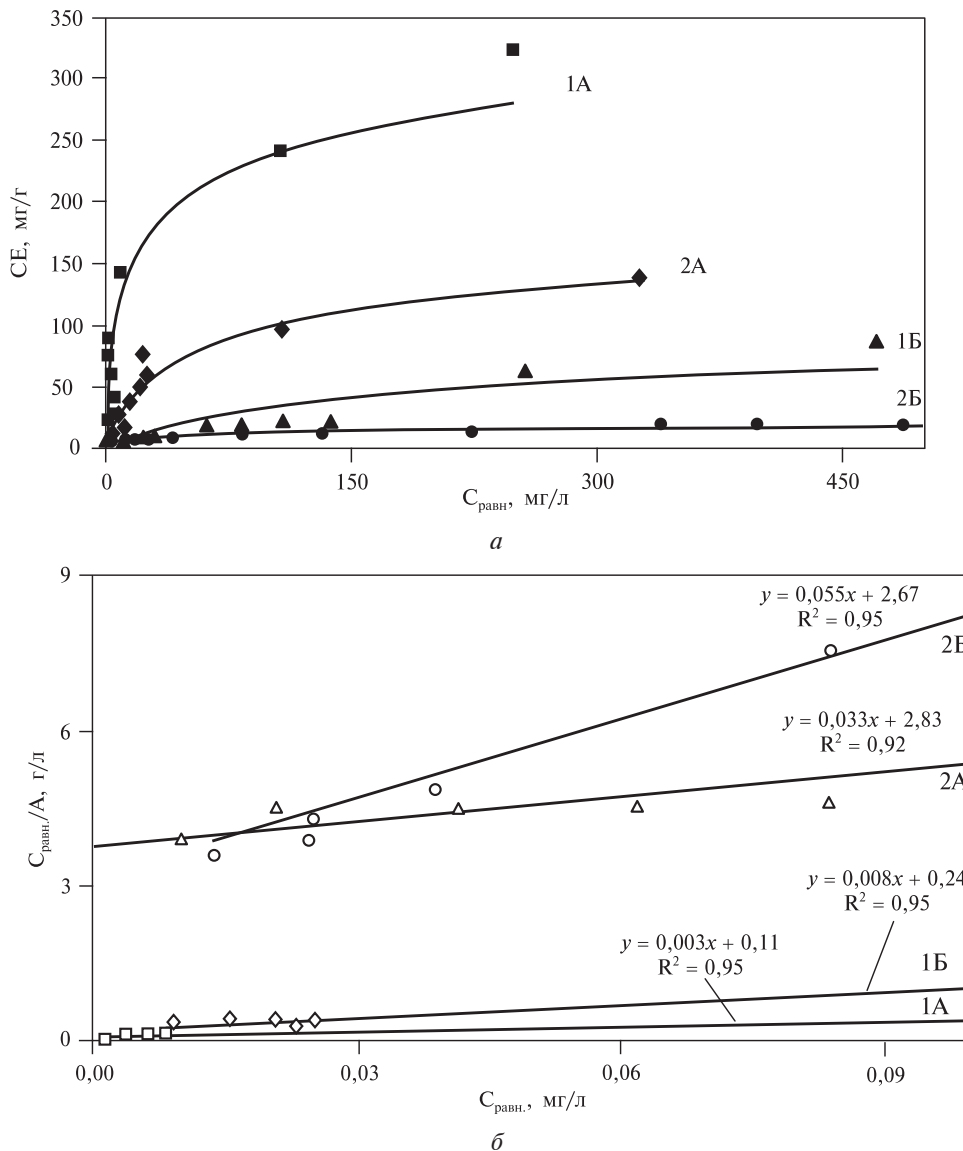


Рис. 6. Изотермы адсорбции (а) красителей ХСК из водных растворов и их линейные анаморфозы (б) в координатах уравнения Ленгмюра (А — МС, Б — КК; 1 — ХСК_{КШГ}, 2 — ХСК_{СКФЭ})

Таблица 4

Параметры адсорбции красителей на хитинсодержащих комплексах и талломе лишайника

Образец	Краситель	Параметры адсорбции	
		A_{∞} , мг/г	$K_d \cdot 10^3$, л/мг
Таллом лишайника	МС	90	36
ХСК _{КЩГ}		322	28
ХСК _{СКФЭ}		125	34
Таллом лишайника	КК	10	28
ХСК _{КЩГ}		30	11
ХСК _{СКФЭ}		18	19

отмечается уменьшение величин констант адсорбционного равновесия (K_d), которые могут характеризовать энергию взаимодействия адсорбата с адсорбентом при условии постоянства энтропийного члена, т.е. одинаковости структур адсорбционных комплексов в рассматриваемом ряду систем. ХСК_{КЩГ} обладает самыми высокими показателями СЕ (322 мг/г по отношению к МС и 30 мг/г по КК), что вероятно связано с более глубокой разработкой структуры поверхности сорбента и соотносится с данными СЭМ-исследований (рис. 3). Полученные ХСК обладают сродством, как к основному (МС), так и к кислотному (КК) красителям, что свидетельствует об их полиамфолитной природе.

В целом, ХСК, полученный методом КЩГ, характеризуется более высокой сорбционной способностью по сравнению с ХСК, полученным методом СКФЭ (322 против 125 мг/г). Однако, учитывая значительно больший выход сорбента, получаемого методом СКФЭ (96 против 24,9 %), можно сделать вывод о более полном использовании биомассы талломов лишайника при их переработке методом СКФЭ. Сорбент, получаемый из одного грамма сырья (таллома) методом КЩГ, способен извлекать до 80 мг МС, а методом СКФЭ — до 120 мг МС (на 50 % больше). Таким образом, эффективность переработки сырья методом СКФЭ выше на 50 % в сравнении с методом КЩГ. Кроме того, получение сорбента методом КЩГ требует значительных расходов кислот и щелочей, что приводит к образованию большого количества сточных вод. Метод СКФЭ лишен данного недостатка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методами СКФЭ и кислотно-щелочного гидролиза (КЩГ) получены хитинсодержащие комплексы (ХСК) из талломов лишайника *P. aphthosa*. Выход комплексов в оптимальных условиях составляет 96 и 25 % соответственно. Анализ компонентного состава полученных ХСК свидетельствует о высокой степени деградации талломов в ходе КЩГ (удаление 23 % хитина, 65 % меланина, 98,5 % белка и 58,5 % минеральных компонентов), в отличие от СКФЭ-обработки, при которой удаляются исключительно экстрактивные вещества (более 97,5 %).

Методами СЭМ и дифрактометрии установлена близость морфологии ХСК_{КЩГ} и ХСК_{СКФЭ} и их более аморфная структура по сравнению с хитином

краба. Методом ИК-спектроскопии выявлено присутствие основных функциональных групп хитина, меланина и глюкоана в составе полученных ХСК.

Исходный таллом лишайника обладает невысокой сорбционной способностью. Предельная сорбционная емкость ХСК_{КЩГ} (ХСК_{СКФЭ}) достигает 322 (125) и 30 (18) мг/г по отношению к МС и КК соответственно. Полученные ХСК обладают полиамфолитной природой.

Эффективность переработки лишайникового сырья с получением ХСК методом СКФЭ на 50 % выше в сравнении с методом КЩГ по количеству поглощенного сорбата в расчете на единицу массы сырья с учетом выхода сорбента и его сорбционной емкости.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Исследования проведены при финансовой поддержке Министерства экономического развития, промышленности и науки Архангельской области в рамках проекта «Получение нового хитинсодержащего материала (продукта) ветеринарно-биологического назначения из перспективных растительных источников Архангельской области» (Соглашение № 2 от 22.09.2021), Министерства науки и высшего образования РФ в части проведения сверхкритической флюидной экстракции (Проект № FSRU-2021-0009) с использованием оборудования ЦКП НО «Арктика» (САФУ) и ЦКП КТ РФ-Арктика (ФИЦКИА УрО РАН).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балабаев В.С., Глотова И.А., Измайлов В.Н. // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 1—1. С. 235.
2. Мукатова М.Д., Киричко Н.А., Романенкова Е.Н. // Вестник МГТУ. 2015. Т. 18. № 4. С. 641.
3. Berger L.R.R., Stamford T.C.M., Stamford-Arnaud T.M., de Alcântara S.R.C., da Silva A.C., da Silva A.M., do Nascimento A.E., de Campos-Takaki G.M. // Intern. J. of Molecular Sciences. 2014. Vol. 15. No 5. P. 9082.
4. Горовой Л.Ф., Косяков В.Н. // Биополимеры и клетка. 1996. Т. 12. № 4. С. 49.
5. Унрод В.Н. Солодовник Т.В. // Биополимеры и клетка. 2001. Т. 17. № 6. С. 526.
6. Хитозан / Под ред. К.Г. Скрябина, С.Н. Михайлова, В.П. Варламова. М.: Центр «Биоинженерия» РАН, 2013. 593 с.
7. Honegger R., Bartnicki-Garcia S. // Mycological Research. 1991. Vol. 95. No 8. P. 905.
8. Гимельбрант Д.Е., Степанчикова И.С., Кузнецова Е.С. // Новости систематики низших растений. 2009. Т. 43. С. 150.
9. Kaça M., Gokhan Halıcı M., Duman F., Erdogan S., Barane T. // Natural Product Research. 2015. Vol. 29. No 13. P. 1280.
10. Palmquist K. // New Phytologist. 2000. Vol. 148. P. 11.
11. Лишайники — индикаторы радиоактивного загрязнения / Под ред. Л.Г. Бязрова. М.: Изд-во КМК, 2005. 476 с.
12. Ившин В.П., Артамонова С.Д., Ившина Т.Н., Шарнина Ф.Ф. // Высокомолекулярные соединения. 2007. Серия Б. Т. 49. № 1. С. 2215.
13. Ушакова Н.А., Донцов А.Е., Сакина Н.Л., Ратникова И.А., Гаврилова Н.Н., Гармаш Н.Ю., Бастраков А.И., Козлова А.А. // Известия РАН. 2018. Серия Б. № 1. С. 55.
14. Мейчик Н.Р., Воробьев Д.В. // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 3. С. 340.
15. Жильцов Д.В., Бровка О.С., Паламарчук И.А., Бойцова Т.А., Боголицын К.Г., Чухчин Д.Г. // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. № 3—3. С. 9.

16. Злотников К.М., Казаков А.В., Винокурова Н.Г., Злотников А.К. // Прикладная биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 4. С. 501.
17. Жизнь растений. Том 1. Введение. Бактерии и актиномицеты / Под ред. Н.А. Красильникова, А.А. Уранова. М.: Просвещение, 1974. 487 с.
18. Осовская И.И., Будилина Д.Л., Тарабукина Е.Б., Нудьга Л.А. Хитин-глюкановые комплексы (физико-химические свойства и молекулярные характеристики): учебное пособие. С.-Петербург: СПбГТУРП, 2010. 54 с.
19. Бровко О.С., Паламарчук И.А., Бойцова Т.А., Боголицын К.Г., Вальчук Н.А., Ивахнов А.Д. // Фундаментальные исследования. 2015. № 11. С. 659.
20. Жильцов Д.В., Бровко О.С., Боголицын К.Г., Ивахнов А.Д., Паламарчук И.А., Бойцова Т.А. // Успехи современного естествознания. 2018. № 11—2. С. 210.
21. Бровко О.С., Ивахнов А.Д., Паламарчук И.А., Бойцова Т.А. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2017. Т. 12. № 1. С. 41.
22. Бойцова Т.А., Бровко О.С., Ивахнов А.Д., Жильцов Д.В. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2019. Т. 14. № 4. С. 9.
23. Ивахнов А.Д., Садкова К.С., Собашникова А.С., Скребец Т.Э. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2018. Т. 13. № 3. С. 90.
24. Бровко О.С., Ивахнов А.Д., Бойцова Т.А., Жильцов Д.В. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2021. Т. 16. № 2. С. 11.
25. Кершенгольц Е.Б., Шейн А.А., Кершенгольц Б.М. // Наука и образование. 2005. № 2(38). С. 74.
26. Kassama L.S., Shi J., Mittal G.S. // Separation and Purification Technology. 2008. Vol. 60. P. 278.
27. Amyrgialaki E., Makris D.P., Mauromoustakos A., Kefalas P. // Industrial Crops and Products. 2014. Vol. 59. P. 216.
28. Derrien M., Aghababarnejadd M., Gosselin A., Desjardins Y., Angersac P., Boumghar Y. // LWT—Food Science and Technology. 2018. Vol. 93. P. 79.
29. Хвиозова К.А., Богданович Н.И., Воропаева Н.Л., Карпачев В.В. // Химия растительного сырья. 2020. № 1. С. 337.
30. Статистика в планировании эксперимента в технике и науке / Пер. с англ. Н. Джонсон, Ф. Лион. М.: Мир, 1980. 610 с.
31. Назаров Н.Г. Практическое руководство по решению измерительных задач на основе оптимальных планов измерений. М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2007. 164 с.
32. Kokosa J.M., Przyiaznu A., Jeanott M. Solvent Microextraction: Theory and Practice. New York, 2009. 323 с.
33. Практикум по биохимии / Под ред. С.Е. Северенина, Г.А. Соловьевой. М.: Изд-во МГУ, 1989. 509 с.
34. Планирование эксперимента в примерах и расчетах: учебн. пособие / Под ред. Н.И. Богдановича, Л.Н. Кузнецовой, С.И. Третьякова, В.И. Жабина. Архангельск: Изд-во САФУ, 2010. 126 с.
35. Ившина Т.Н., Артамонова С.Д., Ившин В.П., Шарнина Ф.Ф. // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 3. С. 348.
36. Сушинская Н.В., Курченко В.П. // Теоретическая и прикладная экология. 2019. № 4. С. 83.
37. ГОСТ 23042-2015. М.: Мясо и мясные продукты. Методы определения жира. М.: Стандартинформ, 2019.
38. Павлова О.В., Белова Е.А., Троцкая Т.П. // Научные работы. 2014. Т. 2. № 46. С. 121.
39. Государственная фармакопея Российской Федерации. М.: Науч. центр экспертизы средств мед. применения, 2008. 704 с.
40. Костина А.М., Бабицкая В.Г., Лобанок А.Г. // Прикладная биохимия и микробиология. 1978. Т. 16. № 4. С. 586.
41. Бровко О.С., Жильцов Д.В., Ивахнов А.Д., Богданов М.В. // Химия растительного сырья. 2020. № 1. С. 57.
42. Карманов А.П., Кочева Л.С., Борисенков М.Ф. // Бутлеровские сообщения. 2016. Т. 45. № 1. С. 76.
43. Лишай А.В., Савицкая Т.А., Цыганкова Н.Г., Гринипан Д.Д., Чен Д. // Журнал Белорусского государственного университета. Химия. 2021. № 1. С. 58.
44. ГОСТ 4453-74. М.: Уголь активированный осветляющий древесный порошкообразный. М.: Изд-во стандартов, 1976.

45. Николаев В.Г., Геращенко И.И., Картель Н.Т., Гурина Н.М., Бакалинская О.Н., Сарнацкая В.В., Снежкова Е.А., Бардахивская К.И., Сахно Л.А. // Поверхность. 2011. Вып. 3(18). С. 310.
 46. Хохлова Т.Д., Хиен Л.Т. // Вестник МГУ. Серия 2. Химия. 2007. Т. 48. № 3. С. 157.
 47. Решетникова В.И. // Химико-фармацевтический журнал. 2003. Т. 37. № 5. С. 28.
 48. Веприкова Е.В., Кузнецова С.А., Скворцова Г.П., Щипко М.Л. // Журнал Сибирского фундаментального университета. Химия. Т. 3 (1). 2008. С. 286.
 49. Harki E., Talou, T., Dargent R. // Food Chemistry. 1997. Vol. 58. P. 69.
 50. Mboniyirivuze A., Mwakikunga B., Dhlamini S.M., Maaza M. // Materials, Chemistry and Physics 2015. Vol. 3. No 2. P. 25.
 51. Alzaydien A.S. // American J. of Environmental Sciences. 2009. Vol. 5. № 3. P. 197.
 52. Mukhina O.Yu., Piskunova I.A., Lysenko A.A. // Russian J. of Applied Chemistry. 2003. Vol. 76. P. 896.
 53. Адсорбция, удельная поверхность, пористость / Под ред. С. Грег, К. Синг. М.: Мир, 1984. 306 с.
-
-

ISOLATION OF CHITIN-CONTAINING COMPLEXES FROM THE THALLI OF THE LICHEN SPECIES *PELTIGERA APHTHOSA*

O.S. Brovko — N.P. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russia. ORCID: 0000-0002-1961-7831. E-mail: brovko-olga@rambler.ru

A.D. Ivakhnov — N.P. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russia; M.V. Lomonosov Northern (Arctic) Federal University, Arkhangelsk, Russia. ORCID: 0000-0003-2822-9192. E-mail: ivahnov-tema@yandex.ru (*for reference*)

D.V. Zhiltsov — N.P. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russia. ORCID: 0000-0002-1155-4135. E-mail: dnorton.usa@gmail.com

T.A. Boitsova — N.P. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russia. ORCID: 0000-0002-3899-7243. E-mail: tboitsova@yandex.ru

A chitin-containing complex was obtained from the thalli of the foliose lichen *Peltigera aphthosa* by supercritical fluid extraction (SCFE) and acid-base hydrolysis. Using an active planned experiment, the optimal SCFE conditions are defined, which allowed us to obtain a complex with a yield of 96 % and the sorption capacity of the methylene blue dye as high as 125 mg/g. It is shown that the obtained sorbents possess a polyampholytic nature, and their morphology and chemical composition are characterized. The SCFE method is shown to be highly efficient in comparison with the acid-alkaline hydrolysis method in the production of chitin-containing complexes via the processing of lichen raw materials.

Key words: supercritical fluid extraction, carbon dioxide, acid-base hydrolysis, epigeous lichen, *Peltigera aphthosa*, chitin-containing complex.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded with the financial support of the Ministry of Economic Development, Industry and Science of the Arkhangelsk Region within the framework of the project «Obtaining a new chitin-containing material (product) for veterinary and biological purposes from promising plant sources of the Arkhangelsk Region» (agreement No. 2 dated September 22, 2021), the Ministry of Science and Higher formation of the Russian Federation

in terms of supercritical fluid extraction (project No. FSRU-2021-0009. Instrumentation of the Core Facility Center «Arktika» of Northern (Arctic) Federal University and «Critical technologies of the Russian Federation in the field of environmental safety of the Arctic» (N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research) was used in this work.

REFERENCES

1. Balabaev V.S., Glotova I.A., Izmajlov V.N. // *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2015. № 1—1. P. 235 (in Rus.).
2. Mukatova M.D., Kirichko N.A., Romanenkova E.N. // *Vestnik MGTU*. 2015. Vol. 18. No 4. P. 641 (in Rus.).
3. Berger L.R.R., Stamford T.C.M., Stamford-Arnaud T.M., de Alcântara S.R.C., da Silva A.C., da Silva A.M., do Nascimento A.E., de Campos-Takaki G.M. // *Intern. J. of Molecular Sciences*. 2014. Vol. 15. No 5. P. 9082.
4. Gorovoj L.F., Kosyakov V.N. // *Biopolimery i kletka*. 1996. Vol. 12. No 4. P. 49 (in Rus.).
5. Unrod V.N., Solodovnik T.V. // *Biopolimery i kletka*. 2001. Vol. 17. № 6. P. 526 (in Rus.).
6. Khitozan / Pod red. K.G. Skryabina, S.N. Mikhajlova, V.P. Varlamova. M.: Centr «Bioinzhenneriya» RAN, 2013. 593 p. (in Rus.).
7. Honegger R., Bartnicki-Garcia S. // *Mycological Research*. 1991. Vol. 95. No 8. P. 905.
8. Gimel'brant D.E., Stepanchikova I.S., Kuznecova E.S. // *Novosti sistematiki nizshikh rastenij*. 2009. Vol. 43. P. 150 (in Rus.).
9. Kaya M., Gokhan Halıcı M., Duman F., Erdogan S., Barane T. // *Natural Product Research*. 2015. Vol. 29. No 13. P. 1280 (in Rus.).
10. Palmquist K. // *New Phytologist*. 2000. Vol. 148. P. 11.
11. Lishajniki — indikatory radioaktivnogo zagryazneniya / Pod red. L.G. Byazrova. M.: Izd-vo KMK, 2005. 476 p. (in Rus.).
12. Ivshin V.P., Ivshina T.N., Sharnina F.F., Artamonova S.D. // *Polymer Science. Series B*. 2007. Vol. 49. No 11—12. P. 305.
13. Ushakova N.A., Doncov A.E., Sakina N.L., Ratnikova I.A., Gavrilova N.N., Garmash N.Yu., Bastrakov A.I., Kozlova A.A. // *Izvestiya RAN. Seriya B*. 2018. No 1. P. 55 (in Rus.).
14. Meichik N.R., Vorob'ev D.V. // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2012. Vol. 48. No 3. P. 307.
15. Zhil'cov D.V., Brovko O.S., Palamarchuk I.A., Bojcova T.A., Bogolicyn K.G., Chukhchin D.G. // *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo centra RAN*. 2018. No 3—3. P. 9 (in Rus.).
16. Kazakov A.V., Zlotnikov K.M., Vinokurova N.G., Zlotnikov A.K. // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2007. Vol. 43. No 4. P. 449.
17. Zhizn' rastenij. Tom 1. Vvedenie. Bakterii i aktinomicety / Pod red. N.A. Krasil'nikova, A.A. Uranova. M.: Prosveshchenie, 1974. 487 p. (in Rus.).
18. Osovskaya I.I., Budilina D.L., Tarabukina E.B., Nud'ga L.A. *Khitin-glyukanovye komplekсы (fiziko-khimicheskie svoystva i molekulyarnye kharakteristiki): uchebnoe posobie*. S.-Peterburg: SPbGTURP, 2010. 54 p. (in Rus.).
19. Brovko O.S., Palamarchuk I.A., Bojcova T.A., Bogolicyn K.G., Val'chuk N.A., Ivakhnov A.D. // *Fundamental'nye issledovaniya*. 2015. No 11. P. 659 (in Rus.).
20. Zhil'cov D.V., Brovko O.S., Bogolicyn K.G., Ivakhnov A.D., Palamarchuk I.A., Bojcova T.A. // *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2018. No 11—2. P. 210 (in Rus.).
21. Brovko O.S., Ivakhnov A.D., Palamarchuk I.A., Boitsova T.A. // *Russ. J. Phys. Chem. B*. 2017. No 11. P. 1306.
22. Boitsova T.A., Brovko O.S., Ivakhnov A.D., Zhiltsov D.V. // *Russ. J. Phys. Chem. B*. 2020. Vol. 14. No 7. P. 1135.
23. Ivakhnov A.D., Sadkova K.S., Sobashnikova A.S., Skrebets T.E. // *Russ. J. Phys. Chem. B*. 2019. No 13. P. 1135.
24. Brovko O.S., Ivakhnov A.D., Boitsova T.A., Zhiltsov D.V. // *Russ. J. Phys. Chem. B*. 2021. Vol. 15. No 8. P. 1273.
25. Kershengol'c E.B., Shejn A.A., Kershengol'c B.M. // *Nauka i obrazovanie*. 2005. No 2(38). P. 74 (in Rus.).
26. Kassama L.S., Shi J., Mittal G.S. // *Separation and Purification Technology*. 2008. Vol. 60. P. 278 (in Rus.).

27. *Amyrgialaki E., Makris D.P., Mauromoustakos A., Kefalas P.* // Industrial Crops and Products. 2014. Vol. 59. P. 216.
 28. *Derrien M., Aghabararnejadd M., Gosselin A., Desjardins Y., Angersac P., Boumghar Y.* // LWT — Food Science and Technology. 2018. Vol. 93. P. 79.
 29. *Hviyuzova K.A., Bogdanovich N.I., Voropaeva N.L., Karpachev V.V.* // Khimiya rastitel'nogo syr'ya. 2020. No 1. P. 337 (in Rus.).
 30. Statistika v planirovanii ehksperimenta v tekhnike i nauke / Per. s angl. N. Dzhonson, F. Lion. Moskva: Mir, 1980. 610 p. (in Rus.).
 31. *Nazarov N.G.* Prakticheskoe rukovodstvo po resheniyu izmeritel'nykh zadach na osnove optimal'nykh planov izmerenij. M.: Izd-vo MGTU im. N.H. Baumana, 2007. 164 p. (in Rus.).
 32. *Kokosa J.M., Przyiazny A., Jeanott M.* Solvent Microextraction: Theory and Practice. New York, 2009. 323 p.
 33. Praktikum po biokhimmii / Pod red. S.E. Severenina, G.A. Solov'evoy. M.: Izd-vo MGU, 1989. 509 p. (in Rus.).
 34. Planirovanie ehksperimenta v primerakh i raschetakh: uchebn. posobie / Pod red. N.I. Bogdanovicha, L.N. Kuznecovoy, S.I. Tret'yakova, V.I. Zhabina. Arkhangel'sk: Izd-vo SAFU, 2010. 126 p. (in Rus.).
 35. *Ivshina T.N., Ivshin V.P., Sharnina F.F., Artamonova S.D.* // Applied Biochemistry and Microbiology. 2009. Vol. 45. No 3. P. 313.
 36. *Sushinskaya N.V., Kurchenko V.P.* // Teoreticheskaya i prikladnaya ehkologiya. 2019. No 4. P. 83 (in Rus.).
 37. GOST 23042-2015. M.: Myaso i myasnye produkty. Metody opredeleniya zhira. M.: Standartinform, 2019 (in Rus.).
 38. *Pavlova O.V., Belova E.A., Trockaya T.P.* // Nauchnye raboty. 2014. Vol. 2. No 46. P. 121.
 39. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii. Moskva: Nauchnyj centr ehkspertizy sredstv medicinskogo primeneniya, 2008. 704 p. (in Rus.).
 40. *Kostina A.M., Babickaya V.G., Lobanok A.G.* // Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. 1978. Vol. 16. No 4. P. 586 (in Rus.).
 41. *Brovko O.S., Zhiltsov D.V., Ivakhnov A.D., Bogdanov M.V.* // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2021. Vol. 47. No 7. P. 1424.
 42. *Karmanov A.P., Kocheva L.S., Borisenkov M.F.* // Butlerovskie soobshcheniya. 2016. Vol. 45. No 1. P. 76 (in Rus.).
 43. *Lishaj A.V., Savickaya T.A., Cygankova N.G., Grinshpan D.D., Chen D.* // Zhurnal BGU. Khimiya. 2021. No 1. P. 58 (in Rus.).
 44. GOST 4453-74. M.: Ugol' aktivirovannyj osvetlyayushchij drevesnyj poroshkoobraznyj. M.: Izd-vo standartov, 1976 (in Rus.).
 45. *Nikolaev V.G., Gerashchenko I.I., Kartel' N.T., Gurina N.M., Bakalinskaya O.N., Sarnackaya V.V., Snezhkova E.A., Bardakhivskaya K.I., Sakhno L.A.* // Poverkhnost'. 2011. Vol. 3(18). P. 310 (in Rus.).
 46. *Khokhlova T.D., Khien L.T.* // Vestnik MGU. Seriya 2. Khimiya. 2007. Vol. 48. No 3. P. 157 (in Rus.).
 47. *Reshetnikova V.I.* // Khimiko-farmaceuticheskij zhurnal. 2003. Vol. 37. No 5. P. 28 (in Rus.).
 48. *Veprikova E.V., Kuznecova S.A., Skvorcova G.P., Shchepko M.L.* // Zhurnal SFU. Khimiya. 2008. Vol. 3(1). P. 286 (in Rus.).
 49. *Harki E., Talou, T., Dargent R.* // Food Chemistry. 1997. Vol. 58. P. 69.
 50. *Mbonyiryivuze A., Mwakikunga B., Dhlamini S. M., Maaza M.* // Materials, Chemistry and Physics 2015. Vol. 3. No 2. P. 25.
 51. *Alzaydien A.S.* // Am. J. of Environmental Sciences. 2009. Vol. 5. No. 3. P. 197.
 52. *Mukhina O.Yu., Piskunova I.A., Lysenko A.A.* // Russian J. of Applied Chemistry. 2003. Vol. 76. P. 896 (in Rus.).
 53. Adsorbciya, udel'naya poverkhnost', poristost' / Pod red. S. Greg, K. Sing. Moskva: Mir, 1984. 306 p. (in Rus.).
-
-