

March 2024

COMPLEX FORMATION IN SOLUTION OF CHITOSAN AND BOMBYX MORI PROTEIN

Oynavod AVAZOVA

Institute of Chemistry and Physics of Polymers, Tashkent, Uzbekistan, avazova1972@mail.ru

Sayyora RASHIDOVA

Institute of Chemistry and Physics of Polymers, Tashkent, Uzbekistan, polymer@academy.uz

Follow this and additional works at: <https://cce.researchcommons.org/journal>

Recommended Citation

AVAZOVA, Oynavod and RASHIDOVA, Sayyora (2024) "COMPLEX FORMATION IN SOLUTION OF CHITOSAN AND BOMBYX MORI PROTEIN," *CHEMISTRY AND CHEMICAL ENGINEERING*: Vol. 2023: No. 1, Article 7.

DOI: 10.34920/cce202317

Available at: <https://cce.researchcommons.org/journal/vol2023/iss1/7>

This Article is brought to you for free and open access by Chemistry and Chemical Engineering. It has been accepted for inclusion in CHEMISTRY AND CHEMICAL ENGINEERING by an authorized editor of Chemistry and Chemical Engineering. For more information, please contact zuchra_kadirova@yahoo.com.

COMPLEX FORMATION IN SOLUTION OF CHITOSAN AND BOMBYX MORI PROTEIN

Oynavod AVAZOVA (avazova1972@mail.ru),
Sayyora RASHIDOVA (polymer@academy.uz)
Institute of Chemistry and Physics of Polymers, Tashkent, Uzbekistan

The purpose of the study is to identify the reaction conditions for the complex formation of chitosan and the Bombyx mori protein at pH and to determine the structure and properties of the obtained samples. The properties of Bombyx mori chitosan (Xs) and protein in solutions and their interaction under various reaction conditions (concentration and pH 4,88-6,7) were studied. The analysis of the obtained results was studied and the fundamental possibilities of obtaining complexes based on Bombyx mori chitosan and protein were determined. Conductometric titration showed that the COO- groups in the protein chain of Bombyx mori accounted for 4.95%, and these groups were shown to be electrostatically bonded to the protonated amino group (NH₂) of chitosan. Samples of the complexes were characterized by physicochemical methods. Using the IR spectrum method, it was shown that the absorption bands of the bending vibration of the NH and CN bonds (amide II) at 1573 cm⁻¹ per 1641 cm⁻¹ and NH₂ bonds (amide I) at 1517 cm⁻¹ per 1538 cm⁻¹, as well as in the region of the CH₂-OH bond at 1380 cm⁻¹, the band expands to 1390 cm⁻¹. The absorption band of ether bonds at 1032 cm⁻¹ expands by 1068 cm⁻¹. In general, the detected changes and shifts of the absorption bands in the IR spectra confirm the reaction of the complex between the chitosan molecule and the protein. The theoretical density functional theory (DFT) method showed that the protein has a greater ability to react with chitosan, the highest occupied (HOMO) of chitosan and lowest unoccupied molecular orbitals (LUMO) of the protein compete with the LUMO of the protein. Based on the structural properties of protein and chitosan, it can be concluded that it is possible to obtain biologically active complex preparations on their basis.

Keywords: silkworm pupae, chitosan, protein, infrared spectra

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ В РАСТВОРЕ ХИТОЗАНА И БЕЛКА BOMBYX MORI

Ойнавод АВАЗОВА (avazova1972@mail.ru),
Сайёра РАШИДОВА (polymer@academy.uz)
Институт химии и физики полимеров, Ташкент, Узбекистан

Цель исследования состоит в выявлении условий реакции комплексообразования хитозана и белка Bombyx mori при pH и определении структуры и свойств полученных образцов. Исследованы свойства хитозана (Xз) и белка Bombyx mori в растворах и их взаимодействие при различных условиях реакции (концентрации и pH=4,88-6,7). Проведен анализ полученных результатов и определены принципиальные возможности получения комплексов на основе хитозана Bombyx mori и белка. Кондуктометрическое титрование показало, что COO-группы в белковой цепи Bombyx mori составляют 4,95%, и показано, что эти группы электростатически связаны с протонированной аминогруппой (NH₂) хитозана. Образцы комплексов охарактеризованы физико-химическими методами. Методом ИК спектроскопии показано, что полосы поглощения деформационного колебания NH и CN связи (амид II) при 1573 см⁻¹ на 1641 см⁻¹ и NH₂-связи (амид I) при 1517 см⁻¹ на 1538 см⁻¹, а также в области связи CH₂-OH при 1380 см⁻¹ полоса расширяется до 1390 см⁻¹. Полоса поглощения эфирных связей при 1032 см⁻¹ расширяется на 1068 см⁻¹. В целом, обнаруженные изменения и смещения полос поглощений в ИК спектрах подтверждают протекание реакции комплексообразования молекулы хитозана и белка. Теоретическим методом функциональной плотности (DFT) показано, что белок обладает большей способностью реагировать с Xз, высшей занятой молекулярных орбиталей (ВЗМО) Xз и нижней свободной молекулярных орбиталей (НСМО) белка конкурируя с НСМО белка. Исходя из структурных свойств белка и хитозана, может сделать вывод, о наличии возможности на их основе получать биологически активные комплексные препараты.

Ключевые слова: куколки тутового шелкопряда, хитозан, белок, инфракрасные спектры

ERITMADA BOMBYX MORI XITUZANI VA OQSILNING KOMPLEKS SHAKLLANISHI

Oynavod AVAZOVA (avazova1972@mail.ru),
Sayyora RASHIDOVA (polymer@academy.uz)
Polimerlar kimyosi va fizikasi instituti, Toshkent, O'zbekiston

Tadqiqotning maqsadi pH da xitozan va Bombyx mori oqsilining kompleks hosil bo'lishi uchun reaksiya sharoitlarini aniqlash va olingan namunalarning tuzilishi va xususiyatlarini aniqlashdir. Eritmalarda Bombyx mori xitozani (Xz) va oqsilining xossalari o'rganilgan va turli reaksiya sharoitlari (konsentratsiya va pH=4,88-6,7) o'zaro ta'siri tadqiqoti etilgan. Olingan natijalar tahlili o'rganilgan va Bombyx mori xitozanni va oqsili asosida komplekslar olishning fundamental imkoniyatlari aniqlandi. Konduktometrik titrlash shuni ko'rsatdiki, Bombyx mori oqsilining zanjiridagi COO-guruhlar 4,95% ni tashkil qilishi aniqlandi va bu guruhlar xitozanning protonlashgan amino (NH₂) guruhi bilan elektrostatik birikishi ko'rsatilgan. Kompleks shakllangan namunalarda fizik-kimyoviy usullar yordamida xarakterlangan. Kompleks namunalarda deformatsion va valent tebranishlardagi NH va CN bog'lar (amid II) 1573 sm⁻¹ dan 1641 sm⁻¹ gacha, NH₂ -bog'lar (amid I) 1517 sm⁻¹ dan 1538 sm⁻¹ gacha va CH₂-OH bog'lar 1380 sm⁻¹ dan 1390 sm⁻¹ gacha oshganligi, shuningdek, efir bog'larining yutilish sohalari 1032 sm⁻¹ dan 1068 sm⁻¹ gacha kengayganligi IQ spektr usuli yordamida aniqlandi. Oqsil va xitozan zanjirlaridagi orbitalar energiyasi, nazariy funksionallar zichligi usuli yordamida xarakterlangan, xitozanning yuqori band molekulyar orbitali va oqsilning pastki erkin molekulyar orbitali bilan reaksiyaga kirishish qobiliyati yuqori ekanligi ko'rsatilgan. Protein va xitozanning strukturaviy xususiyatlaridan kelib chiqib, ular asosida biologik faol kompleks preparatlar olish imkoniyatlari mavjud.

Kalit so'zlar: ipak qurti gumbagi, xitozan, oqsil, infraqizil spektrlar

DOI: 10.34920/ccc202317

Введение

Использование природных полимеров является важнейшим направлением исследований современной науки и охватывает различные области [1-5].

Извлечение белка и хитозана из

куколок тутового шелкопряда Bombyx mori и формирование их комплексов, а также исследования, направленные на определение особых свойств образцов, относятся к числу актуальных задач, решаемых в области

химии полимеров. Комплексы хитозана и белков позволяют получать препараты с особыми физико-химическими свойствами и биологической активностью. Эти препараты перспективны для использования в качестве корма в животноводстве, рыболовстве и птицеводстве [6].

В основном в литературе проведены исследования по изучению свойств полимолекулярных комплексов хитозана с белками молочной сыворотки. Разработана технология выделения белка из молочной сыворотки с использованием коллоидного раствора хитозана и получения на его основе функционально-активных полимерных комплексов белок – полисахарид [7-9].

В растворе сывороточных белков хитозан связывает β -лактоглобулин и другие белки, образуя при этом нерастворимый комплекс. Показано, что основной вклад в процесс формирования нерастворимого комплекса хитозан-белки вносят силы электростатического взаимодействия. Применение различных форм хитозана: гранулированной, губчатой и его растворов при переработке молочной сыворотки дает возможность выделить из нее до 90% белка. При этом сам хитозан после регенерации может быть вновь использован в реакции [10-12].

Также были изучены комплексы хитозана с метилцеллюлозой, ПВС, желатином. Для получения комплексов хитозана в приготовленные растворы метилцеллюлозы, ПВС, желатина в дистиллированной воде заданной концентрации добавляли при перемешивании раствор хитозана в водном растворе уксусной кислоты, обеспечивая необходимое стехиометрическое соотношение хитозан-метилцеллюлоза, хитозан-ПВС, хитозан-желатин.

В Республике отсутствуют препараты, обладающие питательной хорошей усвояемостью и бактерицидной активностью и которые обладающие эффективным действия на различные патогенные микроорганизмы, а также отсутствуют в литературе о препаратах на основе ХЗ и белка *Bombux mori* и их использование для различных отраслей.

В связи с вышеуказанным, в данной работе представлены результаты экспериментального изучения структурных

изменений белка и хитозана в растворах и исследований получения их комплексов, оценены их структурные особенности а также теоретический анализ.

Цель исследования состоит в выявлении условий реакции комплексообразования хитозана и белка *Bombux mori* при рН и определении структуры и свойств полученных образцов.

Белки представляют собой природные полимеры (биополимеры), обладающие амфифильными и полиамфолитическими свойствами благодаря своей основной структуре и химическим свойствам. Наличие в их молекуле гидрофобных и гидрофильных функциональных групп придает им амфифильные свойства. Наличие в структуре белка алифатических и карбоновых кислот, которые могут выступать в поликатионов и полианионов, придает ему полиамфолитные свойства. Эти свойства позволяют белкам взаимодействовать с молекулами различных свойств (гидрофобными, гидрофильными или положительно и отрицательно заряженными) в зависимости от физико-химических условий.

Известно, что в белке *Bombux mori* содержится до 4,8% NH_2^+ -групп и белок в растворах проявляет полиамфолитные свойства. Определено, что белковая цепь *Bombux mori* содержит 16 аминокислот. Вычислено, что из них 8 представляют собой 1,98 % неполярных аминокислотных остатков, 5-9 % незаряженных, но поляризованных аминокислотных остатков и 3-0,8% заряженных аминокислотных остатков [13].

Хитозан (ХЗ) - деацетилованный продукт хитина, представляет собой полисахарид, состоящий из N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкозамина, связанных β -(1 \rightarrow 4)-связями. ХЗ был тщательно изучен на предмет его потенциала в качестве агента доставки лекарственных соединений. Аминогруппы протонируются в растворах от кислых до нейтральных рН, что делает материалы на основе ХЗ хорошо растворимыми в слабой кислотной среде, обладающих хорошей адгезией, которые легко связываются с отрицательно заряженными группами нуклеосидов, например, такими как слизистые оболочки живых тканей, ДНК, РНК и другие [14].

Методы исследования

В качестве объекта исследования были использованы куколки тутового шелкопряда и выделяемый из него белок и хитозан. Количественные характеристики карбоксильных групп в белке *Bombyx mori* определены по данным кондуктометрического титрования, проведенных на кондуктометре ЕС 215 (HANNA Instruments, Германия). Проведены ИК спектроскопические исследования и определен элементный состав выделенных белков традиционными методами [15].

Результаты и обсуждение

Выбранный в качестве объекта исследования 8,3 % белкового щелочного (NaOH) гидролизата из куколок тутового шелкопряда *Bombyx mori* с характеризуемая плотностью 1025 кг/м³, pH-11.55, оптической плотностью (D) 1,335 и показателем оптической турбидиметрической анизотропии гидролизата (NTU) 2,0.

Карбоксильные группы белка в растворах от pH-4,8 изоэлектрической точки (ИЭТ) до нейтральных pH легко связываются с положительно заряженными группами полисахаридов.

Изменение электропроводности (G_{sm}) контролируется в зависимости от объема (V) добавленного титранта - 0,1 н HCl к растворам образцов, приготовленных в 0,5 н NaOH. На кривых зависимости G_{sm} от V появляются характерные участки титрования, соответствующие определенным группам в полимерной цепи. Проекция характерных отрезков на кривых титрования указывает на диапазон объема титранта DV , затраченного на титрование аминогрупп $-NH_2^+$. Исходя из полученных данных, содержание амина (w_{COOH}) в массе (m) белковых образцов, вычисляли согласно работе [16] по формуле:

$$\omega_{(COOH)} \approx C_n m_{COOH} \Delta V_N / m \quad (1)$$

где C_n - нормальность титранта; m_{COOH} - молекулярная масса карбоксила.

На рисунке 1 приведен график кривых кондуктометрического титрования для образцов белков *Bombyx mori*.

На начальном этапе добавления раствора HCl, электропроводность существенно снижается, это свидетельствует о титровании из-

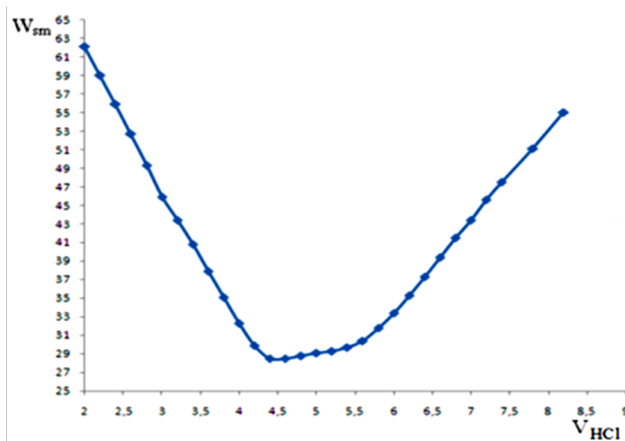


Рисунок 1. Зависимость электропроводности (W_{sm}) от объема (V_{HCl}) титранта 0,1 н HCl, добавленного к 1 % раствору образца белка *Bombyx mori*.

быточного количества NaOH. Дальнейшее титрование раствора в интервале $DV_N = V_{HCl} = 4,4-5,4$ мл характеризуется заметным прямолинейным ростом электропроводности (W_{sm}), что соответствует титрованию карбоксильных групп. Сравнительный резкий рост W_{sm} в области $V_{HCl} > 5,6$ мл свидетельствует об избытке HCl в растворе. Содержание COO^- групп в цепи белка *Bombyx mori* рассчитывали по формуле (1), которое составило 4,95 %.

Растворы для образования комплексов готовим в 2% уксусном растворе хитозана *Bombyx mori* с характеристикой растворимости в 2% уксусной кислоте 90%, pH-3,5 и стабильность раствора хитозана 120 час. Методом вискозиметрии Уббелодде определяли значение характеристической вязкости $\approx 2,6$ дл/г и рассчитывали величину молекулярной массы $M_n \approx 146000$ по уравнению Марка-Куна-Хаувинка [17].

Для выбора оптимальных условий необходимого для образования комплексов на основе белка и хитозана *Bombyx mori*, были проведены влияния как ионогенности в растворах с различной концентрацией и pH среды.

Известно, что получение комплекса зависит от начальной концентрации белковых веществ, поэтому для эффективного процесса выбран 50 мл, 8,3% белкового щелочного гидролизата и 2% хитозана *Bombyx mori* на разбавленных растворах уксусной кислот с характеристики которого проведены в таблице 1.

Основываясь на свойствах белка, выделенного из куколок тутового шелкопряда

Таблица 1

Физико-химические характеристики влияния pH среды на осаждение комплекса

Белковый гидролизат, мл	2% уксусная кислота, мл	2% ХЗ pH-3,94	pH	Выход, г	Азот, %	Сера, %	Зольность, %
50	-	77	4,88	1,88	12,57	5,84	2,04
50	-	40	6,27	1,57	14,37	4,83	2,65
50	-	30	6,7	1,03	15,42	4,07	5,45
50 (контроль)	90	-	4,86	1,18	11,70	4,56	5,62

Bombux mori и ХЗ, мы провели расчеты взаимодействия ХЗ с белком, с образованием комплекса ХЗ и белка. Исследовано взаимодействие хитозана *Bombux mori* и белка при различных pH. Выявлена принципиальная возможность получения комплексов хитозана с белком *Bombux mori*. При pH 4,88-6,7 увеличивается выход на 60% и содержание азота на 14-22%.

Известно, взаимодействие отрицательно заряженной цепочки белка с протонированным ХЗ может происходить в узком диапазоне pH 5,0-7,0. Белок *Bombux mori* имеет изоэлектрическую точку при pH-4,8. [18]. При pH выше 5,0 эти белки будут иметь отрицательный заряд, а до pH 7,0 ХЗ имеет положительный заряд. Это создает возможность ионных взаимодействий [19].

ИК спектроскопия взаимодействующих между молекулами хитозана и белков *Bombux mori* является мощным методом, которая позволяют исследовать механизмы межмолекулярных взаимодействий.

Проведены сравнительные исследования методом ИК спектроскопии, результаты кото-

рых представлены на рисунке 2.

Из приведенного рисунка видно, что на ИК спектре исходного белка *Bombux mori* (1) имеются характерные полосы поглощения для этих соединений. На ИК спектре белка проявляются несколько относительно сильных полос поглощения, которые как правило относятся к колебаниям пептидной группы $-\text{CO}-\text{NH}-$, как общему структурному компоненту белковых молекул. Наблюдается пик при волновых числах 3282 cm^{-1} NH_2 -, $\text{OH}-$, а также пики в области 2919 cm^{-1} , 2851 cm^{-1} и 1744 cm^{-1} , соответствующие валентным колебаниям $\text{CH}-$, CH_2- , COOH групп, соответственно. Наличие двух основных полос поглощения, обусловленных валентными колебаниями NH -связи, пик при 1631 cm^{-1} и плоскостных деформационных колебаний NH_2 -связи – пик при 1537 cm^{-1} характерны для структуры белка.

В целом, обнаруженные изменения и смещения полос поглощений в ИК спектрах подтверждают протекание реакции комплексообразования между молекулами хитозана и белка (2). Показаны ярко выраженные полосы поглощения из-за смещения валентных колеба-

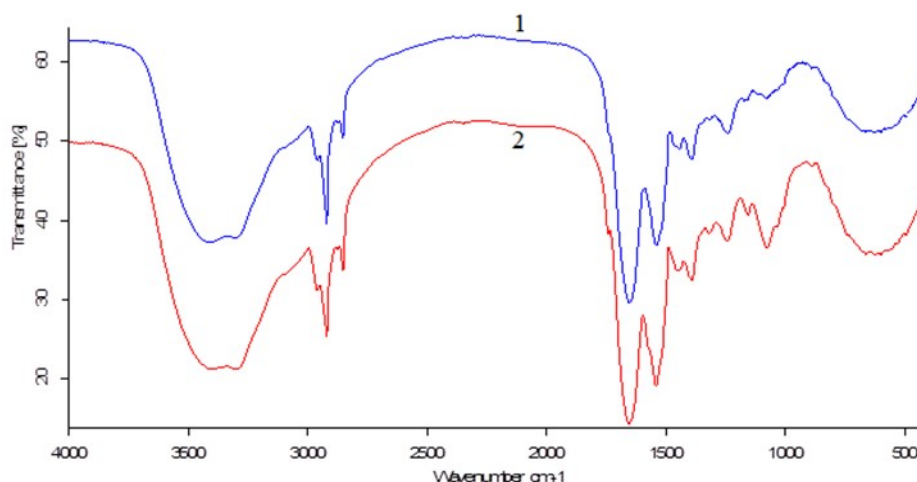


Рисунок 2. ИК спектр: 1 – белок, 2 – комплекс ХЗ и белка.

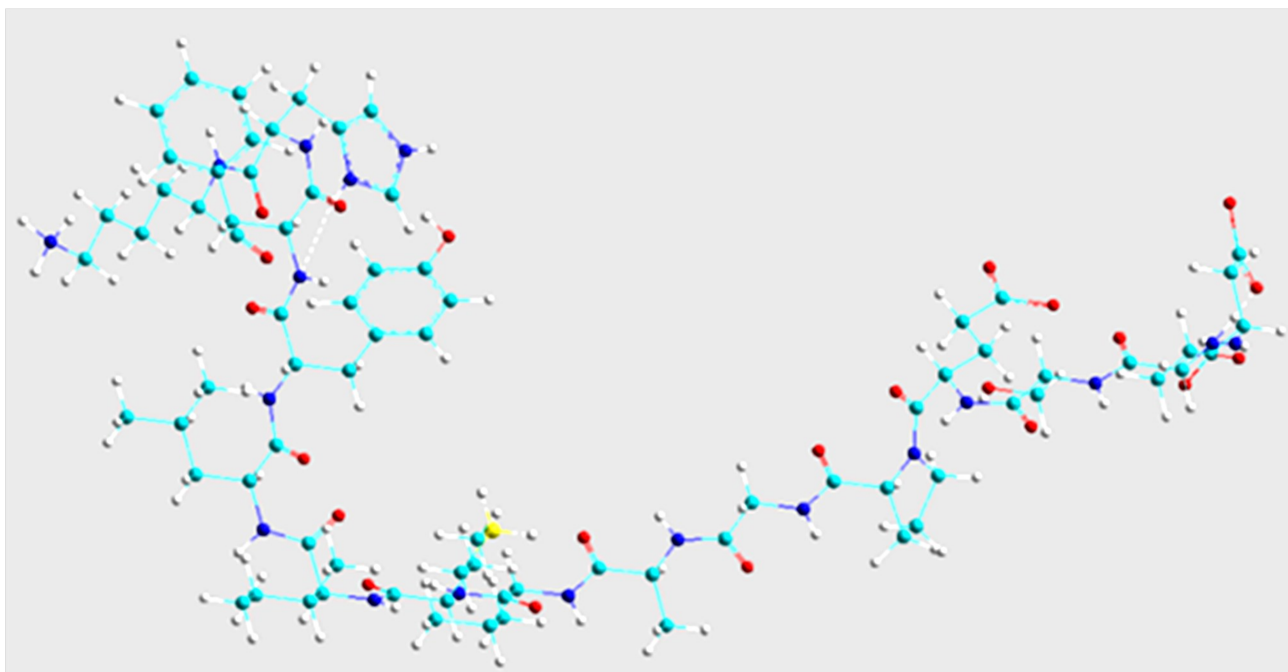


Рисунок 3. Модель белка *Bombyx mori* состоящая из 15 аминокислот.

ний (амид II) NH- белка. Регистрируются полосы поглощения деформационного колебания NH и CN связи (амид II) при 1573 см^{-1} на 68 см^{-1} (1641 см^{-1}) и NH_2 -связи (амид I) при 1517 см^{-1} на 21 см^{-1} (1538 см^{-1}), а также в области связи $\text{CH}_2\text{-OH}$ при 1380 см^{-1} полоса расширяется до 1390 см^{-1} на 10 см^{-1} . Полоса поглощения эфирных связей при 1032 см^{-1} расширяется на 35 см^{-1} (1068 см^{-1}). В целом, обнаруженные изменения и смещения полос поглощений в ИК спектрах подтверждают протекание реакции комплекса молекулы хитозана и белка.

Основываясь на свойствах белка, выделенного из куколки тутового шелкопряда *Bombyx mori* и ХЗ, мы провели расчеты взаимодействия ХЗ с белком, с образованием комплекса ХЗ и белка. Модель белка *Bombyx mori*, состоящая из 15 аминокислот представлена на рисунке 3.

Согласно теореме Клопмана [20], взаимодействие ХЗ происходит путем перекрытия заполненных орбиталей с вакантными орбиталями аминокислотами (АК) и наоборот. Чтобы вступить в реакцию, эти орбитали должны иметь одинаковую симметрию, что облегчает им образование химической связи. Результатом взаимодействия является стабилизация заполненных орбиталей. Чем сильнее взаимодействие, тем ближе по энергии заполненные и незаполненные орбитали. Поэтому весьма вероят-

но, что наиболее важный вклад вносит взаимодействие высшей занятой молекулярных орбиталей (ВЗМО) одного компонента и низшей свободной молекулярных орбиталей (НСМО) другого. Новые орбитали, возникающие в результате этого взаимодействия, можно рассматривать как «орбитали переходного состояния». Ранее квантово-химическими расчетами обоснованы потенциальные активные центры взаимодействия ХЗ [21]. В частности, значительные зарядовые характеристики на атомах азота и кислорода указывают на их хорошую реакционную способность, при этом, атом азота аминокислотной группы является наиболее вероятными центрами электрофильной атаки. Кроме того, анализ энергий граничных орбиталей ВЗМО и НСМО (ЕВЗМО - ЕНСМО) показывает, что для протонированной цепочки ХЗ характерны орбитально-контролируемые процессы, а отрицательный знак энергии НСМО позволяет охарактеризовать его как электрофильный реагент, поэтому для него наиболее характерны процессы принятия «чужих» электронов на самые низкие вакантные (свободные) орбитали.

Моделирование электронных характеристик показало результат химического взаимодействия протонированного ХЗ (10 мономерных звеньев) с белком *Bombyx mori*.

На рисунке 4. показано исследование реакционной способности и химической ста-

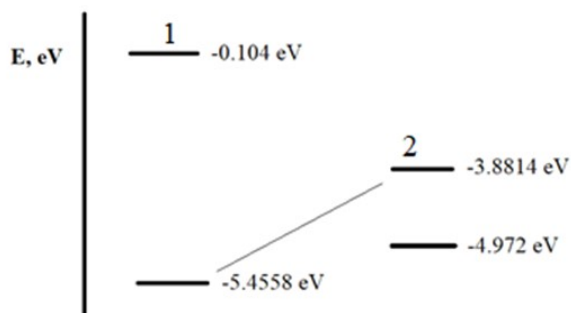


Рисунок 4. Взаимодействия граничных орбиталей цепочки протонированного (1) -ХЗ с (2)- белком *Bombyx mori*.

бильности двух соединений с точки зрения квантового анализа. Квантовое моделирование показало, что белок обладает большей способностью реагировать с ХЗ, ВЗМО ХЗ и НСМО белка конкурируя с НСМО белка. Белок *Bombyx mori* является жизнеспособным вариантом для взаимодействия с ХЗ.

Заключение

Таким образом, анализ полученных данных по взаимодействию хитозана (ХЗ) и белка *Bombyx mori* при различных условиях реакции, выявлена принципиальная возможность получения комплексов ХЗ с белком *Bombyx mori*. Кондуктометрическое титрование показало, что содержание СОО- групп в цепи белка *Bombyx mori* составляют 4,95%. Образование комплекса подтверждено результатами физико-химических методов. Теоретическим методом DFT показано, что белок обладает большей способностью реагировать с ХЗ, ВЗМО ХЗ и НСМО белка конкурируя с НСМО белка. Исходя из структурных свойств белка и хитозана, может сделать вывод, что возможно на их основе получать биологически активные комплексные препараты.

REFERENCES

- Kurukji D., Norton I. Fabrication of sub-micron protein-chitosan electrostatic complexes forencapsulation and pH-Modulated delivery of model hydrophilic activecompounds. *Food Hydrocolloids*, 2015, 84, 1-12. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.02.021
- Del Valle L. J., Díaz A., Puiggali J. Hydrogels for Biomedical Applications: Cellulose, Chitosan, and Protein/Peptide Derivatives. *Gels*, 2017, 3/3. DOI: 10.3390/gels3030027
- Amidi M., Romeijn S.G., Borchard G., Junginger H.E., Hennink W.E., Jiskoot W. Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. *J. Control Release*, 2006, 111/1-2, 107-116. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.11.014
- Bekale L., Agudelo D., Tajmir-Riahi H.A. Effect of polymer molecular weight on chitosan-protein interaction. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 125, 309-317. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.11.037
- Yajima H., Morita M., Hashimoto M., Sashiwa H., Kikuchi T., Ishii T. Complex Formation of Chitosan with Iodine and Its Structure and Spectroscopic Properties--Molecular Assembly and Thermal Hysteresis Behavior. *International Journal of Thermophysics*, 2001, 22/4, 1265-1283. DOI: 10.1023/A:1010628712529
- Avazova O.B., Milusheva R.Yu., Rashidova S.Sh. [Polyelectrolyte complexes based on protein and chitosan Boombx mori] XIV *Mezhunarodnyy simpozium po khimii prirodnnykh soyedineniy* [International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds]. Tashkent 2021, 141-142.
- Kablov V.F., Ioshchenko Yu.P. Ispol'zovaniye khitozana v kachestve flokulyanta v protsessakh ekstraktsii belka iz molochnoy syvorotki [The use of chitosan as a flocculant in the processes of protein extraction from whey]. *Uspekhi sovremennoyo yestestvoznaniya*, 2005, 7, 59-60.
- Bakulin A.V., Gavrilenko N.V., Chervyakovskiy Ye.M., Kurchenko V.P., Varlamov V.P. Ispol'zovaniye khitozana dlya vydeleniya R-laktoglobulina iz smesi belkov molochnoy syvorotki [The use of chitosan for the isolation of P-lactoglobulin from a mixture of whey proteins]. *Biotehnologiya*, 2011, 1, 34-41.
- Bakulin A.V., Gavrilenko N.V., Chervyakovskiy Ye.M., Kurchenko V.P., Varlamov V.P. Ispol'zovaniye khitozana rakoobraznykh v tekhnologii pererabotki molochnoy cyvorotki [Use of crustacean chitosan in whey processing technology]. *Rybprom.*, 2010, 4, 64-67.
- Butkevich T.V., Ivanov A.A., Kurchenko V. P. Polucheniye i issledovaniye polimolekulyarnykh kompleksov khitozana s belkami i gidroksilsoderzhashchimi polimerami [Preparation and study of polymolecular complexes of chitosan with proteins and hydroxyl-containing polymers]. *Izvestiya Samarskogo Nauchnogo Tsentra RAN*, 2013, 15/3, 1575-1578.
- Ioshchenko YU.P. *Polucheniye i issledovaniye polimolekulyarnykh kompleksov khitozana s belkami i gidroksilsoderzhashchimi polimerami. Avtoref. dis. kand. tekhn. nauk* [Preparation and study of polymolecular complexes of chitosan with proteins and hydroxyl-containing polymers. Abstract PhD diss.]. Volgograd, 2006. 21.
- Kablov V.F., Zaikov G.Ye., Abzal'dinov Kh.S. Polucheniye i issledovaniye polimernykh kompleksov khitozana s belkami i gidroksilsoderzhashchimi polimerami [Preparation and study of polymer complexes of chitosan with proteins and hydroxyl-containing polymers]. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*, 2012, 106-113
- Avazova O.B., Milusheva R.Yu., Rashidova S.Sh. Povedeniye belka Bombyx mori v rastvorakh i yego strukturnyye issledovaniya [The Behavior of the Bombyx mori Protein in Solutions and Structural Studies]. *Doklady Akademii nauk Respubliki O'zbekistan*, 2021, 4, 39-42.
- Avazova O.B., Milusheva R.Yu., Nurgaliev I.N., Rashidova S.Sh. Polimolekulyarnyye komplekсы belka s khitozanom Bombyx mori. [Polymolecular complexes of chitosan with the Bombyx mori protein]. *Bulletin of the University of Karganda – Chemistry*, 2022, 107/3, 87-101.
- Babayan E.A. *Spektrofotometricheskyy metod opredeleniya belka* [Spectrophotometric method for protein determination]. Moscow, Meditsina Publ., 1989. 33.
- Evstratova K.I. *Praktikum po fizicheskoy i kolloidnoy khimii* [Workshop on physical and colloidal chemistry]. Moscow, Vyssh. shk. Publ., 1990. 225.
- Bartenev G.M., Frenkel S.Ya. *Fizika polimerov* [Physics of polymers]. Leningrad, Khimiya Publ., 1990. 432.
- Avazova O.B., Milusheva R.Yu., Rashidova S.Sh. Vydeleniye belka Bombyx mori iz otkhodov proizvodstva shelka [Isolation of Bombyx mori protein from silk waste]. *Vestnik Tverskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya, Tver'*, 2016, 1, 60-66.
- Evdokimov I.A., Alieva L.R., Varlamov V.P., Kurchenko. V.P. Usage of chitosan in dairy products production. *Foods and Raw Materials*, 2015, 3/2, 29–39. DOI: 10.12737/13117.
- Klopman G. Chemical reactivity and the concept of charge- and frontier-controlled reactions. *Journal of the American Chemical Society*, 1968, 90/2, 223–234. DOI: 10.1021/ja01004a002
- Cvetkov V.N., *Zhestkotsepnyye polimernyye molekuly* [Rigid-chain polymer molecu]. Leningrad, Nauka Publ., 1986. 380.