УДК 544.558;544.528

Хтет Ко Ко Зау, Зау Йе Мьинт, Т. М. Васильева

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Пучково-плазменные технологии получения хитоолигосахаридов с фитостимулирующими свойствами

Экспериментально исследована возможность получения хитоолигосахаридов с помощью электронно-пучковой плазмы (ЭПП) и подтверждение их фитостимулирующей активности. В этом случае наблюдается пороговый характер зависимости, связывающей степень деструкции полимера с длительностью пучково-плазменного воздействия, что позволяет оптимизировать процесс обработки и исключить непроизводительные энергозатраты. Низкомолекулярные водорастворимые продукты ЭПП-деструкции хитозана обладают свойствами стимуляторов роста растений.

Ключевые слова: электронно-пучковая плазма кислорода, хитин и хитозан, хитоолигосахарид, фитостимулирующая активность, деструкция биополимеров, активная форма кислорода.

Htet Ko Ko Zaw, Zaw Ye Myint, T. M. Vasilyeva

Moscow Institute of Physics and Technology

Beam plasma technologies for producing chitooligosaccharides with phytostimulation properties

A possibility to obtain chitooligosaccharides using electron-beam plasma (EBP) and confirming their phytostimulating activity is experimentally investigated. In this case, we observe the threshold dependence that connects the degree of degradation of the polymer with the duration of the beam plasma action, which allows one to optimize processing and eliminate the unproductive energy consumption. Low molecular water soluble products of chitosan EBP destruction have the properties of plant growth stimulants.

Key words: electron beam plasma of oxygen, chitin and chitosan, chitooligosaccharide, phytostimulating activity, destruction of biopolymers, active form of oxygen.

1. Введение

В настоящее время резко возросла востребованность природного полимера – хитина и его деацетилированного производного хитозана. Это связано с широким распространением этих полимеров в природе и возобновляемостью их сырьевых источников. Кроме того, эти биополимеры обладают уникальным комплексом свойств: низкой токсичностью, высокой комплексообразующей активностью, хорошей совместимостью с тканями организма, способностью к биодеградации и др. [1, 2, 3]. Среди областей, где применяются биополимеры, можно назвать биотехнологию, медицину, косметическую промышленность и сельское хозяйство.

Известно, что хитоолигосахариды, молекулярный вес которых не превышает 10 кДа, эффективно стимулируют рост и плодоношение растений, индуцируют их собственные биохимические механизмы защиты, повышая устойчивость к различными патогенным

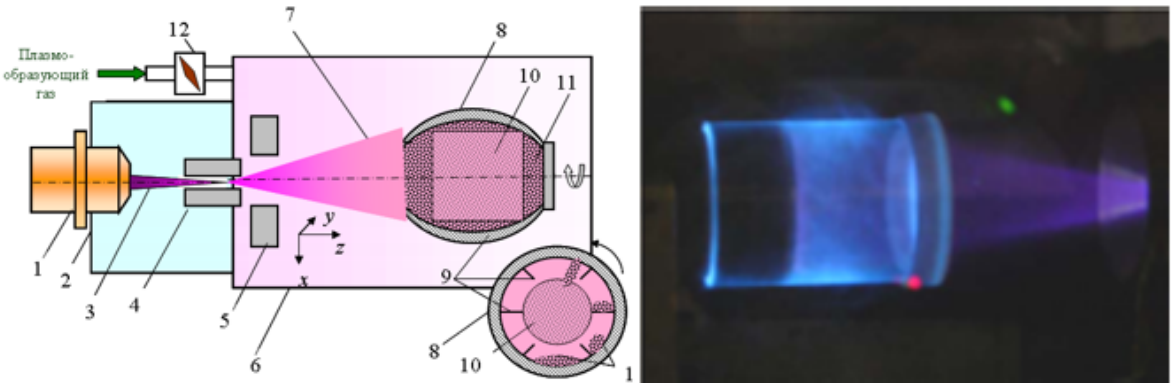
© Хтет Ко Ко Зау, Зай Йе Мьинт, Васильева Т. М., 2019
© Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (научный исследовательский университет)», 2019

микроорганизмам, болезням и неблагоприятным факторам окружающей среды [4–6]. Перечисленные свойства делают низкомолекулярные хитозаны чрезвычайно перспективными агентами для разработки экологически чистых технологий возделывания сельскохозяйственных культур.

Целью работы была разработка метода получения хитоолигосахаридов с помощью электронно-пучковой плазмы (ЭПП) и подтверждение их фитостимулирующей активности.

2. Принцип предлагаемого метода и экспериментальная установка

В настоящей работе для обработки хитозана использовалась ЭПП, которая генерируется при инжекции электронного пучка в плотные газообразные среды [7–9]. Получаемая ЭПП сильно неравновесна: в ее составе присутствуют молекулы, атомы, радикалы и ионы в основном и в возбужденном состояниях, а также электроны плазмы и электроны инжектируемого пучка. Концентрации тяжелых частиц плазмы существенно превышают их равновесные значения, что и определяет высокую химическую активность ЭПП. Экспериментально доказано, что температуру в процессе модификации материалов удается поддерживать на уровне 300–400 K без потери высокой химической активности ЭПП, что позволяет работать с термолабильными соединениями, в том числе и с полисахаридами. Деструкция хитозана проводилась в электронно-пучковом плазмохимическом реакторе, устройство и принцип действия которого представлены в [7]. Рис. 1а иллюстрирует процесс ЭПП-обработки порошков биополимеров. Сформированный в высоком вакууме ($\sim 10^5$ Торр) электронный пучок (ЭП) (3) инжектировался в заполненную плазмообразующей средой реакционную камеру (6) через газодинамическое выводное окно (4), при этом формировалось облако химически активной ЭПП (7). ЭП сканировали в круглый растр с помощью электромагнитной системы (5), что повышало равномерность обработки материала (10). С целью увеличения массы обрабатываемого порошка были разработаны специальные дополнительные устройства, в реакционном объеме которых организовано перемешивание значительного количества порошка в процессе обработки. Барабан устанавливали в реакционной камере так, что его ось совпадала с осью инжекции ЭП. Расстояние от выводного окна до барабана выбирали так, чтобы облако ЭПП было локализовано преимущественно внутри барабана (рис. 1б).



а) б)

Рис. 1. Схема плазмохимического реактора (а) и процедура ЭПП-стимулированной деструкции порошков полисахаридов (б): 1 – электронная пушка; 2 – высоковакуумная камера; 3 – электронный пучок; 4 – выводное устройство; 5 – электромагнитная отклоняющая система; 6 – рабочая камера; 7 – облако ЭПП; 8 – кварцевая труба; 9 – внутренние ребра; 10 – реакционная зона; 11 – порошок обрабатываемого полисахарида; 12 – регулируемый натекатель

В экспериментах в качестве плазмообразующего газа использовался кислород при давлении 5–10 Торр. В качестве исходного сырья использовали порошок хитозана

($M_v = 500$кДа) со степенью дезацетилирования 85% и полидисперсностью 2,5. Температура порошка хитозана в процессе ЭПП-обработки измерялась оптическим пирометром Optris LS (Optris GmbH, Германия) и составляла 40 °C. Сила тока пучка Ib подбиралась таким образом, чтобы поддерживать постоянным указанное значение температуры и варьировалась в пределах $1 < \text{Ib} < 100$ мА. Энергия электронов на входе в реакционную камеру была постоянной и составляла 30 кэВ. Время ЭПП-деструкции варьировали в пределах 2–10 мин.

3. Результаты

В результате ЭПП-деструкции хитозана формировались низкомолекулярные хитоолигосахариды, молекулярная масса которых по данным гельпроникающей ВЭЖХ варьировалась в пределах 570–815 кДа. Таким образом, значения молекулярных масс продуктов деструкции соответствовали набору олигомеров хитозана от димера до гептамера. При этом формирование низкомолекулярных продуктов происходило в течение первых двух минут плазмохимического воздействия. Вероятно, что формирование хитоолигосахаридов связано с действием активных частиц плазмы (особенно активных форм кислорода) на $\beta - 1,4$ гликозидные связи природного биополимера. Возможный механизм деструкции приведен на рисунке 2.

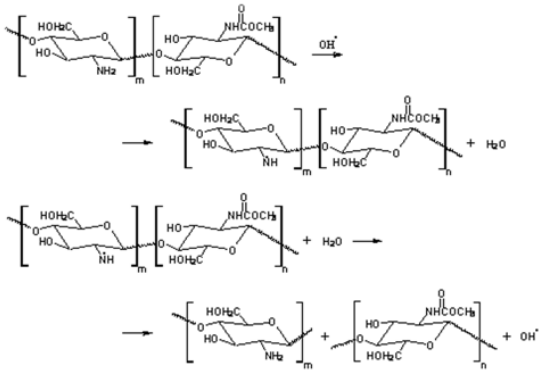


Рис. 2. Схема плазмохимической деструкции хитозана [10]

Степень деацетилирования полученных хитоолигосахаридов определялась с помощью 1H ЯМР и составляла около 93%. Вторым возможным сайтом радикального действия OH является хитиновая N-ацетильная группа. Это преобразование было обнаружено как для производных аминокислот, таких как N-ацетилметионин [11], так и для гликозааминогликанов (например, гиалуронан) [12, 13] под действием кислородсодержащих радикалов и некоторых других активных форм кислорода.

Механизм, представленный на рис. 3, предполагает образование углерод-центрированных радикалов C-4 и последующую реакцию расщепления этих радикалов, приводящую к разрыву $\beta - 1,4$ гликозидных связей.

Биологические испытания выполняли на модельном растении Arabidopsis thaliana, семена которого в процессе культивирования обрабатывали 0,025% и 0,1% растворами ЭПП-полученных хитоолигосахаридов в дистиллированной воде. Исследованные растворы обладали фитостимулирующим действием и ускоряли развитие корневой системы растений: длина корней Arabidopsis thaliana, обработанных 0,1% раствором хитоолигосахаридов, полученных при ЭПП-деструкции хитозана в течение 2 мин, увеличивалась на $\sim 35\%$ по сравнению с контрольной группой растений (рис. 4).

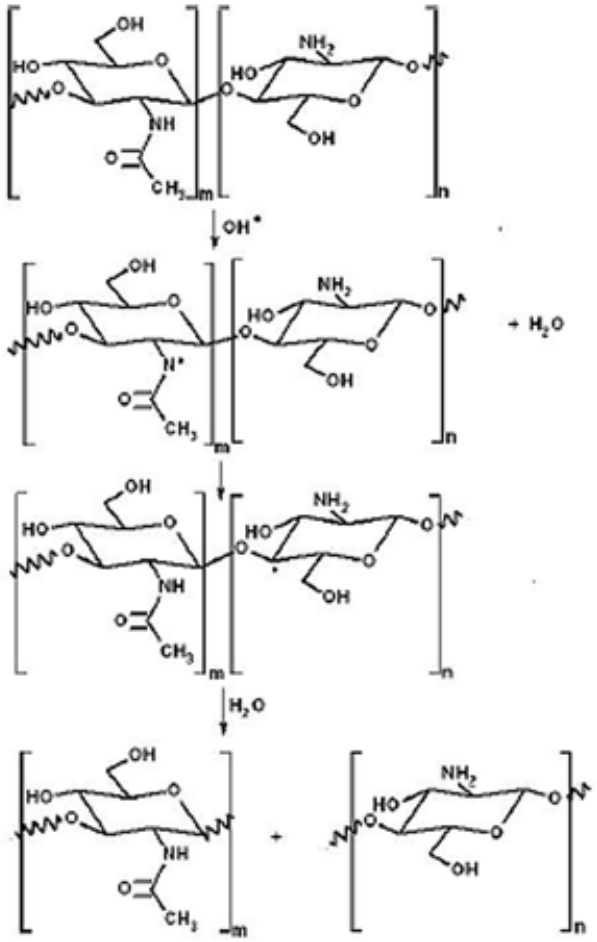


Рис. 3. Схема деградации хитина под действием гидроксильных радикалов в ЭПП: нападение радикалов ОН на группы хитин $-NH_2$

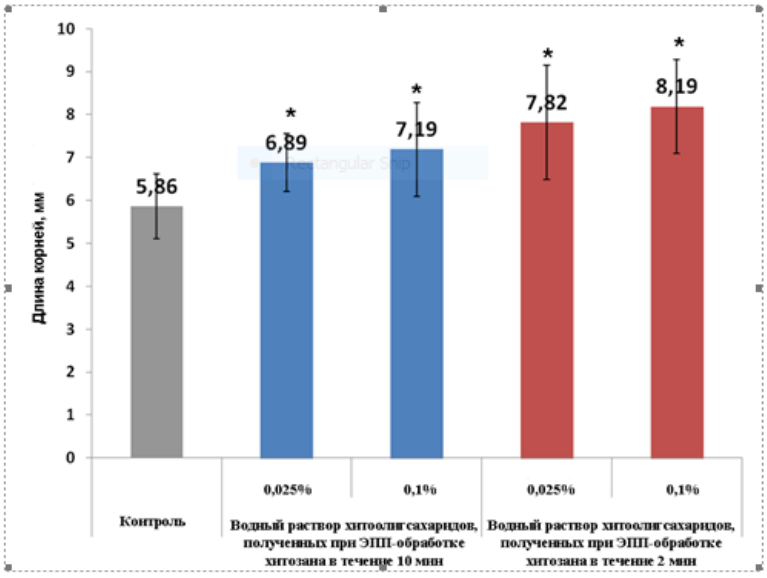


Рис. 4. Стимулирование роста корневой системы растений 0,025% и 0,1% водными растворами хитоолигосахаридов, полученных с помощью ЭПП-деструкции хитозана в течение 2 и 10 мин, * – результаты достоверны по отношению к контролю ($p<0,05$)

4. Заключение

Экспериментально доказана возможность получения низкомолекулярных водорастворимых олигосахаридов в ЭПП кислорода газов. При этом наблюдается пороговый характер зависимости, связывающей степень деструкции полимера с длительностью пучково-плазменного воздействия, что позволяет оптимизировать процесс обработки и исключить непроизводительные энергозатраты. Показано, что низкомолекулярные водорастворимые продукты ЭПП-деструкции хитозана обладают свойствами стимуляторов роста растений.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки, проект № 10А.100.

Литература

1. *Zargar V., Asghari M., Dashti A.* A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications // Chem. Bio Eng. Reviews. 2015. V. 2, N 3. P. 204–226.
2. *Biederman H.* Plasma polymers and some biomedical applications // European Cells and Materials. 2003. V. 6, suppl. 1. P. 28.
3. *Демина Т.С.,Гильман А.Б., Акопова Т.А., Зеленецкий А.Н.* Модифицирование структуры и свойств хитозана с использованием методов химии высоких энергий // Химия высоких энергий. 2014. Т. 48, № 5. С. 339–349.
4. *Sharp R.G.* A review of the applications of chitin and its derivatives in agriculture to modify plant-microbial interactions and improve crop yields // Agronomy. 2013. V. 3, N 4. P. 757–793.
5. *Katiyar D., Hemantaranjan A., Singh B., Bhanu A.N.* A future perspective in crop protection: chitosan and its oligosaccharides // Adv. Plants Agric. Res. 2014. V. 1, N 1. P. 00006.
6. *Katiyar D., Hemantaranjan A., Singh B.* Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review // Ind. J. Plant Physiol. 2014. V. 20, N 1. P. 1–9.
7. *Васильева Т.М., Лопатин С.А., Варламов В.А.* Получение низкомолекулярных форм хитина и хитозана в электронно-пучковой плазме // Химия высоких энергий. 2016. Т. 50, № 2. С. 155–159.
8. *Vasilieva T.,Lopatin S., Varlamov V., Aung Tun Win.* Controllable degradation of polysaccharides stimulated by electron-beam plasma // 22nd International Symposium on Plasma Chemistry. 2015. P. II–11-11.
9. *Vasilieva T.* A beam-plasma source for protein modification technology // IEEE Transactions on Plasma Sciences. 2010. V. 38, N 8. C. 1903–1907.
10. *Chang K.L., Tai M.C., Cheng F.H.* Kinetics and products of the degradation of chitosan by hydrogen peroxide // J. Agric. Food Chem. 2001. — V. 49. —C. 4845–4851.
11. *Mishra B., Priyadarsini K.I., Mohan H.* Pulse radiolysis studies on reaction of OH radical with N-acetyl methionine in aqueous solution // Res. Chem. Intermed. 2005. V. 31. P. 625–632.
12. *Reeds M.D., Hawkins C.L., Davies M.J.* Hypochlorite and superoxide radicals can act synergistically to induce fragmentation of hyaluronan and chondroitin sulphates // Biochem. J. 2004. V. 381. P. 175–184.
13. *Stern R., Kogan G., Jedrzejas M.J., Soltes L.* The many ways to cleave hyaluronan // Biotechnol. Adv. 2007. V. 25. P. 537–557.

References

1. *Zargar V., Asghari M., Dashti A.* A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. Chem. Bio Eng. Reviews. 2015. V. 2, N 3. P. 204–226.
2. *Biederman H.* Plasma polymers and some biomedical applications. European Cells and Materials. 2003. V. 6, suppl. 1. P. 28.
3. *Demina T.C., Gilman A.B., Akopova T.A., Zelenetsky A.H.* Modification of chitosan structure and properties using high-energy chemistry methods. High energy chemistry. 2014. V. 48, N 5. P. 339–349.
4. *Sharp R.G.* A review of the applications of chitin and its derivatives in agriculture to modify plant-microbial interactions and improve crop yields. Agronomy. 2013. V. 3, N 4. P. 757–793.
5. *Katiyar D., Hemantaranjan A., Singh B., Bhanu A.N.* A future perspective in crop protection: chitosan and its oligosaccharides. Adv. Plants Agric. Res. 2014. V. 1, N 1. P. 00006.
6. *Katiyar D., Hemantaranjan A., Singh B.* Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. Ind. J. Plant Physiol. 2014. V. 20, N 1. P. 1–9.
7. *Vasilieva T.M., Lopatin S.A., Varlamov V.A.* Production of low molecular weight forms of chitin and chitosan in an electron-beam plasma. High energy chemistry. 2016. V. 50, N 2. P. 155–159.
8. *Vasilieva T., Lopatin S., Varlamov V., Aung Tun Win.* Controllable degradation of polysaccharides stimulated by electron-beam plasma. 22nd International Symposium on Plasma Chemistry. 2015. P. II–11-11.
9. *Vasilieva T.* A beam-plasma source for protein modification technology. IEEE Transactions on Plasma Sciences. 2010. V. 38, N 8. P. 1903–1907.
10. *Chang K.L., Tai M.C., Cheng F.H.* Kinetics and products of the degradation of chitosan by hydrogen peroxide. J. Agric. Food Chem. 2001. V. 49. P. 4845–4851.
11. *Mishra B., Priyadarsini K.I., Mohan H.* Pulse radiolysis studies on reaction of OH radical with N-acetyl methionine in aqueous solution. Res. Chem. Intermed. 2005. V. 31. P. 625–632.
12. *Reeds M.D., Hawkins C.L., Davies M.J.* Hypochlorite and superoxide radicals can act synergistically to induce fragmentation of hyaluronan and chondroitin sulphates. Biochem. J. 2004. V. 381. P. 175–184.
13. *Stern R., Kogan G., Jedrzejas M.J., Soltes L.* The many ways to cleave hyaluronan. Biotechnol. Adv. 2007. V. 25. P. 537–557.

Поступила в редакцию 21.01.2019