



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programos II kurso studentė

Giedrė JAKUBAUSKAITĖ

Magistro baigiamasis darbas

Chitozano nanodalelių sintezė iš pelėsinų grybų

Darbo vadovas: Prof. dr. (HP) L. Kalėdienė

Konsultantas: doktorantas R. Bikmurzin

Vilnius, 2020

Chitozano nanodalelių sintezė iš pelėsinių grybų

Darbas atliktas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre, Biomokslų institute.

Darbą atliko: Giedrė JAKUBAUSKAITĖ

Darbo vadovas: Prof. dr. (HP) L. KALĖDIENĖ

Konsultantas: doktorantas R. BIKMURZIN

TURINYS

SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1 Chitozano fizikinės ir cheminės savybės	8
1.1.1 Molekulinė struktūra	8
1.1.2 Deacetilinimo laipsnis	9
1.1.3 Chelatų sudarymas	9
1.1.4 Tirpumas	10
1.2 Chitozano biologinės savybės	11
1.2.1 Bioskaidumas	11
1.2.2 Antioksidacinis aktyvumas	12
1.2.3 Biologinis suderinamumas	13
1.2.4 Antimikrobinis aktyvumas	13
1.3 Chitozano šaltiniai	16
1.3.1 Komerciniai šaltiniai	16
1.3.2 Alternatyvūs šaltiniai	17
1.4 Chitozanas nanotechnologijoje	19
1.4.1 Nanodalelių klasifikacija	19
1.4.2 Chitozano nanodalelių paruošimo būdai	21
1.4.3 Chitozano nanodalelių panaudojimas	25
2. METODIKA	29
2.1 Darbe naudotos medžiagos, prietaisai, terpės	29
2.1.1 Darbe naudotos medžiagos	29
2.1.2 Darbe naudoti prietaisai	29
2.1.3 Darbe naudotos mitybinės terpės	29
2.2 Pelėsinų grybų išskyrimas ir auginimas	29
2.2.1 Pasėlių paėmimas	29
2.2.2 Pelėsinų grybų kultivavimo sąlygos	30
2.2.3 Pelėsinų grybų identifikavimas	30
2.3 Chitozano išskyrimas	30
2.3.1 Chitozano išskyrimas iš pelėsinų grybų	30
2.3.2 Chitozano išskyrimas iš komercinio chitino	31

2.3.3 Paviršiaus morfologijos įvertinimas	31
2.3.4 Biopolimerų identifikavimas	32
2.3.5 Deacetilinimo laipsnio nustatymas	32
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	33
3.1 Mikroorganizmų atranka	33
3.2 Biopolimerų išeigos įvertinimas	33
3.3 Chitino ir chitozano struktūrinė analizė	34
3.3.1 Chitino paviršiaus charakterizavimas	34
3.3.2 Chitozano paviršiaus charakterizavimas	35
3.3.3 Chitozano identifikavimas taikant FTIR	37
3.3.4 Chitino kristalinės formos nustatymas	39
3.3.5 Chitozano identifikavimas taikant BMR	41
5. NUMATYTI EKSPERIMENTAI	44
5.1 Chitino deacetilinimas ir analizė	44
5.2 Chitozano molekulinės masės nustatymas	44
5.3 Chitozano antimikrobinio poveikio nustatymas	45
5.4 Chitozano nanodalelių sintezė	45
5.5 Chitotano nanodalelių paviršiaus morfologijos įvertinimas	46
IŠVADOS	46
SANTRAUKA	47
SUMMARY	49
LITERATŪROS SĄRAŠAS	50

SANTRUMPOS

BMR – Branduolių magnetinio rezonanso spektroskopija

Da – baltymų molekulinės masės vienetas, lygus $1,66 \times 10^{-27}$ kg

FTIR – Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija

LPS – lipopolisacharidas

RDF – reaktyvios deguonies formos

SEM – Skenuojanti elektroninė mikroskopija

ŽSA – Žmogaus serumo albuminas

IVADAS

Pastaruoju metu biopolimeras chitozanas sulaukia vis didesnio mokslininkų susidomėjimo. Chitozanas yra katijoninis linijinis biopolimeras, sudarytas iš pasikartojančių D-gliukozamino ir N-acetil-D-gliukozamino vienetų, sujungtų β -(1-4) glikozidiniais ryšiais (Yadu et al., 2017). Šis biopolimeras deacetilinimo būdu išgaunamas iš chitino, antro labiausiai pasaulyje paplitusio polisacharido po celiuliozės. Chitozanas yra netoksiškas, pasižymi biologiniu suderinamumu ir biologiniu suirimu, todėl yra plačiai pritaikomas įvairiose pramonės srityse, tokiose kaip farmacija, maisto pramonė, žemdirbystė ar aplinkos apsauga (Frank et al., 2020).

Dažniausiai farmacijos srityje chitozanas tiriamas kaip nanodaleles formuojantis polimeras. Nanodalelės – tai kietosios dalelės, kurių matmuo yra mažesnis nei 100 nm. Dėl savo mažo tūrio ir sąlyginai didelio paviršiaus ploto, šios dalelės pasižymi didesniu reaktyvumu, stabilumu ir mechaniniu stiprumu nei didesnės dalelės (Ealias ir Saravanakumar, 2017). Chitozanu gali būti padengiamos polimerinės, lipidinės ar metalo pagrindu pagamintos nanodalelės, kurios įprastai naudojamos kaip vaistų ar kitų veikliųjų medžiagų nešikliai. Tokiu būdu pagerinamas vaistų pernašos efektyvumas: padidėja dalelių stabilumas, kontroliuojamas vaisto išskyrimas, skatinama mukoadhezija bei skverbimasis į audinius (Agotegaray et al., 2016; Cé et al., 2016).

Chitozано panaudojimui didėjant ir plečiantis pritaikymo sritims tampa vis aktualesnė jo gavyba. Dažniausias chitino išskyrimo objektas yra vėžiagyviai, tokie kaip krabai ar krevetės. Įdiegus tvarias perdirbimo technologijas vėžiagyviai panaudojami kaip šalutiniai jūros gėrybių perdirbimo produktai. Tokiu būdu tausojama aplinka, nes atsiranda galimybė pritaikyti gamybos atliekas kitose srityse (Elsoud ir Kady, 2019). Tačiau literatūroje esama duomenų apie galimybes chitozaną išskirti ir iš kitų objektų, tokių kaip pelėsiniai grybai (Ghormade ir Pathan, 2017). Daugumoje grybų chitinas aptinkamas kaip pagrindinis ląstelės sienelės fibrilinis polimeras, palaikantis ląstelės vientisumą, struktūrą ir formą. Chitino ir chitozано gavyba iš pelėsinių grybų micelio pastaruoju metu sulaukia vis didesnio dėmesio dėl reikšmingų pranašumų lyginant su šios produkcijos gavyba iš vėžiagyvių, tokių kaip mažesnis neorganinių medžiagų kiekis, kuris sutrumpina ekstrakcijos laiką ir sumažina išteklius bei alerginių baltymų nebuvimas (Elsoud ir Kady, 2019). Be to, mikromicetų micelį galima išgauti fermentuojant, todėl toks chitozanas turi gana pastovias savybes, o jo prieinamumas nepatiria nei geografinių, nei sezoninių apribojimų (Muslim et al., 2018).

Įvairūs mikromicetai, tokie kaip *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor rouxii*, *Rhizopus arrhizus* plačiai naudojami antibiotikų ir kitų vaistų gamyboje, taip pat organinių rūgščių ir

fermentų gamyboje. Sparčiai vystantis biotechnologijų pramonei, po fermentacijos procesų lieka didelis kiekis mikroorganizmų biomasės atliekų, kurios galėtų būti panaudotos grybinės kilmės chitozono išskyrimui. Esant tokiai situacijai yra aktualu vystyti tyrimus apie chitozono išskyrimą iš mikromicetų biomasės ir jo pritaikymą.

Šiame darbe kaip alternatyvus chitozono išskyrimo objektas nanodalelių sintezei pasirinkti *Penicillium* sp. pelėsniai grybai. Jie gausiai paplitę aplinkoje, todėl *Penicillium* sp. išskyrimas yra nesudėtingas, o remiantis literatūros duomenimis yra žinoma, kad sausoje jų micelio biomaseje galima aptikti iki 29,7 % chitozono (Ebrahimzadeh, et al., 2013).

Darbo tikslas yra išskirti chitozaną iš *Penicillium* sp. pelėsinių grybų ir susintetinti chitozono nanodaleles.

Darbo uždaviniai:

1. Išskirti chitiną ir chitozaną iš *Penicillium* sp. micelio taikant cheminį metodą.
2. Įvertinti chitino ir chitozono fizikinius-cheminius rodiklius.
3. Atlikti chitozono antimikrobinio aktyvumo įvertinimą taikant difuzijos į agarą metodą.
4. Atlikti chitozono nanodalelių sintezę taikant desolvacijos metodą.

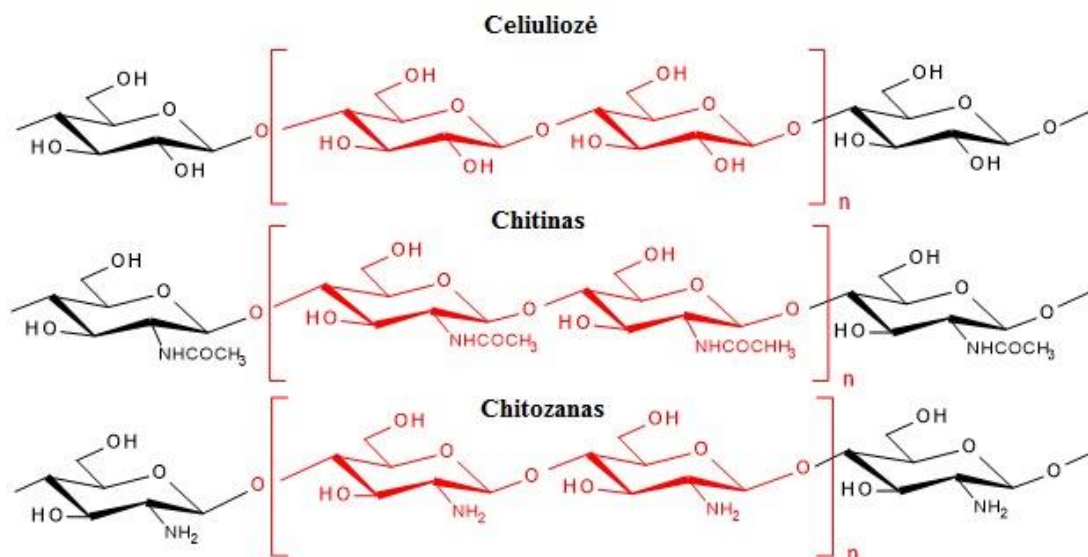
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Chitozano fizikinės ir cheminės savybės

Chitozanas yra linijinis biopolimeras, sudarytas iš pasikartojančių D–gliukozamino ir N–acetil–D–gliukozamino vienetų, sujungtų β –(1–4) glikozidiniais ryšiais (Yadu et al., 2017). Chitozanas išgaunamas iš chitino, antro labiausiai paplitusio polisacharido gamtoje po celiuliozės. Chitozano polimerinių grandinių sudėtis ir dydis skiriasi priklausomai nuo šio polisacharido kilmės ir chitino deacetilinimo sąlygų (Sánchez–Machado et al., 2018). Remiantis Rinaudo (2006), kietas chitozanas apibūdinamas kaip pusiau kristalinis polimeras, kuris pasižymi balta arba gelsva spalva.

1.1.1 Molekulinė struktūra

Biopolimero molekulinė masė svyruoja nuo 10 kDa iki 1 MDa. Chitozanas turi D–gliukozamino grandinės struktūrą ir reaktyvias funkcines grupes: vieną pirminę amino grupę C–2 pozicijoje bei dvi hidroksilo grupes C–3 ir C–6 pozicijose, kurios sudaro tarpmolekulinius vandenilinius ryšius ir lemia polimero stabilumą (1 pav.) (Sánchez–Machado et al., 2018).

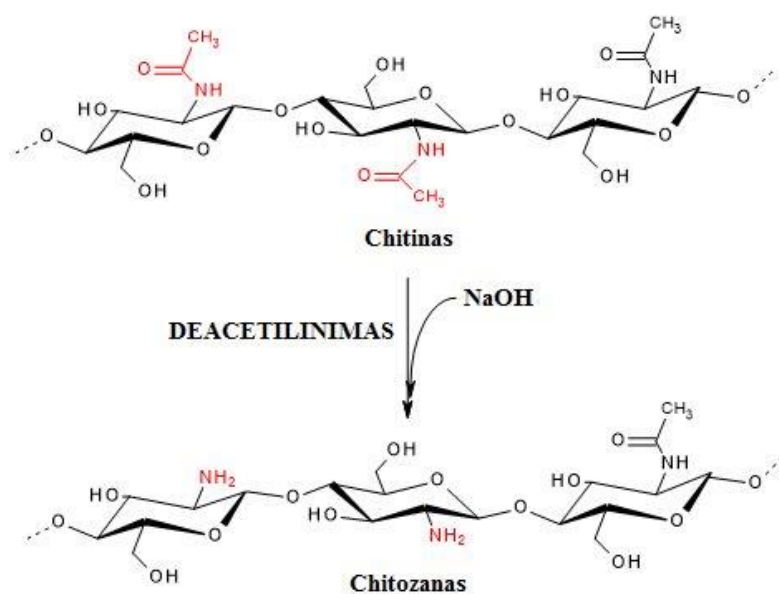


1 pav. Celiuliozės, chitino ir chitozano cheminės struktūros.

Modifikuojant amino ir hidroksilo funkcines grupes galima išgauti skirtingus chitozano darinius (Yadav et al., 2011).

1.1.2 Deacetilinimo laipsnis

Deacetilinimo laipsnis laikomas vienu svarbiausiu chitozano charakterizavimo parametru, kuris daro įtaką chitozano savybėms ir pritaikymui. Deacetilinimo proceso metu chitino acetilo grupė (C_2H_3O) yra pašalinama, todėl susidaro amino grupė (NH_2) (2 pav.) Cheminis chitino deacetilinimas šarminėmis sąlygomis yra pagrindinis chitozano išgavimo būdas (Sivashankari ir Prabakaran, 2017). Galimas ir fermentinis chitino deacetilinimas, naudojant deacetilazes, tačiau jis taikomas rečiau, dėl didelės proceso savikainos (Yadav et al., 2019).



2 pav. Chitino šarminio deacetilinimo reakcijos schema.

Kadangi chitozano molekulės D–gliukozamino vienete randama susidariusi amino grupė, deacetilinimo laipsnis naudojamas išreikšti procentinę D–gliukozamino dalį bendrame N–acetil–D–gliukozamino kiekyje. Deacetilinis chitinas, kurį sudaro daugiau kaip 50 % deacetilintų vienetų yra laikomas chitozanu (Rodríguez–Vázquez et al., 2015; Sivashankari ir Prabakaran, 2017). Tačiau chitino deacetilinimas beveik niekada nėra baigtinis reiškinys ir chitozanas (arba deacetilintas chitinas) visada turi tam tikrą skaičių acetilo grupių (Islam et al., 2017).

1.1.3 Chelatų sudarymas

Laisvos amino grupės buvimas suteikia chitozanui teigiamą krūvį, todėl jis gali reaguoti su neigiamą krūvį turinčiais polimerais ir paviršiais (Yadav et al., 2011). Ši funkcinė grupė padaro chitozaną geru chelatiniu agentu, kuris dėl elektrostatiškumo gali surišti didelę įvairovę

metalų jonų ir absorbuoti dažų anijonus (Knidri et al., 2018). Chitozanas metalų jonus gali prisijungti trimis būdais: 1) per jonų mainus, 2) absorbciją ir 3) chelaciją. Dažniausiai po chelacijos įvyksta spalviniai pasikeitimai, pavyzdžiui, chitozanas ir titano jonai suformuoja raudonus chelatus, chitozanas ir metavanadatas bei chitozanas ir šešiavalentis chromas suformuoja oranžinius chelatus, žalią chelatą suformuoja chitozanas ir trivalentis chromas bei chitozanas ir nikelio jonai, geltonai–rudą chelatą formuoja chitozana. Chitozanas nesudaro chelatų su šarminiais metalais arba su šarminių žemių metalais. Tačiau chitozanas gali atskirti pereinamųjų metalų jonus nuo šarminių ar šarminių žemių metalų tirpalo, sudarydamas su jais chelatus (Yao et al., 2017).

1.1.4 Tirpumas

Cheminiu požiūriu chitozanas yra silpna bazė ir netirpsta vandenyje bei organiniuose tirpikliuose, tačiau gerai tirpsta net ir labiausiai praskiestose rūgštyse. Romanazzi ir kolegų (2009) atlikto tyrimo metu buvo iširtos skirtingos rūgštys (1%), siekiant įvertinti jų gebėjimą ištirpinti chitozana (1 lentelė). Nustatyta, kad chitozanas lengvai tirpsta acto, skruzdžių, pieno, maleino, maliko, fosforo ir sukcinato rūgštyse, o šildant tirpsta ir L–askorbo, L–glutamo bei druskos rūgštyse, tačiau netirpsta galinėje ir poligalakturono rūgštyse, net ir šildant jas.

1 lentelė. Rūgštys, naudojamos chitozono tirpinimui (pagal Romanazzi et al., 2009).

Rūgšis	Tirpalo (1%) pH	Gebėjimas ištirpinti chitosaną ^a
Acto	2,8	Taip
L–askorbo	2,7	Taip ^b
Boro	5,0	Ne
Skruzdžių	2,2	Taip
Galo	2,9	Ne
L–glutamo	2,6	Taip ^b
Druskos	0,6	Taip ^b
Pieno	2,4	Taip
Malo	1,5	Taip
Obuolių	2,3	Taip
Fosforo	1,4	Taip
Poligalakturono	3,0	Ne
Sukcinato	2,6	Taip
<i>Trans</i> –cinaminė	2,9	Ne

^a Chitozono ištirpimas rūgštyje įvertintas vizualiai.

^b Rūgštis turėjo būti šildoma, kad chitozanas ištirptų.

Šio polimero tirpumą rūgštinėje terpėje lemia laisvosios amino grupės protonavimas, dėl kurio NH_2 virsta į NH_3^+ , o chitozanas vandeniniame tirpale tampa stipriu katijoniniu polielektrolitu (Muslim et al., 2018). Kai pH padidėja iki 6 ir daugiau, chitozano amino grupė deprotonuoja, todėl polimeras praranda savo krūvį ir precipituoja (Zargar et al., 2015).

Chitozano tirpumas priklauso ne tik nuo tirpiklio pH, bet ir nuo kelių kitų parametru, tokių kaip deacetilavimo laipsnis, molekulinė masė ar biopolimero koncentracija. Kadangi didelė chitozano molekulinė masė riboja chitozano tirpumą, todėl daugelyje tyrimų siekiama ją sumažinti (Chuan et al., 2019).

1.2 Chitozano biologinės savybės

1.2.1 Bioskaidumas

Chitozanas laikomas biologiškai suvirančia medžiaga. Šią savybę lemia tai, kad chitozanas yra polisacharidas ir turi nutrūkti galinčius glikozidinius ryšius. Biopolimero skilimo greitis priklauso nuo jo molekulinės masės, deacetilavimo laipsnio ir *N*-acetil D-gliukozamino liekanų pasiskirstymo (Zhang et al., 2016). Ryšys tarp chitozano biologinio skaidumo ir deacetilavimo laipsnio taip pat priklauso nuo kristališkumo. Chitozanas yra pusiau kristalinis polimeras, jo kristališkumas yra didžiausias, kai deacetilavimo laipsnis lygus 0% (chitino forma) arba 100% (visiškai deacetilintas chitozanas), ir mažėja esant tarpiniam deacetilavimo laipsniui. Biologinio skilimo greitis didėja, kai kristališkumas mažėja, tuomet chitozano deacetilavimo laipsnio vertė artima 60% (Matica et al., 2017). Taip pat yra žinoma, kad mažesnės molekulinės masės chitozanas skaidomas efektyviau, nei turintis didesnę molekulinę masę (Jiang et al., 2014).

In vivo chitozanas suskaidomas fermentų, kurie hidrolizuoja gliukozamino-gliukozamino, gliukozamino-*N*-acetil-gliukozamino ir *N*-acetil-gliukozamino-*N*-acetil-gliukozamino ryšius (Yadu et al., 2017). Chitinazės, chitobiazės ir kiti fermentai, galintys skaidyti chitozaną yra plačiai paplitę tarp organizmų, tokių kaip gyvūnai, augalai, mielės ar prokariotai (Lizardi-Mendoza et al., 2016). Stuburiniuose gyvūnuose chitozanas dažniausiai skaidomas lizocimo – nespecifinio fermento, esančio visuose žinduolių audiniuose. Be lizocimo, žmonėse nustatyti ir trys žmogaus chinatazės formos, kurios buvo kruopščiai iširtos ir parodė hidrolizinį poveikį chitozanui ir jo dariniams: tai rūgštinė žinduolių chitinazė, di-*N*-acetilchitobiazė ir chitotriozidazė. Šie fermentai nustatyti plazmoje, kepenyse ir virškinimo trakte. Biologinis chitozano skaidumas lemia netoksiškų oligosacharidų susidarymą. Šie įvairaus ilgio oligosacharidai gali būti įtraukiami į metabolinius kelius sintetinant gliukozamino glikanus ir glikoproteinus arba tiesiog pašalinti (Matika et al., 2017).

In vitro chitozanas skaidomas oksidacijos, cheminės ar fermentinės hidrolizės būdu. Paprastai šie metodai naudojami gaminant mažos molekulinės masės chitozaną kontroliuojamomis sąlygomis (Ma et al., 2014). Fermentinis chitozanos skaidymas vyksta efektyviausiai, kai naudojami specifiniai, bet tuo pačiu ir brangūs chitinazės ir chitozanasės grupių fermentai, kurie gali būti išskiriami iš mikroorganizmų, tokių kaip bakterijos ar mielės, aukštesniųjų augalų ir kt. (Kean ir Thanou, 2010). Tačiau fermentinė hidrolizė gali būti vykdoma naudojant fermentus iš hidrolazės glikozidinės (celiuliazės) grupės, kurie yra plačiai prieinami ir pigūs. Tokius fermentus, pasižyminčius aukštu hidroliziniu aktyvumu, gamina pelėsinių grybų gentys, tokios kaip *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* ir *Fusarium* (Wiśniewska-Wrona, 2007).

1.2.2 Antioksidacinis aktyvumas

Reaktyvios deguonies formos (RDF) gali sukelti oksidacinę žalą organizmui. Esant normaliam metabolizmui, organizmas aprūpinamas pakankamu kiekiu antioksidantų, kurie veikia organizmo generuojamas RDF (Prashanth ir Tharanathan, 2005). Tačiau per didelė RDF gamyba arba per mažas oksidantų kiekis sukelia oksidacinį stresą, kuris gali lemti įvairius organizmo sutrikimus ar mirtį (Essick ir Sam, 2010). Pavyzdžiui, oksidacinis stresas gali lemti vėžio, diabeto, aterosklerozės, artrito ir lėtinio uždegimo atsiradimą ar progresą (Halliwell, 2011).

RDF gali reaguoti su aktyviais vandenilio atomais chitozanos hidroksilo arba amino grupėse, to pasekoje suformuojant labai stabilų makromolekulinį radikalą. Maža molekulinė masė ir didelė koncentracija daro teigiamą poveikį chitozanos antioksidaciniam aktyvumui. Be to, nustatyta, kad didesnė molekulinė masė veiksmingai mažina lipidų oksidaciją (Vinsova ir Vavrikova, 2011).

Atlikta nemažai tyrimų, kuriuose chitozanas tiriamas kaip galimas antioksidantas. Nustatyta, kad chitozanas slopino fosfatidilcholino ir linoleato liposomų lipidų peroksidaciją (Feng et al., 2008). Yen ir kolegų (2008) atliktame tyrime buvo tiriamas žmogaus serumo albuminas (ŽSA), kuris laikomas pagrindiniu oksidacinio streso taikiniu sergant uremija. Dėl oksidacinio streso didėja ŽSA karbonilo darinių kiekis. Šiame tyrime naudotas mažos molekulinės masės chitozanas neleido susidaryti karbonilo ir hiperoksido grupėms ŽSA, kuris buvo veikiamas peroksilo radikalų. Kitame tyrime gydymas chitozanu keturias savaites sumažino oksiduoto albumino kiekį ir padidino bendrą antioksidantų kiekį plazmoje (Anraku et al., 2009).

1.2.3 Biologinis suderinamumas

Biologinį suderinamumą galima apibūdinti kaip junginio ar medžiagos gebėjimą kontaktuoti su gyva sistema nesukeliant jai neigiamo poveikio (Vert et al., 2012; Wiśniewska-Wrona, 2007). Atlikta daugybė tyrimų *in vitro*, siekiant įvertinti chitozano ir chitozano pagrindu pagamintų sistemų biologinį suderinamumą, naudojant įvairius ląstelių tipus, tokius kaip fibroblastai, osteoblastai, chondrocitai, endotelio ląstelės, nervinės ląstelės, hepatocitai, kraujagyslių ir vėžinės ląstelės. Rezultatai parodė, kad chitozanas yra netoksiškas ir gali skatinti šių ląstelių adheziją bei proliferaciją. Tai rodo, kad chitozanas yra suderinamas su šiais ląstelių tipais (Jiang et al., 2014).

In vivo chitozano pagrindu pagamintų produktų veiksmingumas įvertintas naudojant įvairius gyvūnų modelius, dažniausiai peles ir žiurkes. Šio biopolimero toksiškumas LD50 yra apie 16 g/kg, kuris yra panašus į druskos ar cukraus toksiškumą (Lizardi–Mendoza et al., 2016). Kadangi chitozanas naudojamas implantų gamyboje buvo nustatyta, kad chitozano pagrindu pagamintos implantų medžiagos paprastai sukelia minimalią ar normalią svetimkūnio reakciją (Molinaro et al., 2002). Tyrime naudotoms žiurkėms po implantacijos stebimas normalus granuliacinio audinio formavimasis. Šie simptomai priskiriami tipiškai gijimo eigai. Manoma, kad stimuliuojantis chitozano poveikis imuninėms ląstelėms gali paskatinti vietinių ląstelių dauginimąsi ir implantuojamos medžiagos integraciją su šeimininko audiniu (Suh ir Matthew, 2000; Lizardi–Mendoza et al., 2016).

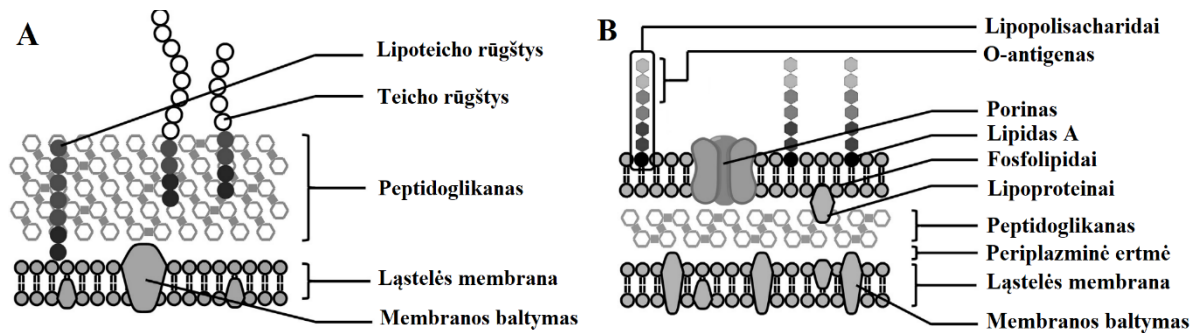
Keleto skirtingų chitozano preparatų biologinio suderinamumo tyrimų rezultatai labai skyrėsi, tai lėmė chitozano fizikinės ir cheminės savybės (daugiausiai deacetilavimo laipsnis ir molekulinė masė) bei eksperimento sąlygos (Agnihotri et al., 2004; Kean ir Thanou, 2010). Buvo pranešta, kad chitozano plėvelių deacetilavimo laipsnis neturi įtakos biologiniam suderinamumui su keratinocitais ir fibroblastais, tačiau turi lemiamą įtaką ląstelių adhezijai ir proliferacijai. Kuo didesnis deacetilavimo laipsnis, tuo mažesnis ląstelių sukibimas (Chupa et al., 2000).

1.2.4 Antimikrobinis aktyvumas

Chitozanas kelia nemažą susidomėjimą dėl įvairaus bioaktyvaus poveikio. Šio biopolimero polikatijoninė prigimtis yra pagrindas sąveikaujant su baltymais, lipidais, genetinė medžiaga, anijoninėmis molekulėmis ir kitais biologiniais junginiais (Lizardi–Mendoza et al., 2016). Dėl šių priežasčių chitozanas geba sukelti antivirusinį, priešgrybelinį ir antibakterinį poveikį (Cheung et al., 2015).

Antibakterinis aktyvumas

Faktiniai antibakterinio aktyvumo procesai gali vykti: 1) pasikeitus bakterijų membranos pralaidumui, 2) įvykus plazminės membranos pažeidimui arba 3) maistingųjų medžiagų patekimo blokavimui. Dėl šių priežasčių gali įvykti ląstelių lizė. Chitozono slopinamojo aktyvumo mechanizmai dažniausiai skiriasi priklausomai nuo tokių veiksnių kaip bakterijos rūšis, molekulinė masė ar deacetilavimo laipsnis (Vinsova ir Vavrikova, 2011). Dėl skirtingų ląstelių paviršiaus ypatybių antibakterinio veikimo mechanizmas skiriasi tarp gramteigiamų ir gramneigiamų bakterijų (3 pav.).



3 pav. Schematinis gramteigiamos (A) ir gramneigiamos (B) bakterijos apvalkalo sandaros vaizdas (pagal Tachaboonyakiat, 2017).

Gramteigiamų bakterijų ląstelių paviršius pasižymi didesniu hidrofiliškumu su neigiamai įkrautomis molekulemis, todėl teigiamai įkrautas chitozanas gali lengviau sukibti su šių bakterijų ląstelės paviršiumi (Younes et al., 2014). Buvo pranešta, kad tarp chitozano ir gramteigiamų bakterijų, tokių kaip *Staphylococcus aureus*, vyksta elektrostatinė sąveika su neigiamai įkrautomis teicho rūgštimis. Tai įvertinta palyginus antibakterinį poveikį *S. aureus* mutantinėms bakterijoms su teicho rūgšties delecija ir bakterijoms be šios mutacijos. Elektrostatinė chitozano sąveika su gramteigiamų bakterijų anijoninėmis teicho rūgštimis gali sutrikdyti citoplazminės membranos dinaminį procesus bei funkcijas ir lemti mažų ląstelės komponentų ištekėjimą (Raafat ir Sahl, 2009).

Kadangi gramneigiamose bakterijose teicho rūgščių nėra, ląstelės sienelė yra mažiau neigiamai įkrauta, o tai įrodo, kad chitozano polikatinoninė prigimtis yra pagrindinis veiksnys, lemiantis jo antibakterinę funkciją (Tachaboonyakiat, 2017). Helander ir kolegų (2001) atlikto tyrimo metu nustatyta, kad chitozano ir gramneigiamų bakterijų, tokių kaip *Escherichia coli*, sąveikos vietos atsiranda dėl elektrosstatinės sąveikos su neigiamais įkrautais lipopolisacharidais (LPS), to pasekoje keičiasi membranos pralaidumas. Tai patvirtina tyrimai, kuriuose lyginamas antibakterinis aktyvumas prieš *Salmonella typhimurium* kamieną, turintį įprastą anijoninį LPS su mutantiniu kamieniu, turinčiu katijoninį LPS (Helander et al., 2001). Elektrostatinė chitozano

sąveika su gramneigiamų bakterijų LPS citoplazminės membranos dinamikai didelės įtakos neturi, nes chitozanas ribojasi tik su išorine membrana. Todėl gramteigiamos bakterijos yra žymiai jautresnės antibakteriniam chitozano poveikiui nei gramneigiamos (Raafat ir Sahl, 2009).

Galimi keli antibakterinio veikimo mechanizmai, priklausomai nuo biopolimero molekulinės masės dydžio: 1) chitozanas, turintis didelę molekulinę masę, formuoja polimerinę membraną ant bakterijos paviršiaus, kuri neleidžia maistinėms medžiagoms patekti į ląstelę ir 2) chitozanas, turintis mažą molekulinę masę skverbiasi į ląstelę dėl elektrostatinės sąveikos su ląstelės paviršiumi (Zheng ir Zhu, 2003). Patekęs į ląstelės vidų, chitozanas geba jungtis su bakterijų DNR, taip slopindamas genų ekspresijos profilį, įskaitant RNR, baltymų sintezę ir peptidoglikano biosintezę (Mooduto et al., 2019).

Antibakterinis aktyvumas padidėja padidėjus chitozano deacetilinimo laipsniui. Tai rodo, kad amino grupės, kaip aktyvios funkcinės grupės, yra būtinos antibakteriniam chitozano veikimui (Chung ir Chen, 2008).

Priešgrybinis aktyvumas

Priešgrybinis chitozano mechanizmo veikimas paremtas teigiamai įkrautos chitozano amino grupės elektrostatine sąveika su neigiamai įkrauta medžiaga grybo ląstelės sienelėje, pavyzdžiui, fosfolipidais. Ši sąveika lemia chitozano membranos sluoksnio susidarymą ant grybo ląstelės, dėl kurios pasikeičia ląstelės membranos pralaidumas. Jam pasikeitus blokuojamas maistinių medžiagų patekimas į ląstelę, sukliamas DNR, RNR ir baltymų sintezės slopinimas bei ląstelės komponentų ištekėjimas (Qin et al., 2020). Be to, DNR, RNR ir baltymų sintezės sutrikimus gali lemti ir chitozano patekimas į ląstelės vidų, kur šis polimeras jungiasi su DNR (Verlee et al., 2017). Márquez ir kolegų (2013) atlikto tyrimo metu buvo nustatyta, kad *Saccharomyces cerevisiae* mieles paveikus chitozanu gali susidaryti mielių mutantai su genų delecijomis, kurie siejami su baltymų sinteze ir ląstelės ciklu (Márquez et al., 2013).

Chitozanas taip pat pasižymi priešgrybiniu poveikiu, slopindamas sporuliaciją ir sporų dygimą, todėl šis biopolimeras dažnai aptiriamas kaip medžiaga, apsauganti nuo gedimo vaisius, uogas ar kitus greitai pelijančius maisto produktus (Gutierrez–Martinez et al., 2018).

Nustatyta, kad chitozanas turi priešgrybelinį poveikį keletui fitopatogeninių grybų, tokių kaip *Penicillium* sp. citrusiniuose vaisiuose, *Botrytis cinerea* agurkuose, *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani* ir *Fusarium oxysporum* pomidoruose (Chi et al., 2015). Chitozano molekulinės masės ir deacetilinimo laipsnio poveikis priešgrybiniam aktyvumui skiriasi priklausomai nuo grybo rūšies (Younes et al., 2014).

Priešvirusinis aktyvumas

Daugelį metų chitozanas buvo žinomas dėl savo antivirusinio poveikio, nors išsamus veikimo mechanizmas išlieka nežinomas. Vienas iš galimų chitozано priešvirusinio poveikio mechanizmų žinduoliuose gali būti susijęs jo gebėjimu grįžtamai suardyti ląstelių glaudžiausias jungtis, taip padidinant vaisto kvarbumą į ląsteles. Manoma, kad į tokias ląsteles gali patekti ir antivirusiniai baltymai, pavyzdžiui, interferonai, defensinai ar peptidai, kuriuos gamina gyvūnai reaguodami į virusinę infekciją (Villa et al., 2017). Kitas veikimo mechanizmas siejamas su viruso adsorbcijos slopinimu. Li su kolegomis (2011) aprašė chitozано pagrindu pagamintų medžiagų pritaikymą gripo viruso prevencijai ir kontrolei. Jie panaudojo chitozaną ir sialilaktozės konjugatą ir nustatė, kad jis ši medžiaga slopina viruso adsorbciją. Konjugato prisijungimas prie viruso hemagliutinino pasižymi aukštu afiniškumu, todėl virusas negali prisijungti prie šeimininko ląstelės.

Yra žinoma, kad chitozanas apsaugo augalus nuo virusų, kuriems būdingos skirtingos struktūros ir genomo ekspresijos mechanizmai, o tai rodo, kad chitozanas gali slopinti infekciją, nepriklausomai nuo viruso tipo, stimuliuodamas paties augalo gynybos mechanizmus (Iriti ir Varoni, 2015). Manoma, kad chitozanas gali sąveikauti su chromatinu ir tiesiogiai paveikti genų raišką, lemiančių gynybinių reakcijų sužadinimą, dėl kurių slopinamas viruso dauginimasis (Malerba ir Cerana, 2016).

Chitozanas ir jo dariniai gali sukelti antiretrovirusinį poveikį keliais mechanizmais. Jis gali: 1) veikti kaip konkurencinis atvirkštinės transkriptazės (RT) inhibitorius (nukleozidų, nukleotidų ir nenukleotidų RT inhibitorius), 2) slopinti proteazę, 3) slopinti ŽIV–1 sukeliančios sincitijos formavimąsi, 4) sąveikauti su CD4 molekulėmis ir 5) slopinti ŽIV–1 gp120 jungimąsi prie šeimininko (Tachaboonyakiat, 2017). Skirtingos molekulinės masės chitozано priešvirusinis aktyvumas ŽIV–1 buvo įvertintas naudojant sulfatuotą chitozaną, kurio molekulinė masė 1–10 kDa (Artan et al., 2010). Buvo nustatyta, kad kuo didesnė molekulinė masė, tuo labiau slopinamas sincitijos formavimasis ir genų replikacija, efektyviausiai infekciją slopino (gp120–CD4 surišimo slopinimas) chitozanas, kurio molekulinė masė buvo 3000–5000 Da. Šie rezultatai teikia vilties, kad chitozanas gali būti pritaikytas ŽIV gydyme.

1.3 Chitozано šaltiniai

1.3.1 Komerciniai šaltiniai

Chitinas, iš kurio išgaunamas chitozanas, yra antras dažniausiai aptinkamas polisacharidas gamtoje po celiuliozės ir gausiausiai randamas polisacharidas jūrinėje

ekosistemoje. Kasmet vandenyno organizmų pagaminta chitino masė siekia 10^{12} – 10^{14} kg (Yadav et al., 2019). Pagrindiniai komercinės chitozono gamybos šaltiniai yra vėžiagyviai. Dažniausiai naudojami krabai ir krevetės, nes jie lengvai prieinami kaip jūros gėrybių perdirbimo pramonės atliekos. Daugiausiai chitino randama vėžiagyvių egzoskelete, čia chitinas sudaro 13–15% krabų ir 14–27% krevetėlių perdirbamų atliekų sausosios masės (Elsoud ir Kady, 2019).

Nors šis komercinio chitino šaltinio pasirinkimas yra draugiškas aplinkai, nes perdirbtos maisto atliekos gali būti panaudotos kitose srityse, jis turi ir trūkumų. Chitino išskyrimą iš vėžiagyvių riboja jūrinių organizmų sezoninė kaita, dėl skirtingų rūšių pasireiškiantis biomasės nevienalytiškumas, alergenai bei didelis mineralų kiekis, kurio perdirbimo procesas užima daug laiko bei reikalauja griežtesnių proceso sąlygų (Bastiaens et al., 2019). Dėl šių priežasčių nuolat ieškomi ir tiriami potencialūs chitino išskyrimo šaltiniai.

1.3.2 Alternatyvūs šaltiniai

Mikroskopiniai grybai

Mikroskopiniai grybai (mikromicetai) – tai grybai, kurių sporos, konidijos ir kiti vaisiakūnius išauginantys organai gerai matomi tik per mikroskopą. Mikromicetai yra labai gyvybingi, plačiai paplitę, prie įvairių aplinkos sąlygų prisitaikantys mikroorganizmai, gebantys aktyviai sintetinti ir į aplinką išskirti mikotoksinus. Dažniau aptinkamos mikromicetų gentys yra šios: *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Candida*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Mucor*, *Monilia*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Sclerotinia*, *Verticillium*, *Zygorhynchus* (Lugauskas, 2009).

Dalis mikroskopinių grybų vadinami pelėsiniais grybais arba pelėsiomis (Masteikienė, 2002). Tai pūkų pavidalo arba aksominės apnašos, kurias sudaro micelio hifai, išsidėstę substrato (augalų, gyvūninės ir augalinės kilmės liekanų) paviršiuje arba jo viduje (Lugauskas, 2009; Prigodina Lukošienė ir Kutorga, 2014). Pelijimą dažnai sukelia *Rhizopus*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor* ir *Penicillium* genčių mikroskopiniai grybai (Lugauskas, 2009).

Daugumoje grybų chitinas aptinkamas kaip pagrindinis ląstelės sienelės fibrilinis polimeras, palaikantis ląstelės vientisumą, struktūrą ir formą. Kai kurie mikroskopiniai grybai pasižymi itin dideliu chitino kiekiu ląstelių sienelėse ir septose (Alagesan et al., 2016). Pavyzdžiui, *Mucor rouxii* micelyje chitinas sudaro 53%, *Aspergillus niger* 33%, *Aspergillus furnigatus* 24%, *Penicillium* sp. 43% visos micelio masės (Latha ir Suresh, 2013).

Chitino ir chitozono gamyba iš mikroskopinių grybų micelio pastaruoju metu sulaukia vis didesnio dėmesio dėl reikšmingų pranašumų lyginant su šios produkcijos gamyba iš

vėžiagyvių (Elsoud ir Kady, 2019). Mikroskopinių grybų micelyje yra mažiau neorganinių junginių, todėl chitino gamyboje nereikia demineralizacijos etapo, be to micelyje nėra alerginių baltymų, kurie randami vėžiagyviuose. Šių grybų micelį galima išgauti fermentuojant, todėl toks chitinas ir chitozanas turi gana pastovias savybes, o jo prieinamumas nepatiria nei geografinių, nei sezoninių apribojimų (Muslim et al., 2018).

Chitinas gali būti išskiriamas iš mikroskopinių grybų, naudojamų komercinėje gamyboje (2 lentelė). Grybų šaltinius, turinčius komercinio chitino/chitozano gamybos potencialo, galima suskirstyti į tris kategorijas:

- 1) biotechnologijų pramonės grybų biomasės atliekos,
- 2) grybai, kurie yra fermentuojami dėl didelio šių polimerų kiekio juose,
- 3) grybai, naudojami kitiems jų natūraliai gaminamiems produktams išgauti (Ghormade et al., 2017).

2 lentelė. Procesai ir juose naudojami mikroskopiniai grybai, kurių biomasės atliekos yra potencialus chitino/chitozano šaltinis (pagal Ghormade et al., 2017).

Procesas	Mikroskopinių grybų rūšis
Alaus ir kepinų gamyba	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>S. carlbergensis</i> .
Antibiotikų ir kiti vaistų gamyba – ciklosporino, cefalosporino, echinokandino B, penicilino ir kt.	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Claviceps pupurea</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>P. griseofulvum</i> .
Organinių rūgščių gamyba – citrinos, fumaro, itakono, pieno rūgšties ir kt.	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Mucor rouxii</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>R. oryzae</i> .
Fermentų gamyba – amilazės, amilogliukozidazės, katalazės, lipazės, lakazės, proteazės, pektinazės, šliužo fermento ir kt.	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. awamori</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>Pyricularia oryzae</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma reesei</i> .

Kinijos vaistų pramonės asociacija pranešė, kad daugiau nei 80% visos antibiotikų produkcijos sudaro penicilinas, kurį gamina kai kurios *Penicillium* rūšys. Proceso metu susidaro 1,2 milijono tonų biologinių atliekų, daugiausia *Penicillium* micelio biomasės. Iš tokio didelio atliekų kiekio galima išskirti chitozaną, kurio kiekis gali siekti 57 g/kg sausos biomasės ir turėti deacetilinimo laipsnį lygų 86% (Ebrahimzadeh et al., 2013; Ghormade et al., 2017).

Kai kurių rūšių grybų sienelėje randama ir paties chitozano. Zigomicetų klasės *Mucor*, *Absidia*, *Benjaminiella*, *Cunninghamella*, *Gongronella* ir *Rhizopus* gentys pripažintos kaip vertingas chitozano šaltinis. Nustatyta, kad sausoje grybų biomasėje chitozano yra 1–10%, o jo deacetilinimo laipsnis siekia 83–94%. Chitozanas nėra sintetinamas tiesiogiai, o yra išgaunamas iš chitino, veikiant deacetilazės fermentų. Tokį polisacharidą galima išskirti taikant mažiau ekstremalias procedūras (Bastiaens et al., 2019).

Vabzdžiai

Chitino yra vabzdžių egzoskelete, taip pat vidinėse struktūrose, tokiose kaip virškinamasis traktas, trachėjų sistema, lytiniai takai ar įvairūs odos liaukų latakai (Zhu et al., 2016). Chitino kiekis skirtingose vabzdžių rūšyse labai skiriasi. Pavyzdžiui, naminėse bitėse (*Apis mellifera*) chitinas sudaro 23–32%, širšuoluose (*Vespa crabro*) 2–10%, kolorado vabaluose (*Leptinotarsa decemlineata*) 7–10%. Taip pat chitino kiekis priklauso nuo vabzdžio gyvenimo ciklo stadijos (Kaya, Sofi, Sargin, & Mujtaba, 2016).

Pastaraisiais metais sparčiai išaugo baltymų gamyba iš agrarinių atliekų, naudojant vabzdžius. Dėl to atsirado gausus chitino šaltinio srautas, kurį sudaro subrendusių lervų išnaros, likučiai po nėrimosi ir negyvi vabzdžiai. Palyginti su vėžiagyviais, vabzdžių šaltinis yra homogeniškesnis (dažniausiai vienos rūšies) ir turi mažesnę mineralų kiekį nei vėžiagyviai (Jardine ir Sayed, 2016). Tačiau chitino išskyrimas iš vabzdžių kol kas atliekamas tik laboratoriniu mastu, nes šis procesas yra mažai ištirtas ir laikomas sąlyginai nauja sritimi (Bastiaens et al., 2019).

Moliuskai

Moliuskai, kaip chitino šaltinis, kelia susidomėjimą dėl didelio šių organizmų atliekų kiekio, liekančio po apdoravimo maisto perdirbimo sektoriuje. Kai kurių galvakojų moliuskų, tokių kaip kalmarų, sepijų ir aštuonkojų endoskeleto sausoje masėje chitino kiekis gali siekti 6–40%, o dvigeldžių moliuskų, pavyzdžiui, austrių kriauklėse 3–6% (Kurita, 2006; Hamed et al., 2016).

Tačiau pramoninio masto chitino išskyrimą iš moliuskų riboja tai, kad chitinu gausios sritys galvakojuose moliuskuose sudaro tik nedidelę viso kūno dalį, o pilvakojų moliuskų kriauklėse chitino kiekis yra santykinai mažas (Abdelmalek et al., 2017).

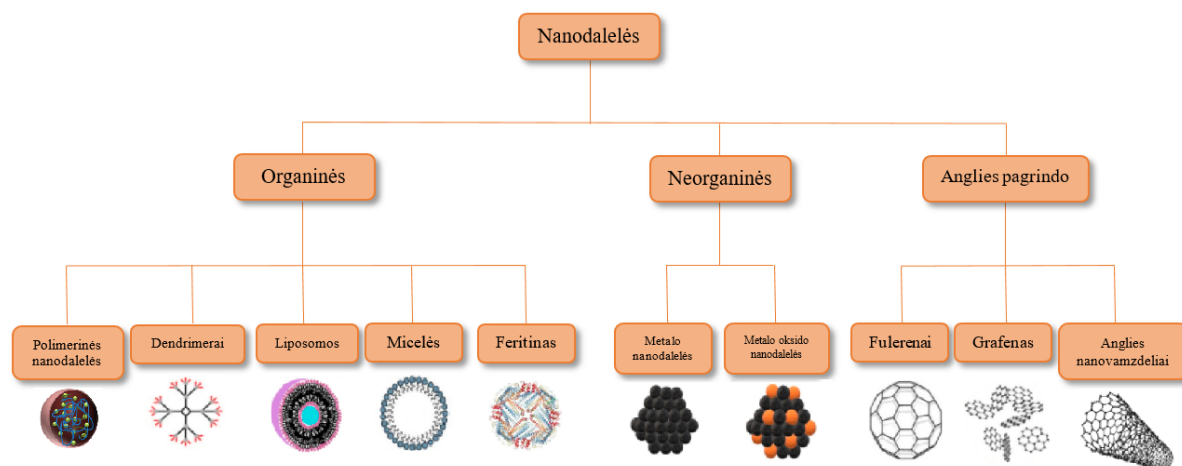
1.4 Chitozanas nanotechnologijoje

1.4.1 Nanodalelių klasifikacija

Nanodalelės apibūdinamos kaip kietosios dalelės, kurių matmuo yra mažesnis nei 100 nm (Teleanu et al., 2018). Nanodalelės turi unikalias fizikines, chemines ir biologines savybes nanoskalėje, lyginant su atitinkamomis dalelėmis, esančiomis aukštesniu mastu. Taip yra todėl, kad tūringos medžiagos (ang. *bulk material*) turi santykinai pastovias savybes, nepriklausomai nuo jų dydžio, tačiau mažėjant medžiagos dalelių dydžiui, didėja paviršiaus atomų procentas,

to pasekoje didėja ir dalelių reaktyvumas, stabilumas, mechaninis stiprumas ir kt. (Ealias ir Saravanakumar, 2017; Divya ir Jisha, 2017).

Nanodalelės yra plačiai suskirstytos į įvairias kategorijas, priklausomai nuo jų ypatybių, pavyzdžiui, morfologijos, dydžio, sudėties, formos ir kt. Toliau pateikiamos nanodalelių klasės, suskirstytos remiantis jų kilme (4 pav.). Tai organinės, neorganinės ir anglies pagrindo nanodalelės (Ealias ir Saravanakumar, 2017)



4 pav. Nanodalelių klasifikacija pagal jų pobūdį.

Organinės nanodalelės

Organinėms nanodalelėms priskiriami dendrimeriai, mielės, liposomos, feritinas ir polimerinės nanodalelės. Šios nanodalelės yra biologiškai skaidžios, netoksiškos, o kai kurios, tokios kaip mielės ir liposomos turi tuščiavidurę šerdį, dar žinomą kaip nanokapsulę (šerdies ir apvalkalo struktūra, kurioje polimeras supa šerdį) (Ealias ir Saravanakumar, 2017).

Polimerinės nanodalelės yra struktūros, sudarytos iš polimerų, surinktų kaip nanokapsulė arba nanosfera (polimero matricos sistema) (Frank et al., 2020). Polimerinės nanodalelės yra struktūros, sudarytos iš sintetinių arba natūralių polimerų. Plačiausiai naudojami sintetiniai polimerai yra polilaktidų, polilaktidų–poliglolidų kopolimerai, polikaprolaktonai ir poliakrilatai. Tarp įvairių natūralių polimerų plačiai ištirtas alginatas, albuminas ir chitozanas. Organinės nanodalelės dėl gebėjimo įkapsuliuoti arba absorbuoti vaistus dažniausiai naudojamos kaip vaistų pernašos sistemos (Pund ir Joshi, 2017).

Neorganinės nanodalelės

Neorganinėms nanodalelėms pagrindinai priskiriamos metalo pagrindo nanodalelės, tokios kaip sidabro, aukso, geležies, vario, aliuminio, kadmio, kobalto ir cinko bei metalų oksidų pagrindu pagamintos nanodalelės, įskaitant titano oksidą, geležies oksidą, cezio oksido, ir cinko oksidą. Šios dalelės pasižymi pagerintomis savybėmis, palyginti su jų metalo dalelėmis

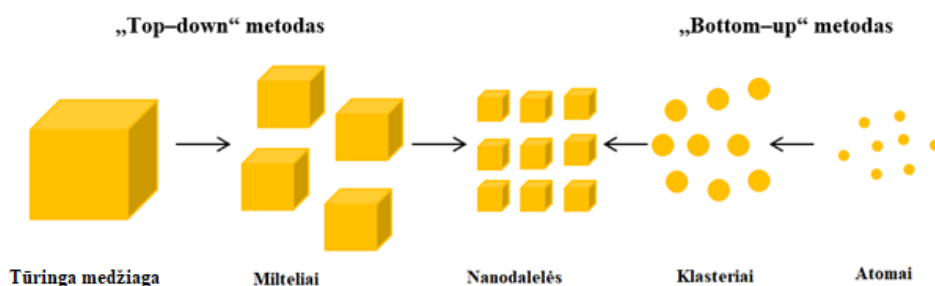
(Teleanu et al., 2018). Dėl savo pažangių optinių savybių neorganinės nanodalelės yra pritaikomos daugelyje tyrimų sričių, pavyzdžiui, aukso nanodalelių danga plačiai naudojama mėginių padengimui skenuojančioje elektroninėje mikroskopijoje (SEM, siekiant sustiprinti elektroninį srautą, kuris padeda gauti aukštos kokybės vaizdus (Khan, 2017).

Anglies pagrindo nanodalelės

Nanodalelės, pagamintos tik iš anglies, žinomos kaip anglies pagrindo nanodalelės. Jos gali būti klasifikuojamos į fulerenus, grafeną, anglies nanovamzdelius, anglies nanopluoštus, juodąją anglį, o retais atvejais ir į nano dydžio aktyvintą anglį (Ealia ir Saravanakumar, 2017). Tokios nanodalelės turi platų pritaikymą biomedicinoje, pavyzdžiui, vaistų pernašoje, vėžio terapijoje, ląstelių ir audinių vaizdavime (Patel ir Kim, 2018).

1.4.2 Chitozano nanodalelių paruošimo būdai

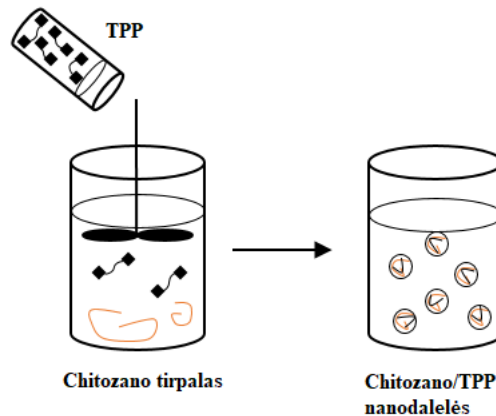
Išskiriami du pagrindiniai nanodalelių paruošimo būdai: „top–down“ ir „bottom–up“ (5 pav.). „Top–down“ metodui būdingas didelių molekulių išskaidymas iki mažesnių, kurios gali būti paverčiamos į nanodaleles. Paprastai tai pasiekama naudojant malimą, aukšto slėgio homogenizavimą ar ultragarsą. „Bottom–up“ metodo principas yra priešingas, čia nanodalelės sintetamos iš palyginti paprastesnių medžiagų, taikoma precipitacija ir tirpiklio perkėlimas (Divya ir Jisha, 2018; Khan et al., 2019). Dažniausiai chitozano nanodalelių sintezei taikomas „bottom–up“ būdas ir tik retais atvejais „top–down“ būdas (Wijesena et al., 2015). Dažnai chitozano nanodalelių sintezei taikomi „bottom–up“ metodai yra: joninė geliacija/polielektrolitų kompleksavimas, emulsijos lašelių suliejimas, emulsijos tirpiklio difuzija, atvirkštinių micelių sudarymas, desolvacija.



5 pav. „Top–down“ ir „bottom–up“ nanodalelių sintezės būdai.

Joninė geliacija/polielektrolitų kompleksavimas

Šio metodo veikimas pagrįstas sąveika tarp teigiamai įkrautų chitozono aminogrupių ir anijonino, pavyzdžiui tripolifosfato (TPP) (6 pav.). Chitozanas ištirpinamas rūgštiniame tirpale, į tirpalą pridedamas stabilizatorius ir polianijonas. Tarp šių dviejų medžiagų dėl elektrostatiinių jėgų susidaro kompleksas, todėl įvyksta joninė geliacija. Po polianijono pridėjimo nanodalelės susidaro spontaniškai (Naskar et al., 2019).

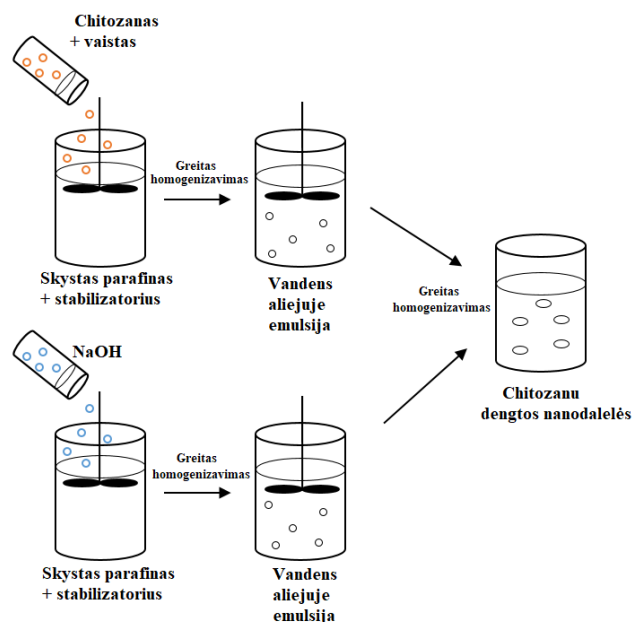


6 pav. Joninės geliacijos/polielektrolitų kompleksavimo metodo scheminis vaizdas.

Joninė geliacija yra tinkamiausias terminas apibūdinti procesą, kai chitozono geliaciją indukuoja mažos anijoninės molekulės, tokios kaip fosfatas, citratas, sulfatas, o polielektrolitų kompleksas susidaro, kai vietoj mažų molekulių naudojamos anijoninės makromolekulės, tokios kaip dekstrano sulfatas, natrio alginatas, karageninas, gliukomananas, pektinas, heparinas, taip pat baltymų molekulės ar DNR (Grenha, 2012).

Emulsijos lašelių suliejimas

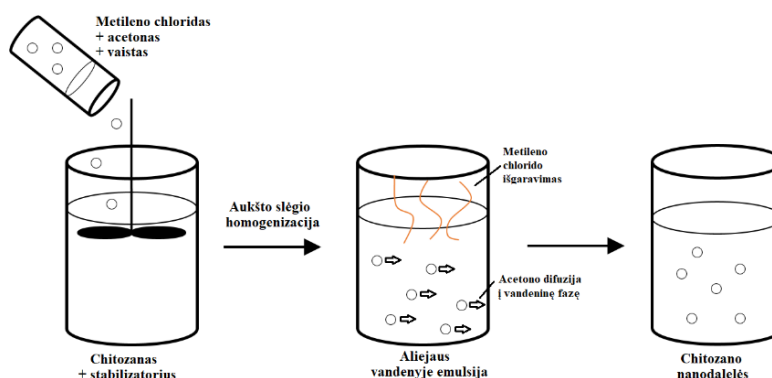
Šiuo metodu gaunama stabili vandens aliejuje emulsija, įpilant vandeninį chitozono tirpalą kartu su vaistu į skysto parafino ir stabilizatoriaus mišinį, kuris greitai homogenizuojamas. Lygiagrečiai gaminama dar viena stabili vandens aliejuje emulsija, pridedant natrio hidroksido į skysto parafino ir stabilizatoriaus mišinį, kuris taip pat greitai homogenizuojamas. Sumaišius dvi gautas emulsijas, abiejų emulsijų lašeliai atsitiktinai susitinka ir sukimba, todėl chitozono lašeliai precipituoja ir sudaro nanodaleles (7 pav.) (Naskar, et al., 2019).



7 pav. Emulsijos lašelių suliejimo metodo scheminis vaizdas.

Emulsijos tirpiklio difuzija

Toks nanodalelių paruošimo būdas apima organinės fazės (pvz., metileno chlorido ir acetono), turinčios hidrofobinį vaistą, pridėjimą į vandeninę fazę, kurioje yra chitozono ir stabilizatoriaus (pvz., poloksamero ir lecitino) (8 pav). Dėl to susidaro aliejaus vandenyje emulsija, kuri toliau homogenizuojama aukšto slėgio sąlygomis. Metileno chloridas pašalinamas sumažintame slėgyje. Šiame etape acetonas difunduoja į vandeninę fazę, mažindamas chitozono tirpumą, todėl nusodinant polimerus susidaro nanodalelės. Paprastai pridėjamas papildomas vandens kiekis visiškai acetono difuzijai (Grenha, 2012; Divya ir Jisha, 2017).

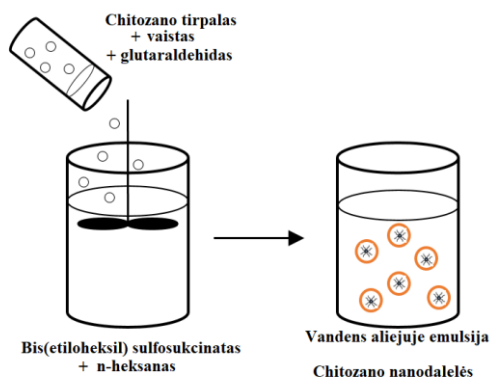


8 pav. Emulsijos tirpiklio difuzijos metodo scheminis vaizdas.

Atvirkštinių micelių sudarymas

Atvirkštinės micelės yra vanduo aliejaus lašeliuose, priešingai nei įprastos micelės, susidarančios aliejuje vandens aplinkoje. Pagal šį metodą lipofilinė paviršiaus aktyvioji

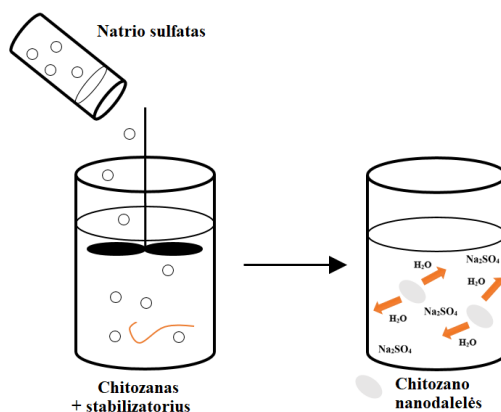
medžiaga (pavyzdžiui, natrio bis(etilohexil) sulfosukcinatas arba cetiltrimetilamonibromidas) ištirpinama tinkamame organiniame tirpiklyje (pavyzdžiui, n-heksane). Šis etapas skirtas paruošti organinei fazei vandens aliejuje emulsijai (9 pav.). Tada į organinę fazę pridedama vandeninė fazė, kurioje yra chitozanas, vaistas ir glutaraldehidas, kuris dedamas siekiant išvengti drumstumo. Nanodalelės išgryninamos išgarinus tirpiklį (Grenha, 2012; Naskar et al., 2019).



9 pav. Atvirkštinės micelizacijos metodo scheminis vaizdas.

Desolvacija

Taikant desolvaciją, į iš anksto paruoštą chitozono tirpalą įlašinamas su tirpikliu konkuruojantis agentas, pasižymintis didesniu hidrofiliškumu (pavyzdžiui, natrio sulfatas). Kai druska patenka į sąlytį su chitozono tirpalo vandenine aplinka, dėl didesnio vandens afiniškumo druskai vyksta laipsniškas chitozaną supančio vandens pašalinimas (10 pav). Padidėjus chitozono molekulių sąveikai susidaro nanodalelės (Jiang et al., 2018).



10 pav. Desolvacijos metodo scheminis vaizdas.

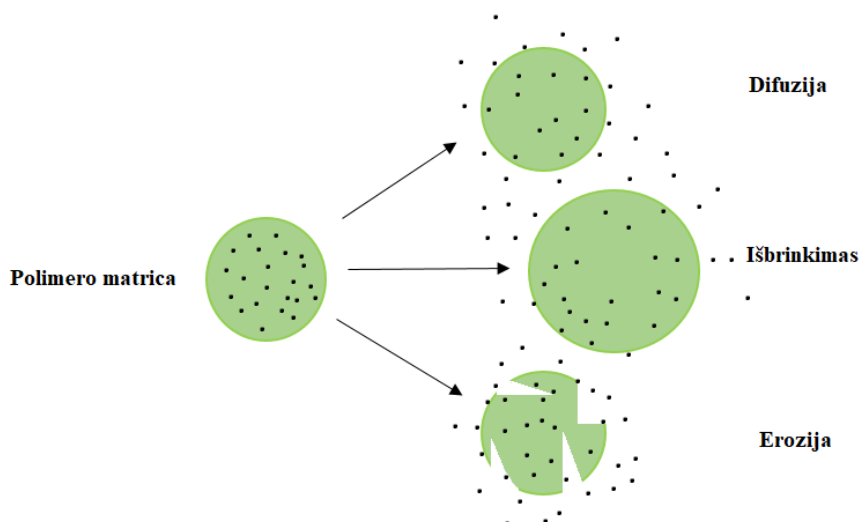
Skirtingas chitozono nanodalelių išgavimo būdų taikymas gali lemti skirtingas šių dalelių savybes, pavyzdžiui dydį, krūvį. Šie savybių skirtumai gali turėti įtakos nanodalelių funkcijoms. Tačiau be paruošimo būdo, galutinės nanodalelių savybės taip pat gali priklausyti

nuo kelių kitų parametru, tokiu kaip medžiagų koncentracijos, jų santykis, reakcijos laikas, chitozano molekulinė masė ir deacetilavimo laipsnis ir kt. (Grenha, 2012).

1.4.3 Chitozano nanodalelių panaudojimas

Chitozanas, kaip medžiaga gebanti formuoti nanodaleles, tyrinėjama paskutinį dešimtmetį. Dažniausiai šis biopolimeras tiriamas kaip kontroliuojamų aktyviųjų ingredientų išskyrimo sistema (Divya ir Jisha, 2018).

Yra keli mechanizmai, kurie lemia aktyviųjų ingredientų išsiskyrimą iš chitozano nanodalelių, tai 1) polimero išbrinkimas, 2) adsorbuoto ingrediento difuzija, 3) ingrediento difuzija per polimerinę matricą, 4) polimero erozija ar degradacija ir 5) erozijos bei degradacijos derinys. Taip pat galimas nuo pH priklausomas aktyviųjų ingredientų išsiskyrimas dėl chitozano tirpumo (11 pav.) (Mohammed et al., 2017).



11 pav. Aktyviųjų ingredientų išsiskyrimo iš chitozano nanodalelių mechanizmai.

Dėl savo unikalių biologinių, fizikinių ir cheminių savybių chitozano nanodalelės turi platų pritaikymą farmacijoje, pavyzdžiui, vaistų pernašoje, vakcinų kūrime, vėžio gydyme, taip pat tokiose srityse kaip žemdirbystė, kosmetikos gamyba, maisto pramonė, aplinkos apsauga ir kt. (Divya ir Jisha, 2017).

Vaistų pernaša

Įvairiose biomedicinos srityse chitozanas plačiai naudojamas kaip daleles formuojantis ir paviršių dengiantis polimeras. Chitozanu gali būti padengiamos polimerinės, lipidinės ar metalo (arba metalo oksido) pagrindu pagamintos nanodalelės, kurios įprastai naudojamos kaip

vaistų ar kitų veikliųjų medžiagų nešikliai (Agotegaray et al., 2016; Cé et al., 2016). Daugybė tyrimų *in vitro* ir *in vivo* parodė, kad nanonešiklių paviršių modifikavimas, padengiant juos chitozanu, gali suteikti daug privalumų: 1) pagerėja fizikinis ir cheminis stabilumas; 2) kontroliuojamas vaisto išsiskyrimas; 3) skatinama mukoadhezija ir skverbimasis į audinius; 4) moduluojama ląstelių sąveika (ląstelių įsisavinimas ir toksiškumas) (Frank et al., 2020).

Chitozanas gali formuoti polimerines nanodaleles, pritaikytas įvairiems geriamųjų vaistų vartojimo tikslams. Pavyzdžiui, nustatyta, kad žaliojoje arbatoje randamų flavanoidų katechino ir epigalokatechino prasta absorbcija per žarnyno membranas žymiai pagerėja šiuos antioksidantus inkapsuliuavus į chitozано nanodaleles (Mohammed et al., 2017).

Nanodalelės gali būti pritaikomos vaistų pernašai per nosį į kvėpavimo takus, smegenis ar kraujotaką. Tačiau čia susiduriama su problema, kad vaistams, kurie nepereina nosies gleivinės barjero, atliekamas mukociliarinis klirensas. Nustatyta, kad karbamazepino (vaistas, naudojamas gydant epilepsiją), karboksimetilchitozано nanodalelės pasižymi geresnėmis mukoadhezinėmis savybėmis ir tikslesniu nukreipimu į smegenis nei pats karbamazepinas (Liu et al., 2018). Taip pat nustatyta, kad estradioliui (lytinis hormonas, naudojamas Alzheimerio ligos gydymui ir prevencijai) į organizmą patenkant per burną, sukiamas mažas šio hormono pagausėjimas smegenų skystyje. Tačiau estradiolio–chitozано nanodalelėms patekus per nosį, hormono smegenų skystyje žymiai pagausėja. Šie rezultatai rodo, kad estradioliui į organizmą patenkant per nosį chitozано nanodalelių sudėtyje, jis yra tiesiogiai perduodamas į smegenis (Mohammed et al., 2017).

Vėžio terapija

Genų pernašoje chitozanas apsaugo plazmidės DNR nuo nukleozinio suardymo, sudarydamas polioelektrolitų kompleksą su neigiamai įkrauta DNR. Ši apsauga pagerina transfekcijos efektyvumą (Garg et al., 2019). Laikoma, kad katijoniniai polimerai ir lipidai yra perspektyvūs genų pernešimo agentai plataus masto gamybai ir komerciniam naudojimui kaip nevirusiniai vektoriai. Deng su kolegomis (2014) gydant krūties vėžį paruošė miRNR–34a (endogeninį naviką slopinančią molekulę) ir doksorubiciną padengtus hialurono rūgšties ir chitozано nanodalelėmis. Atlikti *in vivo* ir *in vitro* tyrimai parodė, kad šios nanodalelės yra sėkminga dviguba nanonešiklių sistema, tiekianti tiek doksorubiciną, tiek miRNR–34a į tikslines ląsteles.

Barbieri su kolegomis (2015) pranešė, kad priešvėžinio vaisto tamoksifeno prasiskverbimas per žarnyno epitelį padidėjo inkapsuliuavus tamoksifeną į lecitino–chitozано nanodaleles. Tokį veikimą lemia teigiamą krūvį turinčio chitozано sąveikavimas su neigiamą krūvį turinčiomis epitelio ląstelėmis.

Skiepų pernašos sistema

Kai kurie vakcinų tiekimo sistemų tyrimai rodo, kad nanodalelių tiekimas gali padidinti antigenų ar adjuvantų įsisavinimą antigeną prezentuojančiose ląstelėse bei padidinti imuninį atsaką. Nustatyta, kad *in vivo* chitozono nanodalelės gali padidinti enoksaparino absorbciją per burną, pernešant mažos molekulinės masės hepariną ir enoksapariną. Įrodyta, kad chitozono nanodalelės yra veiksmingos sukuriant imunitetą prieš *Vibrio* genties bakterijas, nes apsaugo padengtą antigeną nuo rūgštinio ir fermentinio skilimo organizme. Be to, chitozono nanodalelės, kurių sudėtyje yra monofosforilo lipido A sukelia stipresnį imuninį atsaką nei pats monofosforilo lipidas A (Naskar et al., 2019).

Žemdirbystė

Natūralūs produktai yra neprilygstamas visų sintetinių agrocheminių medžiagų pakaitalas žemės ūkyje, siekiant sumažinti neigiamą poveikį aplinkai. Pranešama apie daugybę žemės ūkyje naudojamų nanomedžiagų, kurių pagrindą sudaro chitozanas. Šios medžiagos daro teigiamą poveikį sodinukų augimui ir vystymuisi, maistinių medžiagų pasisavinimo efektyvumui, augalų augimui, antimikrobiniam aktyvumui, ligų kontrolei ir augalų gynybos mechanizmo sustiprinimui (Choudhary et al., 2019).

Pagrindinis inkapsuliavimo į chitozono matricą pranašumas yra tas, kad tai apsaugo veikliąsias medžiagas nuo aplinkos poveikio. Pastaraisiais metais siekiama sukurti chitozono nanodaleles, pasižyminčias kontroliuojamu inkapsuliuotų agrocheminių produktų atpalaidavimu, tokių kaip makroelementai, mikroelementai, pesticidai ar herbicidai (Kashyap et al., 2015).

Dėl toksiškų medžiagų, tokių kaip pesticidai, inkapsuliavimo chitozono polimere, jos tampa mažiau toksiškos ir suteikia daugiau galimybių tiekti jas augalams ilgesnį laiką (Choudhary et al., 2019). Oliveira ir kolegų (2018) atliktame tyrime buvo įvertintas chitozono/gumiarabiko nanodalelėse inkapsuliuoto geraniolio biologinis aktyvumas baltojo drugio *Bemisia tabaci* atžvilgiu. Preparatas apsaugojo geraniolį nuo skilimo UV spinduliuotėje, o *in vitro* išsiskyrimas vyko pagal difuzijos mechanizmą, kuriam įtakos turėjo temperatūra. Buvo nustatyta, kad tokio tipo preparatas gali būti naudojamas kenkėjų kontrolei.

Maisto pramonė

Chitozono nanodalelės dažnai naudojamos inkapsuliuojant naudingąsias medžiagas, siekiant išsaugoti šių medžiagų savybes bei apsaugoti jas nuo oksidacinio poveikio.

Nesočiosųjų riebalų rūgščių, kaip maisto papildų, vystymą riboja riebalų oksidacija ir hidrolizė. Chitozanas yra itin efektyvus stabilizuojant aliejaus vandenyje emulsijas, adsorbuodamasis ant aliejaus lašelio paviršiaus, mažindamas paviršiaus įtampą ir formuodamas apsaugines membranas aplink lipidą (Zhao et al., 2011).

Natūralūs konservantai – eteriniai aliejai paprastai pasižymi jautrumu šilumai, šviesai, spaudimui ir deguonies poveikiui, todėl juos padengiant chitozано mišinio sluoksniu pagerėja įvairios savybės, įskaitant antiparazitinį poveikį prieš *Stegomyia aegypti* ar *Aedes* sp. lervas (Akbari–Alavijeh et al., 2020).

Mažas vitaminų stabilumas ir didelis jautrumas aplinkos sąlygoms yra pagrindiniai iššūkiai naudojant vitaminus maisto pramonėje. Šiai problemai spręsti pasiūlyta naudoti chitozано pagrindu pagamintas nanodaleles. Azevedo su mokslininkų grupe (2014) sukūrė alginato/chitozано nanodaleles, skirtas inkapsuliuoti vitaminą B₂, kurios žymiai padidino eterinių aliejų stabilumą.

Daugybę metų naudotų nesuyrančių ar sunkiai yrančių naftos kilmės maisto pakuočių naudojimas sąlygojo plastiko atliekų kaupimąsi aplinkoje ir kelia didelį susirūpinimą. Ši problema gali būti sprendžiama pritaikant chitozано pagrindo plėveles maisto pakuočių gamyboje. Tokių plėvelių sudėtyje siūloma naudoti chitozано ir su juo kombinuojamas nanodaleles. Šios plėvelės gali pakeisti plastiką maisto produktų pakavimui taip sumažinant aplinkos užterštumą (Radhakrishnan ir Glucose, 2015).

Chitozано amino grupės leidžia šiam biopolimerui pritaikyti modifikacines reakcijas bei sąveikauti su kitomis molekulėmis. Puikios šio polisacharido savybės, pavyzdžiui, biologinis suderinamumas, biologinis skaidumas, biologinis aktyvumas, netoksiškumas ir geros adsorbcijos savybės daro chitozaną tikėtina alternatyva pramoniniu būdu išgaunamiems sintetiniams polimerams. Be to, šios savybės suteikia galimybę chitozaną pritaikyti vaistų pernašoje, kur jis naudojamas kaip nanodalelių pagrindas, kuriose pernešamos inkapsuliuotos ar absorbuotos bioaktyvios medžiagos. Nepaisant to, pagrindinis chitozано pritaikymo galimybių plėtojimą ribojantis veiksnys yra prastas tirpumas šarminėje terpėje, dėl kurio dalis potencialių panaudojimo sričių tampa netinkamomis. Kitas, ne mažiau svarbus aspektas yra tai, kad nors chitozано toksiškumas prilyginamas minimaliam, chitozано darinių, tokių kaip chitozано nanodalelės, toksiškumas yra vis dar tiriamas ir gali kisti priklausomai nuo įvairių chitozано savybių, tokių kaip molekulinė masė, deacetilinimo laipsnis, taikomos modifikacijos bei molekulių tipo, su kuriomis sąveikaujama (Mohammed et al., 2017).

Chitozано išskyrimas iš mikromicetų yra daug žadantis, nes toks negyvūninės kilmės objektas įvairiais aspektais yra pranašesnis nei išskyrimas iš vėžiagyvių, tačiau tokio tipo ekstrakcijai reikalingas proceso sąlygų optimizavimas ir metodo standartizavimas.

2. METODIKA

2.1 Darbe naudotos medžiagos, prietaisai, terpės

2.1.1 Darbe naudotos medžiagos

NaOH, CH₃COOH, NaCl, kazeino peptonas, agaras, chitinas, gliukozė (Carl Roth, Vokietija), polimiksino B sulfatas (INC, JAV).

2.1.2 Darbe naudoti prietaisai

Automatinė purtyklė 1083 (GFL), BMR spektrometras Avance 400 SB (Bruker), centrifuga Joann KR 250i (Thermo electron corporation), FTIR spektrometras Alpha (Bruker), laminaras MARS 1200 (Labogene), pH matuoklis 766 (Knick), magnetinė maišyklė RH basic 2 (IKA[®]), svarstyklės EG 420-3NM (Kern), skenuojantis elektroninis mikroskopas SU-70 (Hitachi), šviesinis mikroskopas CX21FS1 (Olympus), termostatas (25 °C) BD 115 (Binder), termostatas (55 °C) BD 115 (Binder), traukos spinta SCALA 1200 (WALDNER).

2.1.3 Darbe naudotos mitybinės terpės

Saburo 2 % gliukozės agaras (Carl Roth) su polimiksino B sulfatu (50 µg/ml) naudotas pelėsinių grybų kultivavimui ir gryninimui Petri lėkštelėse.

Saburo 2 % gliukozės sultinys (2 % gliukozė, 1 % peptonas) su polimiksino B sulfatu (50 µg/ml) naudotas *Penicillium* sp. sporų kultivavimui.

Terpės sterilintos autoklavuojant 20 min, esant 121 °C temperatūrai.

2.2 Pelėsinių grybų išskyrimas ir auginimas

2.2.1 Pasėlių paėmimas

Mikromicetų pasėliai paimti iš oro ir nuo skirtingų substratų: daržovių, vaisių ir maisto produktų. Imant pasėlius iš oro, Petri lėkštelė su Saburo agaru atidengta ir palikta aplinkoje 15 min. Imant pasėlius nuo skirtingų substratų su pelėsiu, pelėsinių grybų biomasė paimta sterilia kilpele ir perkelta į Petri lėkštelę su Saburo agaru.

2.2.2 Pelėsinų grybų kultivavimo sąlygos

Petri lėkštelės su pasėliais inkubuotos termostate esant 25 °C temperatūrai 10 dienų. Iš išaugusios mišrios pelėsinų grybų kultūros atrinkti *Penicillium* sp. mikromicetai, kurie yra šio darbo objektas. *Penicillium* sp. kultūros išgrynintos ant Saburo agarų ir inkubuotos esant 25 °C temperatūrai 10 parų, kol susiformavo jų sporos. Vėliau 1 ml sporų suspensijos ($4,5 \times 10^7$ sporų/ml) pasėta į 250 ml Saburo gliukozės sultinį ir kultivuota vandens vonelėje su purtykle esant 25 °C temperatūrai 7 paras, kol susiformavo micelis.

2.2.3 Pelėsinų grybų identifikavimas

Ant Saburo agarų išaugus pelėsinų grybų kultūrai, pelėsiniai grybai buvo identifikuoti pagal morfologinius požymius, vadovaujantis literatūros šaltiniuose pateikta informacija (Lugauskas et al., 2002; Visagie et al., 2014).

2.3 Chitozono išskyrimas

2.3.1 Chitozono išskyrimas iš pelėsinų grybų

Chitozono išskyrimui iš pelėsinų grybų buvo pritaikyta modifikuota Aili et al. (2019) ir Albuquerque et al. (2011) metodika. Chitozono išskyrimą sudarė trys etapai: 1) šarminis apdorojimas, kurio metu pašalinti baltymai ir tirpūs polisacharidai; 2) rūgštinis apdorojimas, skirtas chitino ir chitozono atskyrimui; 3) precipitacija, kurios metu iškrito chitozono nuosėdos.

Šarminis apdorojimas

Susidaręs *Penicillium* sp. micelis buvo atskirtas nuo mitybinės terpės filtruojant, po to buvo džiovintas esant 55 °C temperatūrai 7 paras. Išdžiūvęs micelis buvo sutrintas, pasvertas ir sumaišytas su NaOH (2 %) santykiu 1/50 (masė/tūris). Mišinys buvo kaitintas naudojant magnetinę maišyklę esant 90 °C temperatūrai, 2 val. Netirpios frakcijos (šarme netirpios medžiagos) atskyrimui mišinys buvo nucentrifuguotas 14000 rpm greičiu 15 min. Supernatantas buvo nupiltas, o nuosėdos buvo nufiltruotos ir perplautos distiliuotu vandeniu iki nekintančios pH vertės. Mėginys buvo išdžiovintas termostate 55 °C temperatūroje.

Rūgštinis apdorojimas

Išdžiūvusi šarme netirpi medžiaga buvo sutrinta ir pasverta. Mėginys sumaišytas su CH₃COOH (2 %) santykiu 1/40 (masė/tūris) ir naudojant magnetinę maišyklę kaitintas esant 95 °C temperatūrai 8 val. Po apdorojimo mišinys centrifuguotas 14000 aps./min greičiu 15 min. Atsiskyrus frakcijoms, tirpi frakcija (iširpęs chitozanas) atidėta tolimesniam biopolimerų išskyrimo etapui, o netirpi frakcija (chitinas) nufiltruota ir perplauta distiliuotu vandeniu iki nekintančios pH vertės. Mėginys išdžiovintas 55 °C temperatūros termostate.

Precipitacija

Po centrifugavimo susidariusios tirpios frakcijos pH vertė pakelta iki 10 į supernatantą įlašinus 2N NaOH. Susidaręs precipitatas nufiltruotas ir perplautas distiliuotu vandeniu iki nekintančios pH vertės. Mėginys išdžiovintas esant 55 °C temperatūrai termostate.

2.3.2 Chitozано išskyrimas iš komercinio chitino

Chitozано išskyrimui iš komercinio chitino naudotas vėžiagyvių kilmės chitinas. Vadovautasi Patria (2013) aprašyta procedūra. Chitozано išskyrimą iš chitino sudarė vienas, deacetilavimo etapas. Chitinas buvo sumaišytas su NaOH (50%) 1/10 (masė/tūris) ir naudojant magnetinę maišyklę kaitintas esant 100 °C temperatūrai 2,5 val. Po kaitinimo susidariusios nuosėdos buvo nufiltruotos ir perplautos distiliuotu vandeniu iki nekintančios pH vertės. Mėginys buvo išdžiovintas 55 °C temperatūros termostate.

Chitozано procentinė išeiga iš 100 g sauso micelio ar komercinio chitino buvo apskaičiuota pagal lygtį (1), pateiklą Alagesan et al. (2016).

$$\text{Procentinė išeiga} = \frac{\text{Sausa chitozано masė}}{\text{Sausa micelio arba komercinio chitino masė}} \times 100\% \quad (1)$$

2.3.3 Paviršiaus morfologijos įvertinimas

Siekiant ištirti chitozано paviršiaus morfologiją, buvo paimti mėginiai po kelių chitozано išskyrimo etapų: rūgštinio apdorojimo ir precipitacijos (grybinės kilmės chitozано išskyrimo) bei po deacetilavimo etapo (gyvūninės kilmės chitozано išskyrimo). Mėginių paviršiaus morfologija tirta taikant SEM.

SEM analizei sutrinti mėginiai buvo patalpinti ant silicio plokštelių (0,5 cm × 0,5 cm). Dėl šių polisacharidų gebėjimo kaupti krūvį, mėginiai buvo padengti 10 nm storio aukso

sluoksniu, kad būtų neutralizuotas krūvis ir elektrostatinės jėgos. Vaizdas sugeneruotas skenuojančiu elektroniniu mikroskopu prie 10 kV.

2.3.4 Biopolimerų identifikavimas

Išskirtų biopolimerų identifikavimui ir galimų priemaišų įvertinimui taikyta Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija (FTIR) bei branduolių magnetinio rezonanso (BMR) spektroskopija. Spektrinė analizė atlikta Fizinių ir technologijos mokslų centre.

FTIR analizei atlikti mėginiai buvo sutrinti ir naudojama ~50 mg mėginio. FTIR spektrai buvo registruojami esant kambario temperatūrai naudojant spektrometrą. Registracija vykdyta bangos ilgio ruože nuo 4000 cm⁻¹ iki 400 cm⁻¹, rezoliucija – 4 cm⁻¹, atlikti 64 nuskaitymai.

BMR analizei buvo registruoti kietos fazės ¹³C ir ¹H BMR spektrai, naudota 200 mg mėginio, pakrauto į cirkonio oksido rotorių. Spektrai registruoti kambario temperatūroje, spektrometro darbo dažnis – 400 MHz, sukimo dažnis – 10 kHz.

FTIR ir BMR spektrai atvaizduoti ir analizuoti OriginPro 2019b programa.

2.3.5 Deacetilavimo laipsnio nustatymas

Chitozano deacetilavimo laipsnis buvo nustatytas siekiant įvertinti procentinę acetilintų gliukozamino molekulių kiekį polimere. Chitozano deacetilavimo laipsnį galima nustatyti dviem būdais: taikant FTIR ir ¹³C BMR. Taikant ¹³C BMR, chitozano deacetilavimo laipsnis buvo apskaičiuotas pagal lygtį (2), pateiktą Oberemko et al. (2019).

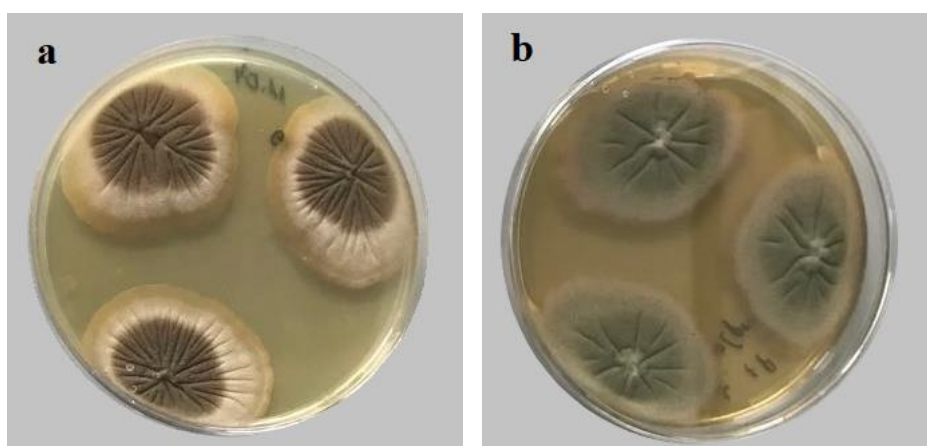
$$AL=100 \times I_{N-CH_3} / [1/6(I_{C1}+I_{C2}+I_{C3}+I_{C4}+I_{C5}+I_{C6})] \quad (2)$$

kur: I_{N-CH_3} – N-acetil grupės metilinto anglies atomo integralas, I_C – D-gliukopiranozilo žiedo anglies atomų integralai, AL – acetilavimo laipsnis.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Mikroorganizmų atranka

Šio darbo metu iš skirtingų substratų buvo išskirtos ir išgrynintos įvairios pelėsinių grybų ir mieliagrybių kultūros. Iš jų atrinktos *Aspergillus* ir *Penicillium* genčių pelėsinių grybų kultūros, kaip potencialus chitozano šaltinis ir identifikuotos iki genties. Dėl mažesnės rizikos užteršti aplinką ar sukelti pavojų sveikatai, darbui pasirinkti *Penicillium* genties grybai. Tolimesnei analizei atrinkta viena *Penicillium* sp. kultūra, pasižymėjusi greitesniu augimu (12 pav.).



12 pav. Išgrynintos *Penicillium* pelėsinių grybų kolonijos po 10 parų augimo esant 25 °C temperatūrai ant Saburo agaro su polimiksinu: a – kultūra išgryninta iš pasėlio nuo morkų; b – kultūra išgryninta iš pasėlio, paimto iš uždarytų patalpų oro, kuri dėl greitesnio augimo pasirinkta tolimesnei analizei.

3.2 Biopolimerų išeigos įvertinimas

Pritaikius cheminį biopolimerų išskyrimo metodą atliktas skirtingos kilmės chitino ir chitozano išskyrimas. Iš *Penicillium* sp. pelėsinių grybų micelio išskirtas chitinas ir chitozanas, o iš komercinio gyvūninės (krabų) kilmės chitino – chitozanas. Sėkmingą biopolimerų išskyrimą leido patvirtinti FTIR ir BMR analizė.

Apskaičiuota, kad *Penicillium* sp. sausą micelį sudaro 46 % chitino ir 28 % chitozano (3 lentelė). Tokie rezultatai artimi minimiems literatūroje. Latha ir Suresh (2013) nustatė, kad *Penicillium* sp. chitinas sudaro 43 %, o chitozanas 17 % sausos micelio masės, Ebrahimzadeh su kolegomis (2013) praneša, kad skirtingų *Penicillium* rūšių micelyje aptinkama 20,9 – 29,7 % chitozano.

3 lentelė. Biopolimerų produkcija iš *Penicillium* sp. micelio ir komercinio gyvūninės (krabų) kilmės chitino: chitinas ir chitozanas išskirtas iš *Penicillium* sp. micelio po 7 parų augimo Saburo sultinyje esant 25 °C temperatūrai.

Chitozано šaltinis	Sausa biopolimerų masė 1 g micelio/chitino		
	Chitino masė (g)	Chitozано masė (g)	Chitozано masė (%)
<i>Penicillium</i> sp. micelis	0,46	0,28	28
Komercinis chitinas	1	0,944	94,4

Nustatyta, kad iš komercinio chitino išskirto chitozано kiekis siekė 94,4 %. Lyginant su duomenimis, pateiktais literatūroje, šiame darbe išgauto biopolimero kiekis yra aukštesnis, nei paprastai būdinga iš krabų išskirtam chitozanoi. Yen et al. (2008) atliktame darbe nurodoma, kad iš krabų išskirto chitozано išėiga siekia 30,0–32,2 %. Tokius rezultatų skirtumus galimai lėmė per trumpas komercinio chitino deacetilinimo laikas, dėl kurio biopolimeras buvo deacetilintas tik iš dalies.

3.3 Chitino ir chitozано struktūrinė analizė

3.3.1 Chitino paviršiaus charakterizavimas

Chitino ir chitozано paviršiaus morfologija analizuota taikant SEM. Chitino paviršiaus morfologija įvertinta po *Penicillium* sp. micelio apdorojimo, sudaryto iš dviejų etapų: šarminio apdorojimo ir rūgštinio apdorojimo. Nustatyta, kad nepaisant sauso chitino sutrinimo iki miltelių, chitino struktūros išlaikė mikromicetų micelio hifams būdingą formą. Šie fragmentai matomi mėginio vaizdą padidinus 2500, 5000 ir 10000 kartų (13 pav. a, b, c).

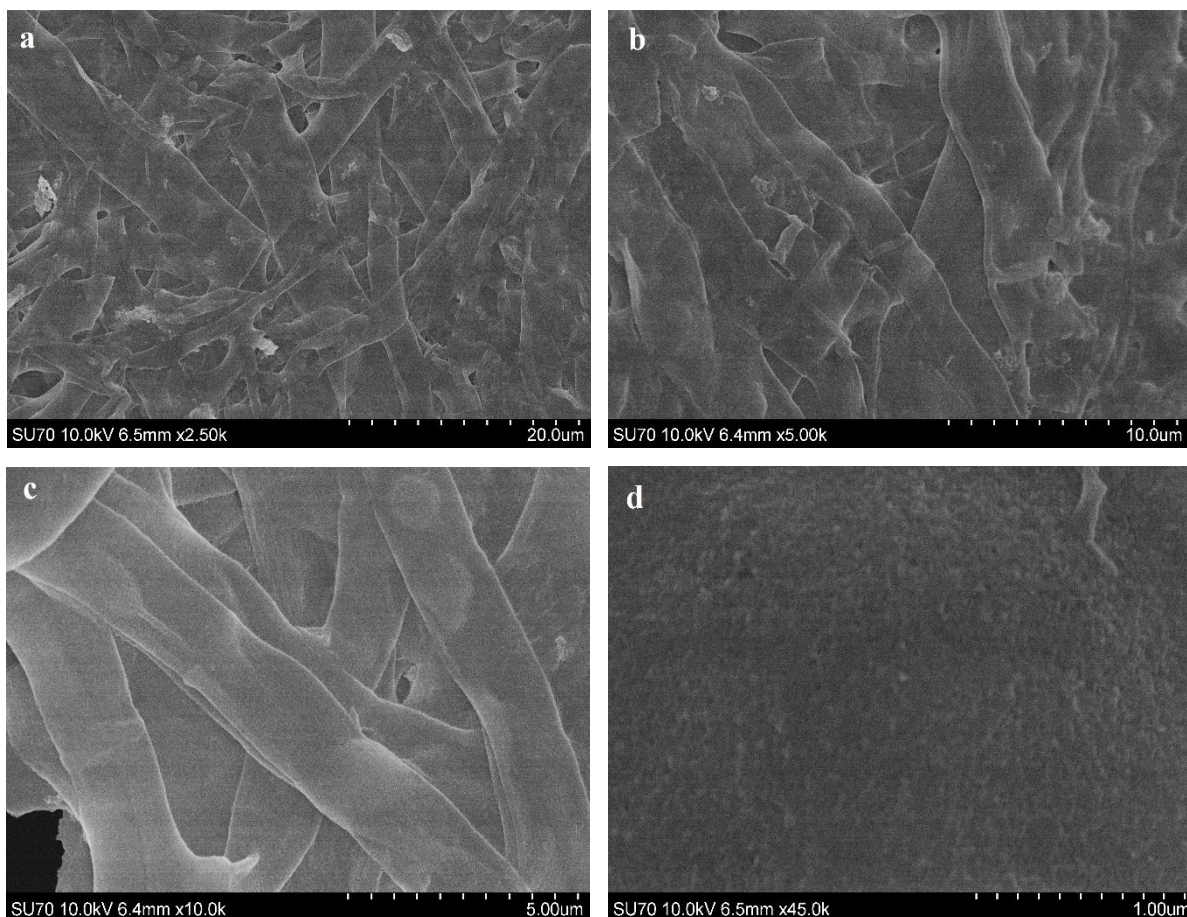
Vėžiagyvių chitino ir chitozано paviršiu būdingos dviejų tipų struktūros – fibrilės ir poros. Grybų chitino ir chitozано paviršius gali neturėti šių struktūrų dėl β -1,3-gliukanų priemaišų.

Nustatyta, kad iš *Penicillium* sp. micelio išskirto chitino paviršius yra lygus ir jam būdingos nanoporos, kurios yra matomos mėginio vaizdą padidinus 45000 kartų (13 pav. d). Nanoporos chitino paviršiuje yra mažesnės nei 100 nm. Sferinės struktūros chitino paviršiuje aptiktos nebuvo.

Panašią mikromicetų paviršinę struktūrą aprašo ir Aili su kolegomis (2019). Mokslininkai savo darbe iš *Penicillium camembertii* išskirto chitino paviršių apibūdina kaip turintį fibrilines struktūras, kurios yra smalesnės nei tos, kurios buvo nustatytos ankstesniuose išskyrimo etapuose. Mokslininkų Raquel et al. (2014) atliktame darbe iš *Rhizopus arrhizus*

išskirto chitino paviršius pasižymėjo gerai matoma mikrofibrilių kristalinė struktūra, paviršiuje nanoporos aptiktos nebuvo.

Iš makromicetų išskirtas chitinas taip pat pasižymi skirtinga paviršiaus morfologija, pavyzdžiui, iš *Lactarius vellereus* ir *Phyllophora ribis* išskirtas chitino paviršius apibūdinamas kaip lygus, neturintis pluoštų ir/ar nanoporų, o išskirtas iš *Fomitopsis pinicola* pasižymi 10–15 nm dydžio nanopluoštais ir 15–25 nm nanoporomis (You et al., 2017).



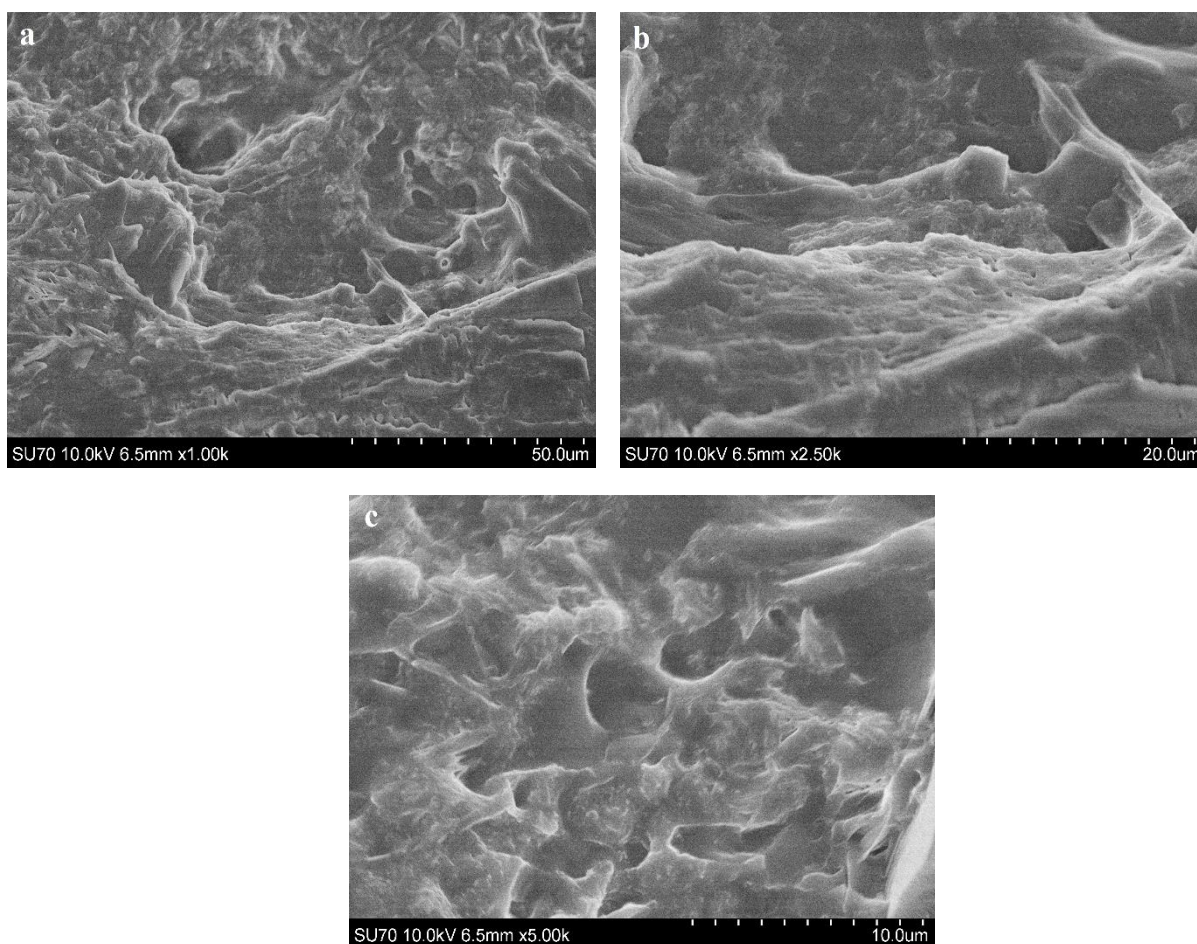
13 pav. Chitino SEM mikrografijos, išskirto iš *Penicillium* sp. micelio po dviejų etapų: šarminio ir rūgštinio apdorojimo. Matomos mikromicetų miceliui būdingos hifų struktūros: **a** – vaizdas padidintas 2500 kartų; **b** – vaizdas padidintas 5000; **c** – vaizdas padidintas 10000 kartų. Chitino paviršiuje matomos fibrilinės struktūros: **d** – vaizdas padidintas 45000 kartų.

3.3.2 Chitozano paviršiaus charakterizavimas

Darbe buvo įvertinti dviejų skirtingos kilmės chitozano mėginių paviršiai: grybinės kilmės chitozano, išskirto iš *Penicillium* sp. micelio ir gyvūninės kilmės chitozano, išskirto iš krabų kiautų (komercinis chitinas). Grybinės kilmės chitozano paviršiaus morfologija įvertinta po *Penicillium* sp. micelio apdorojimo, sudaryto iš trijų etapų: šarminio apdorojimo, rūgštinio

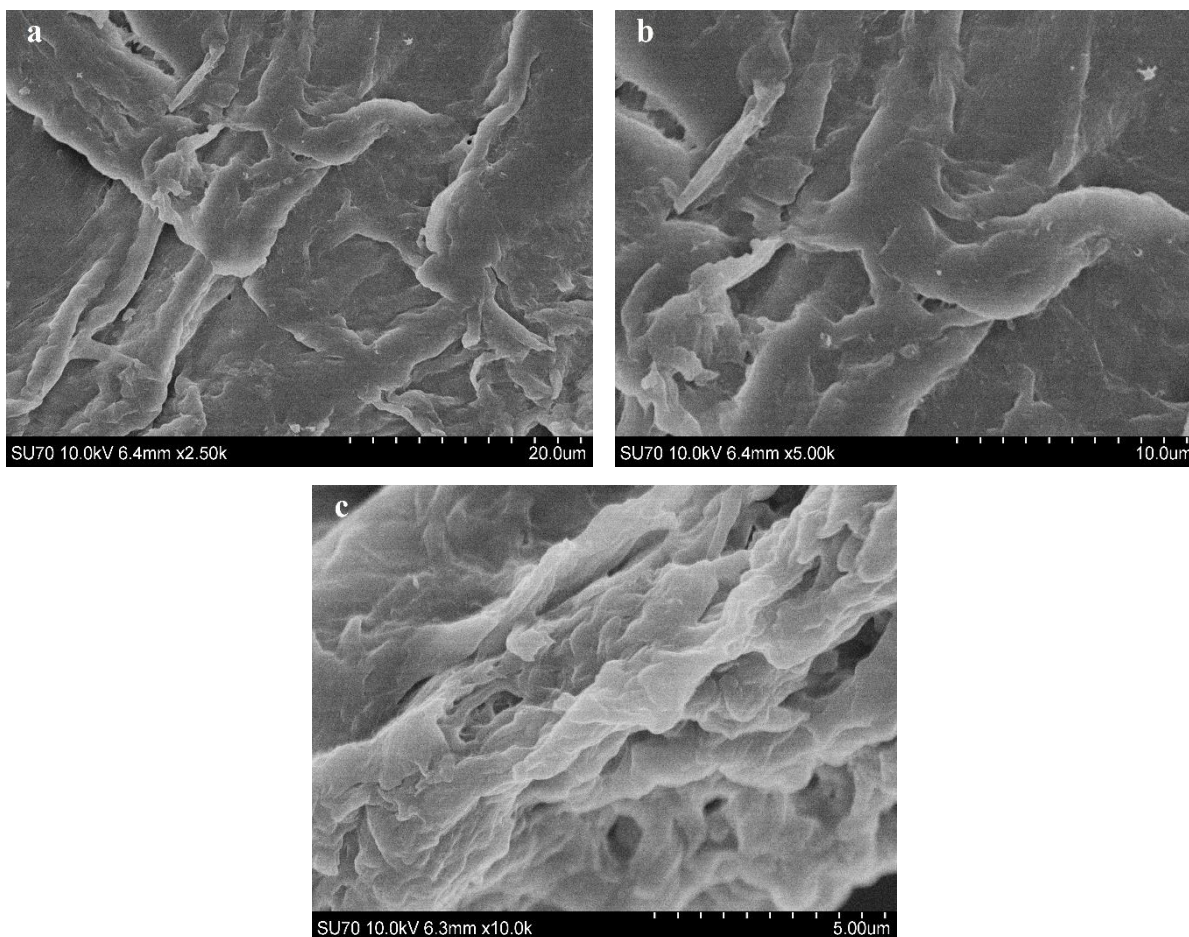
apdoravimo ir precipitacijos. Nustatyta, kad chitozono paviršius nelygus, gauta struktūra porėta, paviršiuje matomos fibrilės ir nanoporos. Chitozono paviršiaus fragmentai matomi mėginio vaizdą padidinus 1000, 2500 ir 5000 kartų (14 pav. a, b, c).

Literatūroje minima, kad chitozanas, išgautas iš chitino, išlaiko chitino paviršiui būdingas struktūras (You et al., 2017).



14 pav. Chitozono, išskirto iš *Penicillium* sp. micelio SEM mikrografijos, atvaizduotos po trijų išskyrimo etapų: šarminio apdoravimo, rūgštinio apdoravimo ir precipitacijos. Matomas nelygus, porėtas paviršius: **a** – vaizdas padidintas 1000 kartų. Paviršiuje matomos fibrilės ir nanoporos: **b** – vaizdas padidintas 2500. Matoma porėta struktūra: **c** – vaizdas padidintas 5000 kartų.

Chitozono, išskirto iš komercinio vėžiagyvių kilmės chitino, SEM mikrografijos atvaizduotos po vieno, deacetilavimo etapo. Chitozono mikrografijų vaizdą padidinus 2500 ir 5000 kartų matomas nelygus paviršius bei fibrilių struktūros (15 pav. a, b), mėginio vaizdą padidinus 10000 kartų matomas chitozono porėtas, fibrilinis paviršius (15 pav. c).



15 pav. Chitozano, išskirto iš komercinio vėžiagyvių kilmės chitino SEM mikrografijos atvaizduotos po vieno, deacetilimo etapo. Mėginio paviršius nelygus, matomos fibrilinės struktūros: **a** – vaizdas padidintas 2500 kartų; **b** – vaizdas padidintas 5000. Matomas porėtas, fibrilinis paviršius: **c** – vaizdas padidintas 10000 kartų.

Mokslininkų Anand et al. (2014) atlikto darbo metu iš krabų išgautas chitozano paviršius apibūdinamas kaip nelygus, porėtas, o chitozano dalelėms būdingas įvairus dydis. Kitame darbe buvo palygintas iš krabų išskirto komercinio chitozano ir iš komercinio chitino išskirto chitozano mėginių paviršius. Paviršius pasižymėjo morfologine įvairove: iš komercinio chitino išskirto chitozano mėginių paviršius aprašomas kaip pasižymintis mikropluoštinėmis kristalinėmis struktūromis, komercinio chitozano mėginiuose tokios struktūros pastebėtos nebuvo, tačiau buvo aptiktos dribsnių pavidalo struktūros (Yen et al., 2008).

3.3.3 Chitozano identifikavimas taikant FTIR

Iš skirtingų šaltinių išskirtas chitozanas identifikuotas taikant FTIR. FTIR analizė pagrįsta molekulių atomų virpesiais, kurie gali būti užregistruoti spektro pavidalu. Kadangi

kiekviena absorbcijos spektro smailė atitinka tam tikrą molekulos dalies virpesių dažnį, todėl galima nustatyti tam tikrus jungčių tipus mėginyje ir identifikuoti medžiagą.

Chitozano, išskirto iš *Penicillium* sp. micelio ir chitozano, išskirto iš komercinio gyvūninės (krabų) kilmės chitino FTIR spektre matomos chitozanui tipiškos sugerties juostos (16 pav., 17 pav.). Spektuose matoma plati sugerties juosta nuo 3000 cm^{-1} iki 3400 cm^{-1} , kuri susijusi su O-H ir N-H tempimu, atsiradusiu dėl vidumolekulinių ir tarpmolekulinių vandenilinių ryšių. Taip pat matomos dvi sugerties juostos nuo 2800 cm^{-1} iki 3000 cm^{-1} (chitozane, išskirtame iš *Penicillium* sp. micelio išreikšta nežymiai), susijusi su C-H virpesiais bei viena sugerties juosta ties 1426 cm^{-1} , susijusi su C-H virpesiais (Henrique et al., 2017).

Sugerties juosta ties 1150 cm^{-1} abiejų chitozano šaltinio spektuose susijusi su β (1–4) glikozidine jungtimi polisacharido molekulėje (Moussout et al., 2016). Smailės tarp 840 cm^{-1} ir 1170 cm^{-1} būdingos struktūriniam chitozano sacharidams.

Literatūroje I amido juostos reikšmė ties 1655 cm^{-1} (ties 1650 cm^{-1} grybinės kilmės chitozane ir ties 1652 cm^{-1} gyvūninės kilmės chitozane) ir II amido juostos reikšmė ties 1590 cm^{-1} (ties 1555 cm^{-1} grybinės kilmės chitozane ir 1552 cm^{-1} gyvūninės kilmės chitozane) vertinama nevienareikšmiškai. Kumirska et al. (2010) darbe teigiama, kad chitino deacetilinimo metu sugerties smailės ties 1655 cm^{-1} reikšmė mažėja, o ties 1590 cm^{-1} – didėja, toks reiškinys rodo NH_2 grupių susidarymą. Tačiau Moussout et al. (2016) teigia, kad deacetilinimo metu I amido sugerties juosta mažėja, tuo tarpu padidėjusi II amido sugerties juosta rodo NH_2 grupių formavimąsi. Šiame darbe gauti rezultatai sutampa su Moussout et al. (2016) pateikiamu rezultatų vertinimui, tačiau prieštarauja Kumirska et al. (2010) pateiktai informacijai.

Atlikus analizę buvo nustatyta, kad chitozano FTIR spektrai pasižymėjo ir chitinui, ir chitozanui būdingomis sugerties juostos smailėmis. Sugerties smailė ties 3100 cm^{-1} chitozane, išskirtame iš *Penicillium* sp. micelio ir ties 3099 cm^{-1} iš komercinio chitino išskirtame chitozane būdinga acetilo grupei, ji charakterizuoja chitiną. Grybinės kilmės chitozano spektre ši smailė matoma, tačiau nėra labai išreikšta. Tokie duomenys reiškia, kad chitozanas pasižymi aukštu deacetilinimo laipsniu, tačiau tiriamosios medžiagos turi ir chitino. Literatūroje nurodoma, kad išskiriant chitozaną gaunamas chitino-chitozano mišinys, nes chitino deacetilinimo procesas nėra baigtinis reiškinys ir polimere visada yra tam tikras kiekis acetilintų gliukozamino vienetų (Islam et al., 2017). Tačiau vėžiagyvių kilmės chitozano spektre ši smailė išraiškinga. Tokie rezultatai gali reikšti, kad komercinio chitozano deacetilinimas įvyko tik iš dalies ir jį sudaro didesnė dalis acetilintų gliukozamino vienetų nei iš *Penicillium* sp. micelio išskirtą chitozaną.

Chitozane, išskirtame iš *Penicillium* sp. micelio matoma smailė ties 2923 cm^{-1} būdinga ksilanams, gliukanams ir karaginanams. Dėl šios priežasties, galima teigti, jog mėginyje yra gliukanų priemaišų.

Chitozanas, gautas iš gyvūninės kilmės organizmų, gali turėti užteršimą glikozaminoglikanais, jie yra sulfilinti ir dėl jų matoma aštri smailė ties 1260–1270 cm^{-1} .

Vienas iš būdų, taikomų nustatant chitozano deacetilinimo laipsnį yra FTIR, tačiau gaunama reikšmė yra preliminari. Šiame darbe gauti chitozano spektrai turi priemaišų, kurios neleidžia nustatyti deacetilinimo laipsnio remiantis FTIR spektroskopija. Be to, taikant šį metodą deacetilinimo laipsnio nustatymui reikalinga skirtingų *N*-acetilgliukozamino koncentracijų standartinė sugerties kreivė, be kurios rezultatų gavimas negalimas. FTIR spektro analizė yra sudėtinga ir nevienareikšmiška, nes nėra aiškios rezultatų vertinimo metodikos, todėl nėra patikima nustatyti deacetilinimo laipsnį naudojant FTIR.

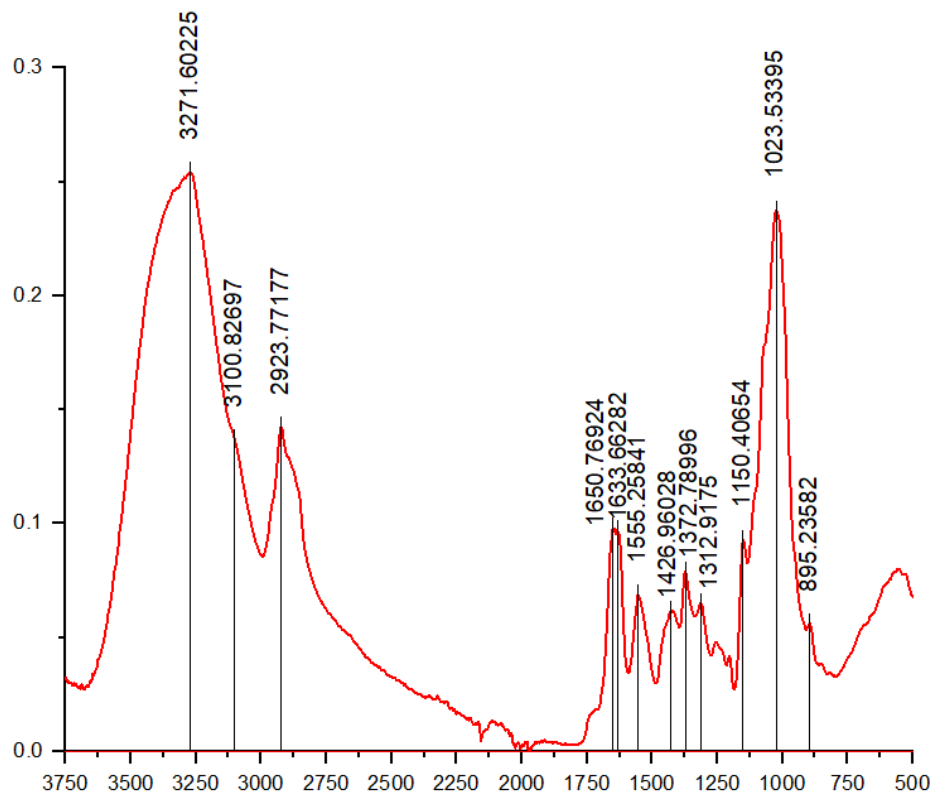
3.2.4 Chitino kristalinės formos nustatymas

Pagal chitiną sudarančių gliukozamino grandinių išsidėstymą skiriamos trys polimorfinės formos, nuo kurių priklauso biopolimero kristalinė struktūra: α , β arba γ (Kaya et al., 2017). Remiantis gautais chitozano FTIR sugerties spektrais galima nustatyti chitino kristalų formą. Pagrindinis požymis nustatant chitino kristalų formą yra FTIR spektro absorbcijos juostos ties 1660 cm^{-1} ir 1550 cm^{-1} , kurios atitinkamai charakterizuojamos kaip amido I ir II grupės. Literatūroje pateikiama ir daugiau chitino kristalų formos nustatymui būdingų smailių, tačiau dauguma jų nėra matomos chitozano FTIR spektre.

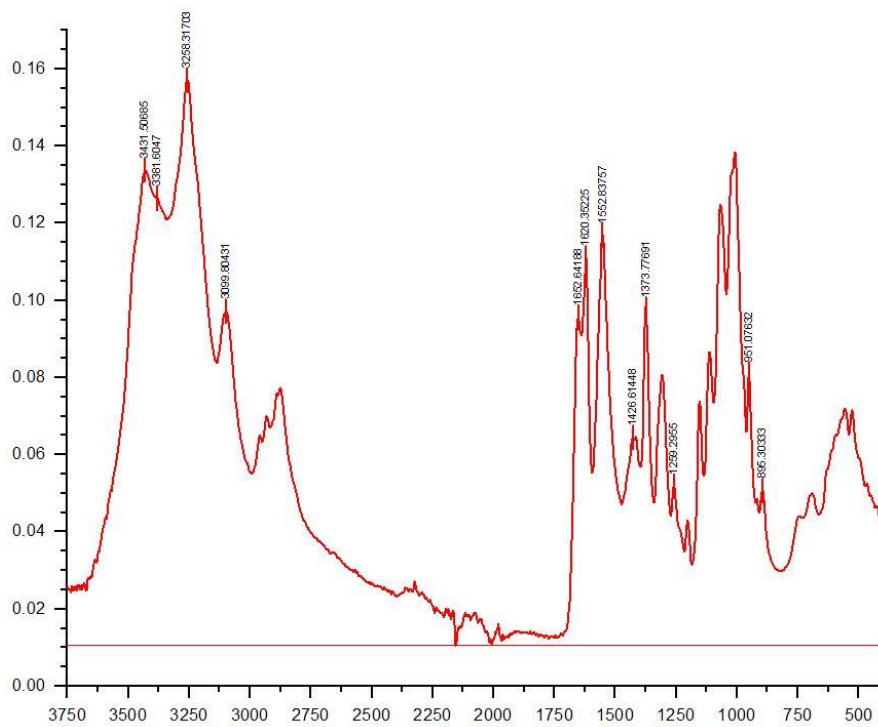
Chitozano, išskirto iš komercinio vėžiagyvių kilmės chitino amido I juosta padalinta į dvi aštrias smailes ties 1652 cm^{-1} ir 1620 cm^{-1} , toks padalijimas būdingas α formos chitinui (17 pav.) Šios smailės charakterizuoja tarmolekulinių ir vidumolekulinių vandenilinių jungčių virpėjimą: vandenilinių jungčių tarp C=O virpėjimą bei vandenilinių jungčių virpėjimą tarp $-\text{CH}_2\text{OH}$ šoninės grandinės ir C=O, atitinkamai. Tokia chitino kristalinė forma reiškia, kad biopolimeras sudarytas iš antilygiagrečių grandinių, kurias jungia stiprus vandenilinis ryšys. Dažniausiai α formos chitinas išskiriamas iš krabų ir kitų vėžiagyvių kiautų, be to tai labiausiai paplitusi chitino kristalinė forma (Kaya et al., 2017; Zelencova et al., 2015; Jang et al., 2004).

Chitozano, išskirto iš *Penicillium* sp. micelio FTIR spektre nustatyta viena I amido grupei priklausanti sugerties smailė ties 1650 cm^{-1} , kuri būdinga β formos chitinui. Ši smailė charakterizuoja vidumolekulinių vandenilinių jungčių virpėjimą tarp C=O. Tai reiškia, kad β chitino kristalinė struktūra yra sudaryta iš lygiagrečių grandinių, kurias jungia silpnas vandenilinis ryšys, nei α chitino struktūroje (Jang et al., 2004). β chitino kristalinė forma dažniausiai aptinkama moliuskuose.

Nei viename tirtame chitozano mėginyje nebuvo aptikta γ chitino kristalinė forma.



16 pav. Chitozano, išskirto iš *Penicillium* sp. micelio FTIR sugerties spektras.



17 pav. Chitozano, išskirto iš komercinio gyvūninės (krabų) kilmės chitino, FTIR sugerties spektras.

3.3.5 Chitozano identifikavimas taikant BMR

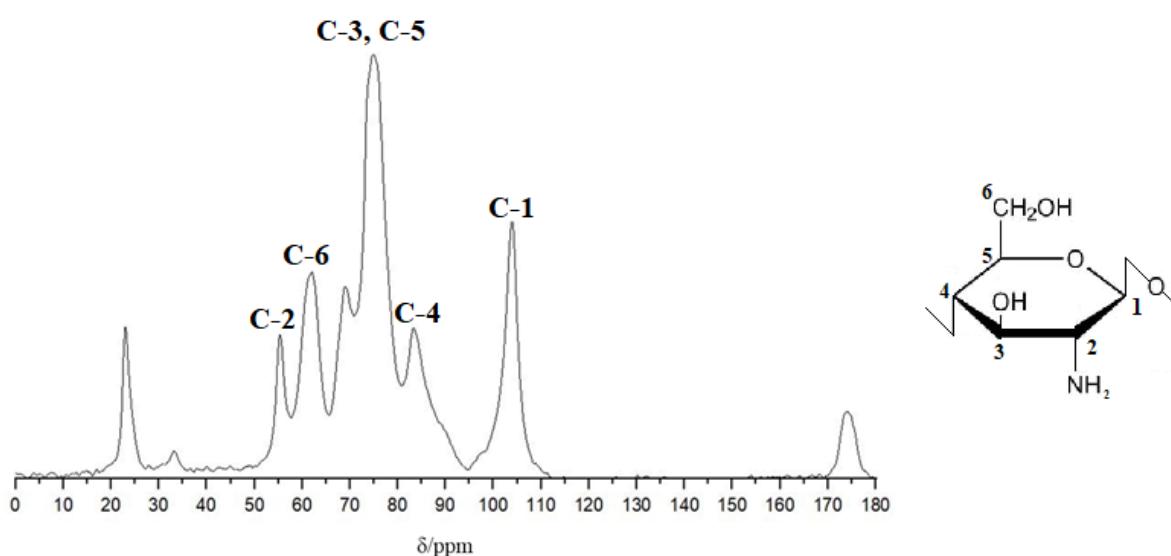
Chitozanas, išskirtas iš *Penicillium* sp. micelio, identifiкуotas taikant kietosios fazės ^{13}C BMR ir ^1H BMR analizę.

^{13}C BMR yra BMR spektroskopija, leidžianti identifikuoti anglies atomus organinėje molekulėje. Analogiškai ^1H NMR (protonų BMR) spektroskopija leidžia nustatyti vandenilio atomus. ^{13}C BMR spektroskopija nustato tik ^{13}C anglies izotopą, kurio natūralus paplitimas siekia 1,1%, o pagrindinis anglies izotopas ^{12}C BMR aptinkamas nėra, nes jo branduolinis sukinyis lygus 0 (Adya et al., 2013).

^{13}C BMR spektro smailės charakterizuoja šešis anglies atomus pastikartojančiame D-gliukozamino molekulėje. Atlikus ^{13}C BMR analizę buvo nustatyti šie C signalai: anomerinis C-1 signalas iš abiejų monosacharidų liekanų (gliukozamino ir *N*-acetilgliukozamino) ties δ 103,93, C-3 ir C-5 signalai ties δ 74,87, C-6 signalas ties δ 61,99, C-4 poslinkio signalas ties δ 83,31 dėl gliukozilinio 4-oje pozicijoje ir C-2 rezonansas, pasislinkęs į δ 55,35 dėl amino grupių poveikio (18 pav.) (Kumirska et al., 2010).

Kiti signalai iš *N*-acetyl grupės *N*-acetilgliukozamino liekanoje nustatyti ties δ 22,99, o ties δ 174,23 – dėl karboksilo grupės atomų (Kumirska et al., 2010). Signalas ties δ 68,5 matomas dėl C atomų gliukanų priemaišose.

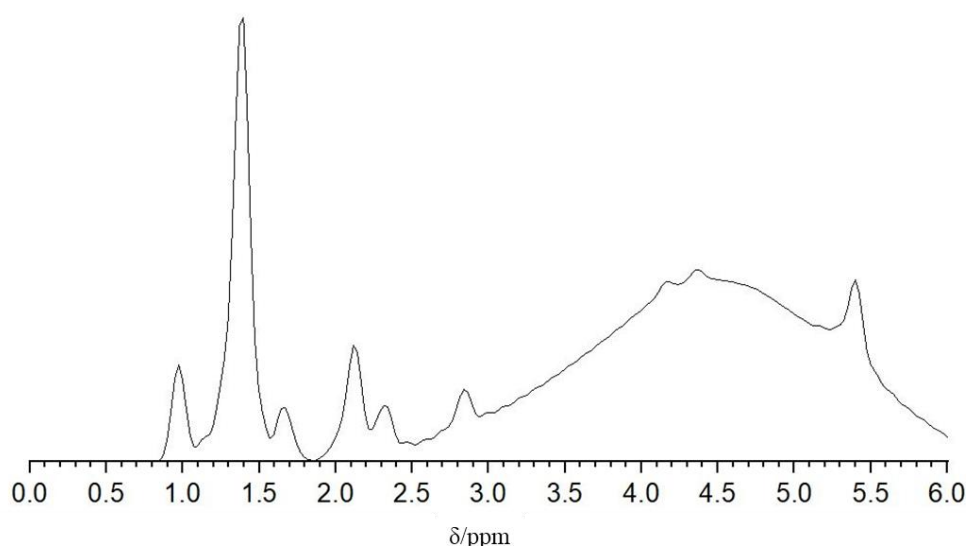
Nustatytų signalų reikšmės yra labai artimos tipiškomis chitozano ^{13}C BMR spektro signalų reikšmėms, peteikiamoms literatūroje, todėl galima teigti, kad iš *Penicillium* sp. micelio chitozanas buvo išskirtas kokybiškai.



18 pav. Chitozano, išskirto iš *Penicillium* sp. micelio kietosios fazės ^{13}C BMR spektras. Spektras užregistruotas esant 400 MHz ir 22 °C temperatūrai.

Remiantis ^{13}C BMR buvo nustatytas iš *Penicillium sp.* micelio išskirto chitozono preliminarus deacetilinimo laipsnis, lygus 69,64 %. Aili et al. (2019) atliktame darbe, kuriame taikytas analogiškas chitozono išskyrimo būdas iš pelėsinių grybų, nustatyta, kad *Penicillium waksmanii* deacetilinimo laipsnis lygus 65,1 %, *Penicillium citrinum* – 62,4 %. Literatūroje minimos įvairios iš *Penicillium sp.* micelio išskirto chitozono deacetilinimo laipsnio vertės, tačiau tokius rezultatus sudėtinga interpretuoti su gautais šiame darbe, nes skirtingos chitozono išskyrimo sąlygos gali lemti skirtingus rezultatus.

Atlikus kietosios fazės ^1H BMR analizę, gautas spektras, kuris dėl mėginyje esančių priemaišų pasižymi maža rezoliucija. Nors spektras yra sunkiai analizuojamas, tačiau ties δ 2,1 ppm matomas smailė, kuri charakterizuoja *N*-acetil grupę (Kumirska et al., 2010) (19 pav.).



19 pav. Chitozano, išskirto iš *Penicillium sp.* micelio ^1H BMR spektras. Spektras užregistruotas esant 400 MHz ir 22 °C temperatūrai.

Smailė, matoma regione ties δ 4-5 ppm, galimai atitinka skirtingus (α ir β) glikozidinius ryšius. Skirtingo tipo ryšiai, kaip ir papildoma grupė, turinti vandenilio atomą gali neigiamai veikia spektro rezoliuciją, dėl šios priežasties gautos smailės susilieja. Skystos fazės ^1H BMR spektrai pasižymi geresne rezoliucija, tačiau dėl prasto chitozano tirpumo tokio tipo chitozono spektrą išgauti yra sudėtinga, nes tirpiklio signalas neturėtų persidengti su mėginio signalu (Kumirska et al., 2010).

Šiame darbe pritaikius cheminį metodą iš *Penicillium sp.* pelėsinių grybų išskirtas chitozanas pasižymėjo būdingu šios genties mikromicetų micelyje aptinkamu chitozano kiekiu (Latha ir Suresh, 2013). Sėkmingą chitozono ekstrakciją ir paviršiaus morfologiją leido patvirtinti FTIR, BMR spektrai ir SEM bei kitų tyrėjų duomenys. Taikant ^{13}C BMR analizę

nustatytas deacetilinimo laipsnis lygus 69,64 %. Deacetilinimo laipsnis yra vienas svarbiausių parametru, nusakantis chitozano veiklumą, nes jis atitinka polimero procentinį deacetilintų D-gliukozamino vienetų kiekį, kuriuose susidariusi amino grupė dėl teigiamo krūvio gali sąveikauti su neigiamai įkrautomis molekulėmis. Todėl kuo aukštesnis chitozano deacetilinimo laipsnis, tuo stipresne sąveika su kitomis molekulėmis jis pasižymi. Literatūroje minima, chitozano deacetilinimo laipsnis yra atvirkščiai proporcingas sudaromų nanodalelių dydžiui. Mažesnės nanodalelės pasižymi pranašesnėmis savybėmis nei didesnės, todėl šiame darbe iš *Penicillium* sp. išskirtas chitozanas suteiktų nanodalelėms geresnį funkcionalumą sąveikaujant su kitomis molekulėmis ar ląstelėmis (Frank et al., 2020).

5. NUMATYTI EKSPERIMENTAI

5.1 Chitino deacetilinimas ir analizė

Šiame darbe komercinio chitino deacetilinimas įvyko iš dalies, todėl buvo numatyta atlikti prailgintą deacetilinimo etapą, aprašytą (Patria, 2013). Tam numatyta pakartoti 2.3.2 aprašyta eiga, prailginus procedūros trukmę iki 6 val. Chitozono išskyrimo patvirtinimui, deacetilinimo laipsnio nustatymui bei išskirto biopolimero paviršiaus struktūros įvertinimui yra numatyta pakartoti analizės: SEM, kuri aprašyta 2.3.3, FTIR ir BMR, kurios aprašytas 2.3.4 ir 2.3.5, atitinkamai. Dažniausiai iš vėžiagyvių kiatutų išskirtas chitozanas pasižymi aukštu deacetilinimo laipsniu, Ebrahimzadeh et al. (2013) nurodoma, kad šis rodiklis siekia 84-90 %.

5.2 Chitozono molekulinės masės nustatymas

Chitozono molekulinė masė apsprendžia polimero tirpumą. Mažesnės molekulinės masės chitozanas pasižymi geresniu tirpumu nei didesnės, o nuo tirpumo priklauso chitozono sąveikavimo efektyvumas. Paprastai iš vėžiagyvių kiatutų išskirtas chitozanas turi pasižymi didele molekuline mase (apie $1,5 \times 10^6$ Da), o iš grybų vidutine ir maža ($1-12 \times 10^4$ Da) (Dhillon et al., 2012).

Vidutinę chitozono viskozimetrinę molekulinę masę buvo numatyta nustatyti taikant viskozimetrijos metodą, aprašytą Garcia et al. (2019). Chitozono mėginiai 1% (masė/tūris) paruošiami buferiniame tirpale (0,2 M CH_3COONa ir 0,3 M CH_3COOH – pH ~ 4,5). Chitozono mėginių santykinis klampumas matuojamas naudojant kapiliarinį viskozimetrą esant 30 °C temperatūrai. Vidutinę viskozimetrinę molekulinę masę įvertinama apskaičiavus savitąją klampą, vidutinę klampą ir sumažintąją klampą. Savitoji klampa nustatoma naudojant (3) lygtį.

$$\eta_{\text{sav}} = (\eta_{\text{tirpalo}} - \eta_{\text{tirpiklio}}) / \eta_{\text{tirpiklio}} \quad (3)$$

kur: η_{sav} – savitoji klampa, η_{tirpalo} – chitozono tirpalo klampa, $\eta_{\text{tirpiklio}}$ – buferinio tirpalo klampa.

Vidinė klampa yra apibrėžiama kaip sumažintoji klampa, ekstrapoliuota iki chitozono koncentracijos, lygios nuliui. Vidinė klampa nustatoma naudojant (4) lygtį.

$$\eta_{\text{vid}} = (\eta_{\text{sav}}/C)_{c \rightarrow 0} = (\eta_{\text{sum}})_{c \rightarrow 0} \quad (4)$$

čia: η_{vid} – vidinė klampa, η_{sav} – savitoji klampa, C – chitozano koncentracija, η_{sum} – sumažintoji klampa.

Vidutinė viskozimetrinė molekulinė masė apskaičiuojama pagal *Mark-Houwink* lygtį (5).

$$\eta = KM_v^a \quad (5)$$

kur: η – vidinė klampa, M_v – vidutinės klamos molekulinė masė, K ir a yra empiriškai apskaičiuojamos tirpinio–tirpiklio sistemos konstantos.

5.3 Chitozano antimikrobinio poveikio nustatymas

Įvertinus iš *Penicillium* sp. išskirto chitozano antimikrobiškumą, būtų galima nustatyti kokį poveikį jis turi patogeniniams mikroorganizmams bei pritaikyti įvairiose srityse kaip antimikrobinį agentą.

Chitozano antimikrobinio aktyvumo tyrimui buvo numatyta taikyti difuzijos į agarą metodą. Tam chitozanas ištirpinamas CH_3COOH (1 %) tirpale atitinkamai, kad būtų gauti 2 g/l, 1,5 g/l, 1 g/l, 0,5 g/l koncentracijos chitozano tirpalai.

Paruošiamos skirtingos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp. ir *Candida* sp. ląstelių suspensijos. Bakterijų suspensija praskiedžiama pagal McFarland'o standartą Nr. 0,5, atitinkantį bakterijų kultūros drumstumą $1,5 \cdot 10^8$ KSV/ml. Kiekvienos bakterijų ląstelių suspensija (250 μl) ir supilama į 100 ml agarizuotos terpės (PCA). Mitybinė terpė išmaišoma ir išpilstoma į Petri lėkšteles.

Sustingusioje mitybinėje terpėje su mikroorganizmai daromos keturios 7 mm diametro įdubos, į kurias dozuoja po 50 μl chitozano tirpalo. Kontrolinėje grupėje naudojamos lėkštelės be chitozano tirpalo, su acto rūgšties tirpalu (1 %) ir su antibiotiku polimiksino B sulfatu. Petri lėkštelės inkubuojamos esant 30–37 °C temperatūrai 24 h, priklausomai nuo optimalios kiekvieno mikroorganizmo augimo temperatūros. Po 24 h įvertinamas inhibicinių zonų susidarymas aplink įdubas.

5.4 Chitozano nanodalelių sintezė

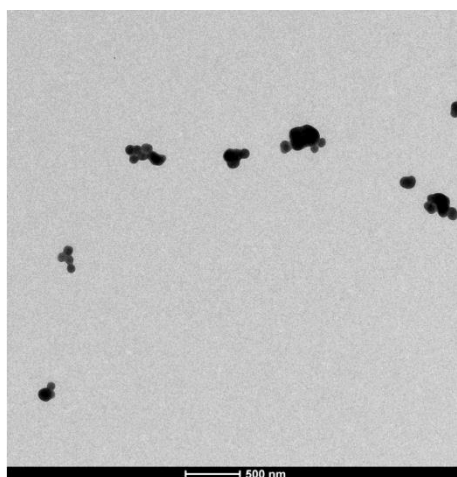
Chitozano nanodalelių sintezei buvo numatyta taikyti desolvacijos metodą, nes tokiu būdu pagamintos nanodalelės pasižymi didesne išeiga ir geresniu stabilumu nei taikant kitus

metodus Jiang et al., (2018). Numatyta atlikti procedūrą pagal Agnihotri et al. (2004) ir Jiang et al. (2018) aprašytas metodikas. Tam 0,25 g chitozono ištirpinami 50 ml CH₃COOH tirpale (2 %), kad susidarytų vienalytis tirpalas. Chitozono nanodalelių sintezė atliekama siekiant palyginti skirtingos kilmės chitozono nanodalelių gebėjimą sudaryti ir išlaikyti nanodalelės struktūrą. Chitozono nanodalelės suformuojamos po 30 min į nuolat maišomą tirpalą įmaišius acetono, santykiu 3/1 (acetonas/chitozono tirpalas). Chitozono nanodalelių cheminiam suliejimui ir stabilumui padidinti į mišinį pridedamas glutaro dialdehidas (25 %) ir maišoma 2 val. Perteklinis glutaro dialdehidas pašalinamas mišinį centrifuguojant 20 min, esant 10000 aps./min, acetonas pašalinamas išgarinant vakuume rotaciniu garintuvu.

5.5 Chitotano nanodalelių paviršiaus morfologijos įvertinimas

Chitozono nanodalelių paviršiaus morfologiją buvo numatyta įvertinti taikant SEM, pagal procedūrą, aprašytą 2.3.2. Šiame etape buvo numatyta įvertinti grybinės ir vėžiagyvių kilmės chitozono nanodalelių paviršiaus morfologiją.

Buvo tikimasi gauti panašius rezultatus, į aprašytus Jiang et al. (2018) (20 pav.). Šių mokslininkų darbe gautos chitozono nanodalelės pasižymėjo elipsinėmis ir sferinėmis struktūromis. Chitozono nanodalelių skersmuo siekė $196,3 \pm 11,6$ nm. Dėl statistinio patikimumo buvo numatyta atlikti eksperimento pakartojimus.



20 pav. Chitozono nodalelių morfologija. Vaizdas užfiksuotas transmisiniu elektroniniu mikroskopu (Jiang et al., 2018).

Sėkmingai susintetinus chitozono nanodaleles bei atlikus jų analizę tyrimas galėtų būti plėtojamas inkapsuliuojant aktyvius ingredientus, pavyzdžiui, riboflaviną į nanodalelių vidų bei tirti tokių dalelių savybes *in vivo* ir *in vitro*.

IŠVADOS

1. Pritaikius cheminį metodą iš *Penicillium* sp. pelėsinių grybų išskirtas chitozanas pasižymėjo būdingu šios genties mikromicetų micelyje aptinkamu chitozано kiekiu: sausą micelį sudarė 46 % chitino ir 28 % chitozано. Lyginant su duomenimis, pateiktais literatūroje, šiame darbe išgauto biopolimero kiekis yra aukštesnis, nei paprastai būdinga iš vėžiagyvių išskirtam chitozanui.
2. Taikant ^{13}C BMR analizę nustatytas chitino deacetilavimo laipsnis lygus 69,64 %.
3. Taikant FTIR, BMR spektrinę analizę ir SEM patvirtinta, kad chitino ir chitozано paviršiaus morfologija atitinka šių biopolimerų paviršiui būdingus požymius, chitinui būdinga β chitino kristalų forma, chitozanas pasižymi ne mažesniu nei 69 % deacetilavimo laipsniu.
4. Šis darbas turi mokslinę perspektyvą, jį reikia tęsti, siekiant ištirti chitozано antimikrobinį poveikį ir pritaikymą nanodalelių sintezėje.

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Giedrė Jakubauskaitė
Magistro baigiamasis darbas

Chitozano nanodalelių sintezė iš pelėsinių grybų

Chitozanas yra katijoninis linijinis biopolimeras, sudarytas iš pasikartojančių D–gliukozamino ir N–acetil–D–gliukozamino vienetų, kuris dažniausiai išgaunamas iš vėžiagyvių. Chitozanas pasižymi antibakterinėmis savybėmis yra netoksiškas ir biologiškai suyantis, todėl turi didelį pritaikomumą įvariose srityse, tarp jų ir farmacijoje, kur yra naudojamas nanodalelių padengimui, kurios skirtos vaistų ar kitų aktyviųjų ingredientų pernašai. Nuolat didėjantis chitozano poreikis verčia ieškoti alternatyvių jo išgavimo šaltinių. Šiam tikslui gali būti panaudojami pelėsiniai grybai, kurie sudaro didelę dalį biotechnologijos pramonės atliekų.

Šio darbo tikslas buvo išskirti chitozaną iš *Penicillium* sp. iš pelėsinių grybų ir pagaminti chitozano nanodaleles. Iškeltam tikslui pasiekti buvo išskirtas chitinas ir chitozanas, įvertinti šių biopolimerų fizikiniai-cheminiai rodikliai, buvo numatyta atlikti chitozano antimikrobinio aktyvumo įvertinimą bei susintetinti chitozano nanodaleles. Chitozano išskyrimui taikytas cheminis metodas, chitino ir chitozano fizikinių-cheminių rodiklių įvertinimui taikytos SEM, FTIR, ¹³BMR ir ¹H BMR analizės. Antimikrobinio aktyvumo įvertinimui buvo numatyta taikyti difuzijos į agarą metodą, o nanodaleles susintetinti taikant desolvacijos metodą. Atlikus eksperimentinius tyrimus chitinas ir chitozanas buvo sėkmingai išskirti iš *Penicillium* sp. micelio. Tyrimo metu nustatyta, kad iš *Penicillium* sp. išskirtam chitinui būdingos paviršiaus nanoporos ir β chitino kristalinė forma, chitino išėiga siekė 46 %, chitozano – 28 %. Nustatyta, kad preliminarus chitozano deacetilimo laipsnis yra lygus 69,64 %. Šie rezultatai leidžia teigti, kad chitozanas yra išskirtas kokybiškai.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER
INSTITUTE OF BIOSCIENCES

Giedrė Jakubauskaitė
Master thesis

Synthesis of Chitosan Nanoparticles from Mold Fungus

Chitosan is a cationic linear biopolymer composed of repeating units of D-glucosamine and *N*-acetyl-D-glucosamine, which is most often extracted from crustaceans. Chitosan is special due to its antibacterial properties it is non-toxic and biodegradable, therefore, it is highly adaptable in various fields, including pharmaceuticals, where it is used to create nanoparticle coating that is applied for transfer of drugs and other active ingredients. The ever-increasing demand for chitosan forces us to look for alternative sources of its extraction. Molds, which make up a large proportion of waste from the biotechnology industry, can be used for this purpose.

The objective of this work was to extract chitosan from *Penicillium* sp. molds and produce chitosan nanoparticles. To reach the objective, chitin and chitosan were extracted, physicochemical properties of these biopolymers were evaluated. It was planned to evaluate the antimicrobial activity of chitosan and to synthesize chitosan nanoparticles. The chemical method used to isolate chitosan, SEM, FTIR, ¹³BMR, and ¹H NMR analyzes were used to evaluate the physicochemical parameters of chitin and chitosan. The agar diffusion method was planned to be used to evaluate antimicrobial activity, nanoparticles were planned to be synthesized by using the desolvation method.

Chitin and chitosan were successfully isolated from *Penicillium* sp. mycelium. During the study it was determined that chitin that was isolated from *Penicillium* sp., is characterized by surface nanopores and a crystalline form of β chitin, the yield of chitin was 46% and that of chitosan was 28%. The preliminary degree of deacetylation of chitosan was found to be 69.64%. These results substantiate suggest that chitosan is isolated qualitatively.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abdelmalek, B. E., Sila, A., Haddar, A., Bougatef, A., Ayadi, M. A. (2017). β -chitin and chitosan from squid gladius: Biological activities of chitosan and its application as clarifying agent for apple juice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 93–962. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.107>
2. Abo Elsoud, M. M., El Kady, E. M. (2019). Current trends in fungal biosynthesis of chitin and chitosan. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0105-y>
3. Adya, A. K., Gautam, A., Zhang, L., Varma, A. (2013). Morphology and Ultrastructure of Piriformospora indica-Sebacinales and Their Biotechnological Applications. *Soils Biology* (Vol. 33). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-33802-1>
4. Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N., Aminabhavi, T. M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 100(1), 5–28. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.08.010>
5. Agotegaray, M., Campelo, A., Zysler, R., Gumilar, F., Bras, C., Minetti, A., Gumilar, F. (2016). Influence of chitosan coating on magnetic nanoparticles in endothelial cells and acute tissue biodistribution. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 5063(June). <https://doi.org/10.1080/09205063.2016.1170417>
6. Aili, D., Adour, L., Houali, K., Amrane, A. (2019). Effect of temperature in Chitin and Chitosan production by solid culture of *Penicillium Camembertii* on YPG medium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 33, 998–1007. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.116>
7. Akbari-alavijeh, S., Shaddel, R., Jafari, S. M. (2020). Encapsulation of food bioactives and nutraceuticals by various chitosan-based nanocarriers. *Food Hydrocolloids*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105774>
8. Alagesan, C. M., Panneerselvam, A., Rathinam, K. M. S. (2016). Extraction, Optimization and Characterization of Chitosan from *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Chitin and Chitosan Science*, 3(3), 19–26.
9. Albuquerque, R., Lúcia, T., Stamford, M., Leite, E., & Souza, D. (2011). Sensory evaluation and inhibition of *Listeria monocytogenes* in bovine pâté added of chitosan from *Mucor rouxii*. *LWT - Food Science and Technology*, 44(2), 588–591. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.08.016>
10. Anand, M., Maruthupandy, M., Kumaraguru, A., Suresh, S. (2014). *Extraction and Characterization of Chitosan from*, vol. 2, 1–8. <https://doi.org/10.1166/jcc.2014.1053>

11. Anraku, M., Fujii, T., Furutani, N., Kadowaki, D., Maruyama, T., Otagiri, M., Tomida, H. (2009). Antioxidant effects of a dietary supplement: Reduction of indices of oxidative stress in normal subjects by water-soluble chitosan. *Food and Chemical Toxicology*, 47(1), 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.10.015>
12. Anu Mary Ealias and Saravanakumar M P. (2017). A review on the classification , characterisation, synthesis of nanoparticles and their application, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/3/032019>
13. Artan, M., Karadeniz, F., Zafer, M., Kim, M., Kim, S. (2010). Anti-HIV-1 activity of low molecular weight sulfated chitoooligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 345(5), 656–662. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.12.017>
14. Azevedo, M. A., Bourbon, A. I., Vicente, A. A., & Cerqueira, M. A. (2014). Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.036>
15. Barbieri, S., Buttini, F., Rossi, A., Bettini, R., Colombo, P., Ponchel, G., Sonvico, F. (2015). Ex vivo permeation of tamoxifen and its 4-OH metabolite through rat intestine from lecithin/chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.021>
16. Bastiaens, L., Soetemans, L., Hondt, E. D., Elst, K. (2019). Sources of Chitin and Chitosan and their Isolation.
17. Cé, R., Marchi, J. G., Bergamo, V. Z., Fuentesfria, A. M., Lavayen, V., Guterres, S. S., & Pohlmann, A. R. (2016). Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects Chitosan-coated dapsone-loaded lipid-core nanocapsules: Growth inhibition of clinical isolates, multidrug-resistant Staphylococcus aureus and Aspergillus ssp. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 511, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.09.086>
18. Chi, R., Cheung, F., Ng, T. B., Wong, J. H., & Chan, W. Y. (2015). Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Marine drugs*, 13, 5156–5186 <https://doi.org/10.3390/md13085156>
19. Choudhary, R. C., Kumari, S., & Budhwar, S. (2019). *Chitosan Nanomaterials for Smart Delivery of Bioactive Compounds in Agriculture*. <https://doi.org/10.1201/9781315123950-7>
20. Chuan, D., Jin, T., Fan, R., Zhou, L., & Guo, G. (2019). Chitosan for gene delivery: Methods for improvement and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*,

- 268, 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.03.007>
21. Chupa, J. M., Foster, A. M., Sumner, S. R., Madihally, S. V, Matthew, H. W. (2000). Vascular cell responses to polysaccharide materials: *Biomaterials*, 21(22), 2315–2322. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00158-7](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00158-7)
 22. Deng, X., Cao, M., Zhang, J., Hu, K., Yin, Z., Zhou, Z. Zeng, Y. (2014). Biomaterials Hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for co-delivery of MiR-34a and doxorubicin in therapy against triple negative breast cancer. *Biomaterials*, 35(14), 4333–4344. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.006>
 23. Dhillon, G. S., Kaur, S., Brar, S. K., & Verma, M. (2012). *reen synthesis approach : extraction of chitosan from fungus mycelia.* (July), 1–25. <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.717217>
 24. Divya, K., Jisha, M. S. (2017). Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environmental Chemistry Letters*, 16(1), 101–112. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0670-y>
 25. Ebrahimzadeh, M. A., Chabra, A., Gharaei-fathabad, E., Pourmorad, F. (2013). *Preparation of chitosan from Penicillium spp and determination of their degree of deacetylation.* 12(April), 231–235.
 26. Essick, E. E., & Sam, F. (2010). Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(3), 168–177. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.3.12106>
 27. Feng, T., Du, Y., Li, J., Hu, Y., Kennedy, J. F. (2008). Enhancement of antioxidant activity of chitosan by irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 73(1), 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.11.003>
 28. Francis Suh, J. K., Matthew, H. W. T. (2000). Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: A review. *Biomaterials*, 21(24), 2589–2598. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00126-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00126-5)
 29. Frank, L. A., Onzi, G. R., Morawski, A. S., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., Contri, R. V. (2020). Chitosan as a coating material for nanoparticles intended for biomedical applications. *Reactive and Functional Polymers*, 147. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104459>
 30. Garcia, S., Morgana, G., Guedes, D. M., Souza, D., Maia, C., Sidrim, J. C., Sâmia, R. (2019). Antifungal activity of different molecular weight chitosans against planktonic cells and biofilm of *Sporothrix brasiliensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.031>
 31. Garg, U., Chauhan, S., Nagaich, U., & Jain, N. (2019). Current Advances in Chitosan

- Nanoparticles Based Drug Delivery and Targeting. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9(2), 195–204. <https://doi.org/doi: 10.15171/apb.2019.023>
32. Ghormade, V., Pathan, E. K., & Deshpande, M. V. (2017). International Journal of Biological Macromolecules Can fungi compete with marine sources for chitosan production? *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 1415–1421. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.112>
 33. Grenha, A. (2012). Chitosan nanoparticles: A survey of preparation methods. *Journal of Drug Targeting*, 20(4), 291–300. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2011.654121>
 34. Gutierrez-martinez, P., Ledezma-morales, A., Carmen, L., Romero-islas, C., Ramos-guerrero, A., Romero-islas, J., González-estrada, R. (2018). Antifungal Activity of Chitosan against Postharvest Fungi of Tropical and Subtropical Fruits. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76095>
 35. Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants - Quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(3), 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.12.002>
 36. Hamed, I., Özogul, F., Regenstein, J. M. (2016). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.007>
 37. Harish Prashanth, K. V., & Tharanathan, R. N. (2005). Depolymerized products of chitosan as potent inhibitors of tumor-induced angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1722(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.11.009>
 38. Helander, I. M., Nurmiäho-lassila, E., Ahvenainen, R., Rhoades, J., & Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 71 (2-3), 235-244. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00609-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00609-2)
 39. Henrique, D., Ferreira, T., José, A., Microbiologia, D. De, Parasitologia, I., Biológicas, C. D. C., Catarina, S. (2017). Chitosans from *Rhizopus stolonifer* (strain CBMAI 1551): Characterization and Dense Film Formation Indexing terms / Keywords Academic Discipline And Sub-Disciplines. *Journal of Advenace in Biotechnology*, 6(3), 924–931.
 40. Iriti, M., & Varoni, E. M. (2015). Chitosan-induced antiviral activity and innate immunity in plants HAMPs or DAMPs. 2935–2944. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3571-7>
 41. Islam, S., Bhuiyan, M. A. R., & Islam, M. N. (2017). Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. *Journal of Polymers and the Environment*, 25, 854–866. <https://doi.org/10.1007/s10924-016-0865-5>
 42. Jang, M., Kong, B., Jeong, Y., Lee, C. H., & Nah, J. (2004). Chitin Separated from

- Natural Resources. *Journal of Polymer Science Part A*, 3423–3432.
<https://doi.org/10.1002/pola.20176>
43. Jardine, A., Sayed, S. (2016). Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry Challenges in the valorisation of chitinous biomass within the biore fi nery concept. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 2(2016), 34–39.
<https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2016.09.007>
 44. Jhones Luiz de Oliveira, Campos, R., Pereira, A. E. S., Nunes, L. E. S., Silva, C. C. L., Pasquoto, T., Lima, R., Fraceto, L. F. (2018). Promising System for Pest Management in Sustainable Agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5325–5334.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00331>
 45. Jiang, L., Duan, H., Ji, X., Wang, T., Wang, Y., & Qiu, J. (2018). Application of a simple desolvation method to increase the formation yield, physical stability and hydrophobic drug encapsulation capacity of chitosan-based nanoparticle. *International Journal of Pharmaceutics*, 545 (1-2), 117-127.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.03.044>
 46. Jiang, T., James, R., Kumbar, S. G., Laurencin, C. T. (2014). Chitosan as a Biomaterial: Structure, Properties, and Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery. In *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396983-5.00005-3>
 47. Kashyap, P. L., Xiang, X., Heiden, P. (2015). Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 77, 36-51. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.039>
 48. Kaya, M., Mujtaba, M., Ehrlich, H., Salaberria, A. M., Baran, T., Amemiya, C. T., Labidi, J. (2017). On Chemistry of γ -chitin On chemistry of γ -chitin. *Carbohydrate Polymers*, 176(August), 176, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.076>
 49. Kaya, M., Sofi, K., Sargin, I., & Mujtaba, M. (2016). Changes in physicochemical properties of chitin at developmental stages (larvae, pupa and adult) of *Vespa crabro* (wasp). *Carbohydrate Polymers*, 145, 64-70.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.010>
 50. Kean, T., & Thanou, M. (2010). Biodegradation , biodistribution and toxicity of chitosan ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 3–11.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.004>
 51. Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908–931.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>

52. Knidri, H. El, Belaabed, R., Addaou, A., Laajeb, A., & Lahsini, A. (2018). Extraction , chemical modification and characterization of chitin and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1181–1189. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.139>
53. Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., Stepnowski, P. (2010). Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine Drugs*, 8(5), 1567–1636. <https://doi.org/10.3390/md8051567>
54. Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8(3), 203–226. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-0097-5>
55. Latha, S., Suresh, G. (2013). Studies on chitosan production from different fungal mycelium. *International Journal of Current Studies on Current Biotechnology*, 1(1), 9–11.
56. Li, X., Wu, P., Gao, G. F., Cheng, S. (2011). Carbohydrate-Functionalized Chitosan Fiber for Influenza Virus Capture. *Biomacromolecules*, 3962–3969. <https://doi.org/10.1021/bm200970x>
57. Liu, S., Yang, S., & Ho, P. C. (2018). Intranasal administration of carbamazepine-loaded carboxymethyl chitosan nanoparticles for drug delivery to the brain. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.09.001>
58. Lizardi-Mendoza, J., Monal, W. M. A., Valencia, F. M. G. (2016). Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan. *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802735-6/00001-X>
59. Lugauskas A., Paškevičius A., Repečkienė J. (2002). Patogeniški ir toksiški mikroorganizmai žmogaus aplinkoje. 7–398 p. ISBN 9986-820-28-6
60. Malerba, M., Cerana, R. (2016). Chitosan Effects on Plant Systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms17070996>
61. Márquez, I. G., Akuaku, J., Cruz, I., Cheetham, J., Golshani, A., & Smith, M. L. (2013). International Journal of Food Microbiology Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 164(1), 108–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.025>
62. Masteikienė, R. R (2002). Maisto produktų mikrobiologija. 433-499 p. ISBN 9955-09-243-2
63. Matica, A., & Ostafe, V. (2017). Toxicity of chitosan based products. *Frontiers in*

- Chemistry*, 26(1), 65–74.
64. Mohammed, M. A., Syeda, J. T. M., Wasan, K. M., Wasan, E. K. (2017). An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. *Pharmaceutics*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9040053>
 65. Mohammed, M. O., Hussain, K. S., Haj, N. Q. (2017). Preparation and bioactivity assessment of chitosan-1-acetic acid-5-fluorouracil conjugates as cancer prodrugs. *Molecules*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/molecules22111629>
 66. Molinaro, G., Leroux, J., Damas, J., & Adam, A. (2002). Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogel: an in vivo experimental approach to injectable biomaterials. *Biomaterials*, 23, 2717–2722.
 67. Mooduto, L., Wahjuningrum, D. A., A, A. P., & Lunardhi, C. G. J. (2019). Antibacterial effect of chitosan from squid pens against *Porphyromonas gingivalis* bacteria. *Iranian Journal of Microbiology*, 23, 2717–2722. <https://doi.org/10.18502/ijm.v11i2.1084>
 68. Moussout, H., Ahla, H., Aazza, M., Bourakhouadar, M. (2016). Kinetics and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis. *Polymer Degradation and Stability*, 130, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.05.016>
 69. Muslim, S. N., AL-Kadmy, I. M., Ali, A. N. M., Dwaish, A. S., Khazaal, S. S., Muslim, S. N., & Aziz, S. N. (2018). Extraction of Fungal Chitosan and its Advanced Application. *Advances in Biotechnology*, 1–17.
 70. Naskar, S., Sharma, S., Kuotsu, K. (2019). Chitosan-based nanoparticles: An overview of biomedical applications and its preparation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 49(June), 66–81. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.10.022>
 71. Oberemko, A., Salaberria, A. M., Saule, R., Saulis, G., Kaya, M., Labidi, J., & Baublys, V. (2019). Physicochemical and in vitro cytotoxic properties of chitosan from mushroom species (*Boletus bovinus* and *Laccaria laccata*). *Carbohydrate Polymers*, 221(March), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.073>
 72. Oligochitosan, P., Ma, L. J., Li, Y., Wang, L. L., Li, X. M., Liu, T., & Bu, N. (2014). Germination and Physiological Response of Wheat (*Triticum aestivum*) to Pre-soaking with Oligochitosan. *International journal of agriculture & biology*, 766–770.
 73. Patel, K. D., & Kim, H. (2018). Carbon-based nanomaterials as an emerging platform for theranostics. *Materials Horizons*, <https://doi.org/10.1039/c8mh00966j>
 74. Patria, A. (2013). Production and characterization of Chitosan from shrimp shells waste.

- International Journal of the Bioflux Society*. 6(4), 339–344.
75. Pund, S., & Joshi, A. (2017). Nanoarchitectures for Neglected Tropical Protozoal Diseases: Challenges and State of the Art. In *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52727-9/00023-6>
76. Qin, Y., Li, P., & Guo, Z. (2020). Cationic chitosan derivatives as potential antifungals: A review of structural optimization and applications. *Carbohydrate Polymers*, 236, 116002. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116002>
77. Radhakrishnan, Y., & Glucose, H. (2015). Chitosan Nanoparticles for Generating Novel Systems for Better Applications: Chitosan Nanoparticles for Generating Novel Systems for Better Applications : A Review. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, (January 2015). <https://doi.org/10.4172/1747-0862.S4-005>
78. Raquel, L., Berger, R., Christina, T., Stamford, M., Stamford-arnaud, T. M., Roberto, S., Campos-takaki, G. M. De. (2014). Green Conversion of Agroindustrial Wastes into Chitin and Chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* Strains. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 9082-9102. <https://doi.org/10.3390/ijms15059082>
79. Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Sciences*, 31, 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
80. Rodríguez-vázquez, M., Vega-ruiz, B., Ramos-zúñiga, R., Saldaña-koppel, D. A., & Quiñones-olvera, L. F. (2015). Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *Biomed Research International*, <https://doi.org/10.1155/2015/821279>
81. Romanazzi, G., Gabler, F. M., Margosan, D., MacKey, B. E., & Smilanick, J. L. (2009). Effect of chitosan dissolved in different acids on its ability to control postharvest gray mold of table grape. *Phytopathology*, 99(9), 1028–1036. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-9-1028>
82. Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., Correa-Murrieta, M. A., Sánchez-Duarte, R. G., Cruz-Flores, P., & la Mora-López, G. S. (2018). Chitosan. *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*, 485-493. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00064-3>
83. Sivashankari, P. R., & Prabakaran, M. (2017). Deacetylation modification techniques of chitin and chitosan. In *Chitosan Based Biomaterials*, 1, 117-133. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100230-8.00005-4>
84. Tachaboonyakiat, W. (2017). Antimicrobial applications of chitosan. In *Chitosan Based Biomaterials Volume*, 2 (1). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100228-5.00009-2>

85. Teleanu, D. M., Chircov, C., Grumezescu, A. M., Volceanov, A., & Teleanu, R. I. (2018). Impact of Nanoparticles on Brain Health : An Up to Date Overview. *Journal of Clinical Medicine*, (7(12)). <https://doi.org/10.3390/jcm7120490>
86. Verlee, A., Mincke, S., Stevens, C. V. (2017). Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 164, 268–283. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001>
87. Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P. Schué, F. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012), *Pure and Applied Chemistry*, 84(2), 377–410.
88. Villa, T. G., Rama, J. L. R., & Ageitos, J. M. (2017). Antivirals against animal viruses. *Biochemical Pharmacology*, 133, 97–116. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.029>
89. Vinsova, J., & Vavrikova, E. (2011). Chitosan Derivatives with Antimicrobial, Antitumour and Antioxidant Activities - a Review. *Current Pharmaceutical Design*, 17(32), 3596–3607. <https://doi.org/10.2174/138161211798194468>
90. Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Samson, R. A. (2014). Studies in Mycology. *Studies in Mycology*, 78, 343–371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>
91. Wijesena, R. N., Tissera, N., Kannangara, Y. Y., Lin, Y., Amaratunga, G. A. J., De Silva, K. M. N. (2015). A method for top down preparation of chitosan nanoparticles and nanofibers. *Carbohydrate Polymers*, 117, 731–738. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.055>
92. Wiśniewska-Wrona, M. (2007). Biological Properties Of Chitosan Degradation Products. *Polish Chitin Society, Monograph XII*, 149–156.
93. Yadav, H. K. S., Joshi, G. B., Singh, M. N., Shivakumar, H. G. (2011). Naturally Occurring Chitosan and Chitosan Derivatives : A Review. *Current Drug Therapy*, 6–11. <https://doi.org/10.2174/157488511794079013>
94. Yadav, M., Goswami, P., Paritosh, K., Kumar, M., & Pareek, N. (2019). Seafood waste : a source for preparation of commercially employable chitin / chitosan materials. *Bioresources and Bioprocessing*. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0243-y>
95. Yadu, M, R. K., Aswathy, V., Parvathy, P., Sunija, S., Ms, N., & Shaji, N. (2017). Chitosan as Promising Materials for Biomedical Application : Review. *Research & Development in Material Science*, 170–185. <https://doi.org/10.31031/RDMS.2017.02.000543>
96. Yen, M. T., Yang, J. H., Mau, J. L. (2008). Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 74(4), 840–844.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.05.003>

97. You, A., Be, M. A. Y., In, I. (2017). *Chitin extraction and chitosan production from cell wall of two mushroom species (Lactarius vellereus and Phyllophora ribis)*. <https://doi.org/10.1063/1.4975427>
98. Younes, I. (2014). Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. *International Journal of Food Microbiology*, 185, 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.029>
99. Zargar, V., Asghari, M., & Dashti, A. (2015). A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng Reviews*, 2(3), 204–226. <https://doi.org/10.1002/cben.201400025>
100. Zelencova, L. (2015). Chitin Extraction and Chitosan Production from Chilopoda (*Scolopendra cingulata*) with Identification of Physicochemical Properties. *Natural Polymers*, 57(5), 437-444. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1150.1928>
101. Zhao, L., Shi, L., Zhang, Z., Chen, J., Shi, D., Yang, J., & Tang, Z. (2011). Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(03), 353–362.
102. 100. Zhu, K. Y., Merzendorfer, H., Zhang, W., Zhang, J., Muthukrishnan, S. (2016). Biosynthesis, Turnover, and Functions of Chitin in Insects. *Annual Review of Entomology*, 177–198. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023933>