

## ФАЗОВОЕ СОСТОЯНИЕ ВОДНЫХ СМЕСЕЙ РЫБНЫЙ ЖЕЛАТИН–АГАР

Н. Г. Воронько<sup>1, \*</sup>, Т. Д. Кузина<sup>1</sup>, Д. С. Колотова<sup>1</sup>, Ю. А. Кучина<sup>1</sup>, Ю. Ф. Зуев<sup>2</sup>,  
С. Р. Деркач<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Мурманский арктический университет,  
ул. Спортивная, 13, Мурманск, 183010 Россия

<sup>2</sup>Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН,  
ул. Лобачевского, 2/31, Казань, 420111 Россия

\*e-mail: voronkong@mauniver.ru

**Аннотация.** Методами спектроскопии (ИК Фурье, УФ), турбидиметрии, квазиупругого лазерного светорассеяния и сканирующей электронной микроскопии исследовано взаимодействие рыбного желатина и агара в объеме водной фазы с образованием супрамолекулярных белок–полисахаридных комплексов. Рассмотрено влияние строения желатина (содержание аминокислотных остатков), массового соотношения агар/рыбный желатин  $Z$  и среды (рН, ионная сила  $I$ ) на границы областей формирования стехиометрических и нестехиометрических комплексов, размер и  $\zeta$ -потенциал частиц и, следовательно, фазовое состояние водных смесей (коллоидных растворов) биополимеров. Построены фазовые диаграммы водных смесей агара и рыбного желатина в координатах  $Z$  – характеристические рН, а также  $I$  – характеристические рН. Определены области с различным фазовым состоянием систем: однофазный раствор не связанных в комплекс биополимеров, дисперсия комплексов рыбный желатин–агар, область начала выделения из дисперсии коацерватов, область полного разделения коацерватной фазы и супернатанта. Показано, что формирование комплексов рыбный желатин–агар оказывает воздействие на микроструктуру гелей, образованных при охлаждении водных смесей биополимеров.

**Ключевые слова:** рыбный желатин, агар, фазовое состояние, супрамолекулярные комплексы, коацерваты

**Финансирование работы.** Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 23-64-10020 на базе Научно-исследовательской лаборатории химии и технологии морских биоресурсов (Мурманский арктический университет), созданной при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (ФЭНР-2024-0001, соглашение № 075-03-2024-024/1 от 15.02.24).

**Соблюдение этических стандартов.** В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

**Конфликт интересов.** Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Поступила в редакцию 18.04.2025

После доработки 28.05.2025

Принята к публикации 05.06.2025



## PHASE BEHAVIOR OF FISH GELATIN–AGAR AQUEOUS MIXTURES

N. G. Voron'ko<sup>1,\*</sup>, T. D. Kuzina<sup>1</sup>, D. S. Kolotova<sup>1</sup>, Yu. A. Kuchina<sup>1</sup>, Yu. F. Zuev<sup>2</sup>,  
S. R. Derkach<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Murmansk Arctic University, Murmansk, 183010 Russia

<sup>2</sup>Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center “Kazan Scientific Center”,  
Russian Academy of Sciences, Kazan, 420111 Russia

\*e-mail: voronkong@mauniver.ru

**Abstract.** The interaction of fish gelatin and agar in the bulk of the aqueous phase with the formation of supramolecular protein–polysaccharide complexes was studied using spectroscopy (IR Fourier, UV), turbidimetry, quasi-elastic laser light scattering and scanning electron microscopy. The influence of the structure of gelatin (content of amino acid residues), the agar/fish gelatin w/w ratio  $Z$  and the medium (pH, ionic strength  $I$ ) on the boundaries of the regions of stoichiometric and non-stoichiometric complexes formation, the size and  $\zeta$ -potential of particles and, consequently, the phase behavior of the aqueous mixture (*i.e.*, colloidal solution) of biopolymers was considered. Phase diagrams of aqueous mixtures of fish gelatin and agar were constructed in the coordinates  $Z$  – characteristic pH, as well as  $I$  – characteristic pH. The regions of different phase behavior of the systems are determined, such as a single-phase solution of non-complexed biopolymers, a dispersion of fish gelatin–agar complexes, the region of the beginning of the separation of coacervates from the dispersion, and the region of complete separation of the coacervate phase and supernatant. It is shown that the formation of fish gelatin–agar complexes affects the microstructure of gels formed during cooling of aqueous mixtures of biopolymers.

**Keywords:** fish gelatin, agar, phase behavior, supramolecular complexes, coacervates

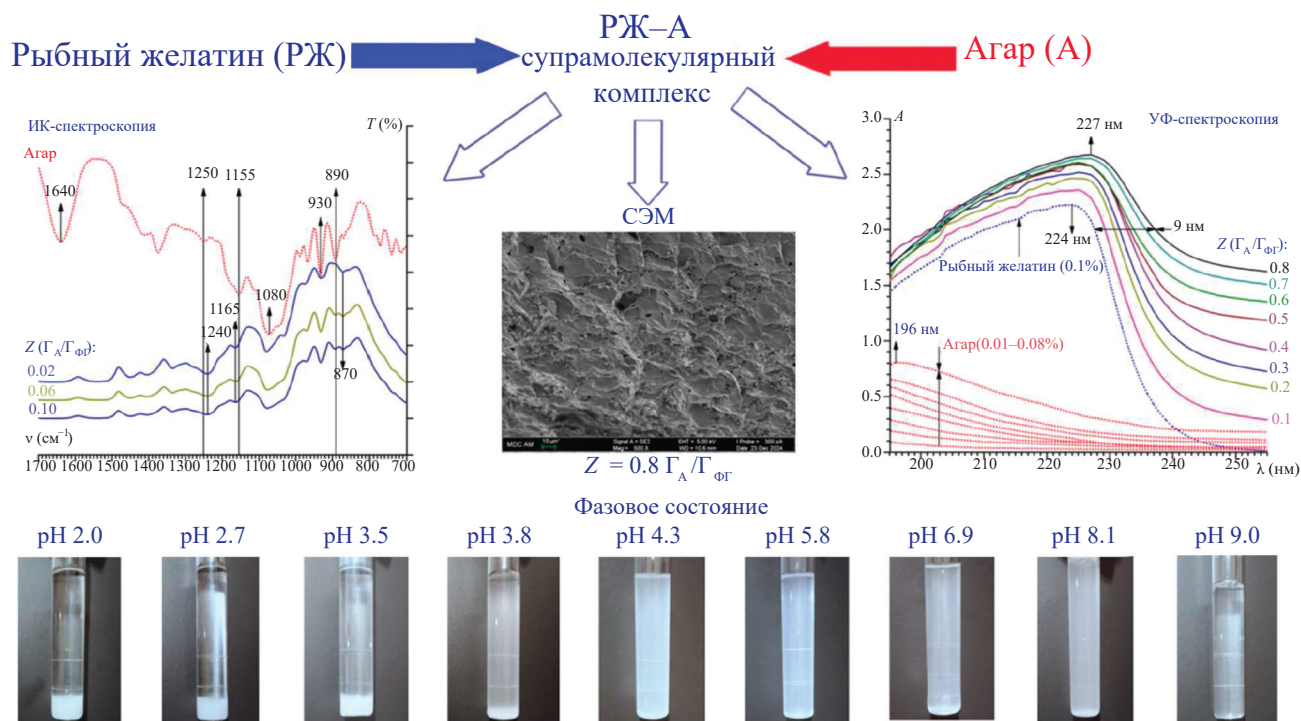
**Funding.** The work was supported by the Russian Science Foundation, project no. 23-64-10020 and performed on the base of the Research Laboratory of Chemistry and Technology of Marine Bioresources (Murmansk Arctic University), which was created with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (FENR-2024-0001, agreement no. 075-03-2024-024/1 of February 15, 2024).

**Ethics declarations.** This work does not contain any studies involving human and animal subjects.

**Conflict of interests.** The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

Received April 18, 2025  
Revised May 28, 2025  
Accepted June 05, 2025





## ВВЕДЕНИЕ

В начале XXI в. коллоидно-химический подход занял место ведущего направления в описании свойств супрамолекулярных систем [1, 2]. Успешное применение этого подхода продемонстрировано, в частности, на примере комплексов полисахарид–полисахарид [3] и белок–полисахарид [4–7]. Как известно, супрамолекулярные комплексы биополимеров являются ассоциатами не менее двух макромолекул, удерживаемых вместе за счет межмолекулярных (нековалентных) сил: электростатических и гидрофобных взаимодействий, водородных связей, стерических факторов [8–11]. В последние годы процесс формирования и коллоидно-химические свойства комплексов белок–полисахарид в водной фазе вызывает не только фундаментальный [12–15], но и большой практический интерес, в частности в области пищевых технологий [16–20].

За прошедшую декаду опубликовано множество оригинальных работ, описывающих влияние на фазовое состояние водных смесей (т.е. коллоидных растворов) белка и полисахарида таких факторов, как: массовое соотношение биополимеров [21–24], pH [5, 14, 21] и ионная сила [5, 23, 25]. Эти факторы оказывают огромное влияние на межмолекулярные взаимодействия, прежде всего на электростатические, которые при комнатной температуре являются определяющими в формировании супрамолекулярных комплексов между двумя биополимерами, несущими противоположные заряды [11, 25, 26]. Электростатические взаимодействия влияют на размер и  $\zeta$ -потенциал частиц в объеме водной фазы,

соответственно они определяют общий вид фазовых диаграмм водных смесей белок–полисахарид [13, 14]. В зависимости от массового соотношения полисахарид/белок, pH и ионной силы на фазовых диаграммах выделяют области, в которых белок–полисахаридные комплексы не формируются; области, в которых формируются растворимые или нерастворимые комплексы; и области, в которых выпадает коацерватная фаза [5, 14]. Следовательно, большая практическая польза фазовых диаграмм заключается в возможности определения условий получения водной смеси белка с полисахаридом в том или ином фазовом состоянии. Это особенно важно с точки зрения целевого применения водных смесей биополимеров в различных прикладных направлениях [8, 9].

Одной из хорошо известных и исследованных белок–полисахаридных водных смесей является система желатин–агар [27, 28]. Несмотря на то, что пионерское исследование смеси желатина с агаром было проведено еще в конце XIX в. (Beijerinck, 1896), изучение этой системы актуально до сих пор, что иллюстрируется множеством научных работ (главным образом прикладной направленности), опубликованных за последние 4 года. Так, показана перспективность применения смесей желатина с агаром в качестве стабилизатора эмульсий Пикеринга в многофазных пищевых системах [29, 30]. Рассмотрен способ получения стабильных желатин–агаровых пленок, сформированных за счет нековалентных взаимодействий [31]. Обоснована замена в индустрии пищевых упаковочных материалов



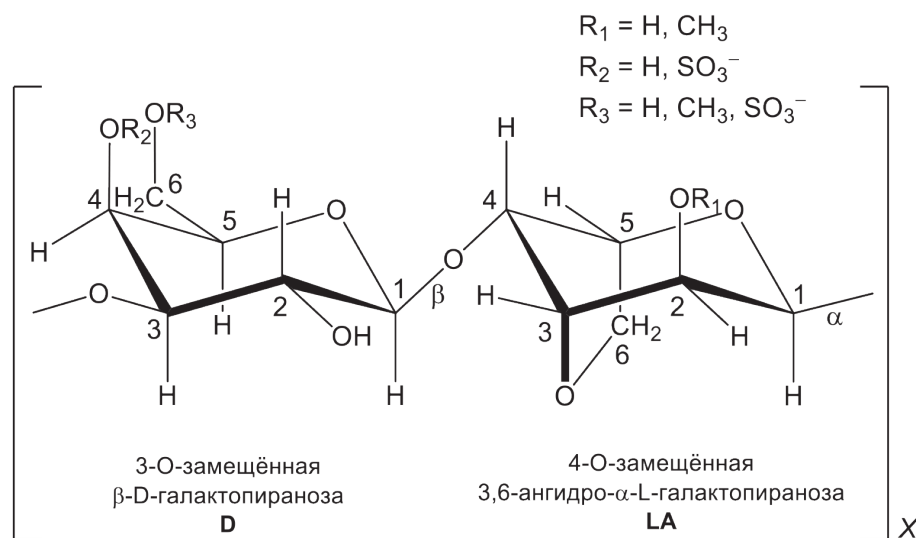
синтетического пластика из нефтепродуктов желатин–агаровым биопластиком в [32, 33]. Предлагается осуществить внедрение подобных пленок на основе комплексов желатина с другими сульфатированными полисахаридами – каррагинанами – в технологию пищевой упаковки [34]. Пленки-индикаторы на основе желатин–агаровых [35] и хитозан–желатин–агаровых [36] комплексов с внедренным экстрактом антоцианов были разработаны в качестве «интеллектуальной» пленочной упаковки для обнаружения порчи продуктов питания. Гидропленочная повязка на основе комплекса желатин–агар предлагается к использованию в качестве ранозаживляющего покрытия [37]. Гидрогели на основе комплексов хитозан–желатин–агар предлагается использовать в тканевой инженерии [38]. Исследовано применение желатин–агаровых желирующих агентов для улучшения текстурных характеристик пищевых гелей [39], а также для увеличения срока хранения спермы сельскохозяйственных животных [40].

Полипептид желатин является продуктом деградации коллагена, фибриллярного белка соединительной ткани хордовых (*Chordata*). Желатин – это полиамфолит, в макромолекуле которого присутствуют как положительно, так и отрицательно заряженные группы, а также гидроксильные группы и гидрофобные радикалы [41, 42]. Аминокислотный состав белка, в том числе желатина, является существенным фактором, влияющим на фазовое состояние и коллоидно-химические свойства белок–полисахаридных водных систем [8, 43]. Содержание различных аминокислот сильно зависит от природного источника и технологии получения полипептида [41, 44]. Рыбный желатин характеризуется низким содержанием пролина *Pro* и гидроксипролина *Hyp* по сравнению с желатином из млекопитающих [43, 45]. В результате рыбный желатин обладает низкими температурами золь–гель перехода, а сформированные гидрогели – невысокой

упругостью и прочностью [42]. Тем не менее, интерес к рыбному желатину продиктован перспективностью его использования вместо желатина из млекопитающих в ряде отраслей, связанных со здоровьем и питанием человека, в связи с экономическими и социокультурными аспектами, а также эпидемиологическими требованиями [43, 46]. При этом для улучшения коллоидно-химических и функциональных характеристик рекомендуется применять рыбный желатин в составе комплексов с полисахаридом [25, 42, 47].

Агар относится к сульфатированным галактанам красных водорослей (*Rhodophyta*), обладает практически неисчерпаемыми мировыми запасами [48, 49] и имеет большой потенциал для использования в индустрии продуктов питания [48, 50]. В водных растворах агар проявляет ярко выраженное полианионное поведение. Основным компонентом агара является агароза, которой сопутствует агаропектин [48, 51]. Макромолекула агарозы состоит из чередующихся остатков  $\beta$ -D-галактопиранозы и 3,6-ангидро- $\alpha$ -L-галактопиранозы, которые согласно номенклатуре галактанов красных водорослей обозначаются как D и LA соответственно [48]. Характерными для агарозы заместителями при гидроксильных линейных цепей выступают оксиметильные (в позициях 2 LA-остатка и 6 D-остатка) и сульфатные (в позициях 4 и 6 D-остатка) группы, хотя содержание последних невелико [51, 52]:

В данной работе была поставлена цель исследовать влияние массового соотношения биополимеров, pH и ионной силы на фазовое состояние водной смеси рыбный желатин–агар, используя два образца желатина, отличающиеся по содержанию аминокислот. Исследование направлено на создание научной основы определения условий получения устойчивых желатин–агаровых комплексов для их практического использования в индустрии продуктов питания и биологически активных добавок.





# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали два образца рыбного желатина (РЖ): коммерческий рыбный желатин (РЖК) и рыбный желатин, экстрагированный в лабораторных условиях (РЖЭ).

В качестве РЖК был использован желатин из кожи холодноводных рыб производства Sigma–Aldrich Corp. (Канада), G7041, Lot # SLCC7087. Содержание влаги в образце РЖК составляет 12.6%, общего азота – 15.9%, белка – 87.4%. Среднечисленная молекулярная масса  $M_n$  составляет 160 кДа, средневесовая  $M_w$  – 228 кДа, средневязкостная  $M_v$  – 133 кДа [44]. Изoeлектрическая точка  $pI_{РЖК}$ , определенная вискозиметрическим методом, составляет 7.6, турбидиметрическим – 7.8.

РЖЭ был получен в Лаборатории химии и технологии морских биоресурсов (Мурманский арктический университет, Мурманск) путем экстракции из кожи атлантической трески *Gadus morhua* при pH 5.0 по стандартной процедуре [53, 54]. Содержание влаги в образце РЖЭ составляет 8.0%, общего азота – 16.5%, белка – 90.7%, золы – 1.5%.  $M_n$  составляет 202 кДа,  $M_w$  – 325 кДа,  $M_v$  – 145 кДа [44].  $pI_{РЖЭ}$ , определенная вискозиметрическим методом, составляет 9.2, турбидиметрическим методом – 9.1. Аминокислотный состав обоих использованных образцов желатина приведен в Таблице 1.

Использовали образец агара (А) производства Sigma–Aldrich Corp. (Португалия), A7002, Lot # BCBC2317. Содержание влаги в образце 11.0%, золы – 2.7%.  $M_n$  составляет 240 кДа.

Исходный раствор (дисперсию) образцов рыбного желатина готовили путем растворения точной навески в дистиллированной воде при 40°C с предварительным набуханием при 23°C в течение 30 мин, агара – путем растворения при 80°C с предварительным набуханием при 23°C в течение суток. «Естественные» значения  $pH_{nat}$  в дистиллированной воде составляли: для растворов РЖК – 5.1, РЖЭ – 5.8, агара – от 6.6 до 6.9. Растворы смешивали в пропорциях, соответствующих заданным значениям концентрации желатина  $C_{РЖ}$  (0.1 или 0.2%) и массовым соотношениям биополимеров  $Z$  (от 0.1 до 1.2 г<sub>А</sub>/г<sub>РЖ</sub>). Значения  $pH_{nat}$  водных смесей РЖК–агар составляли от 5.2 до 5.8, смесей РЖЭ–агар – от 6.0 до 6.3.

Для приготовления смесей РЖ–агар с различными значениями pH использовали растворы 0.05М HCl и 0.01 М КОН. Для приготовления смесей с разной ионной силой  $I$  использовали растворы NaCl концентрацией от 0.8 мМ до 2.0 М.

Все исследованные водные системы перед измерениями оптической плотности, размера и  $\zeta$ -потенциала частиц дисперсной фазы термостатировали при температуре опыта в течение 1 ч при постоянном перемешивании, т.к. предварительно было установлено, что за это время в системах устанавливаются равновесные значения указанных параметров. В системах, подверженных комплексной коацервации, наблюдалось мгновенное визуальное фиксированное образование коацерватов. Для унификации измерений такие системы также анализировали по описанному выше протоколу. Фотографии приготовленных образцов получали с помощью

**Таблица 1.** Аминокислотный состав использованных образцов желатина [44].

**Table 1.** Amino acid composition of the used gelatin samples [44].

Аминокислота	Обозначение	Содержание, % (г/100 г белка)	
		РЖК	РЖЭ
Глицин	<i>Gly</i>	18.62 ± 0.93	18.48 ± 0.92
Пролин	<i>Pro</i>	12.90 ± 0.64	12.25 ± 0.61
Гидроксипролин	<i>Hyp</i>	9.68 ± 0.48	7.46 ± 0.37
Лизин	<i>Lys</i>	2.30 ± 0.12	3.56 ± 0.18
Гистидин	<i>His</i>	1.66 ± 0.08	1.89 ± 0.09
Аргинин	<i>Arg</i>	7.65 ± 0.38	7.68 ± 0.38
Аспарагиновая кислота	<i>Asp</i>	5.62 ± 0.28	5.57 ± 0.28
Глутаминовая кислота	<i>Glu</i>	9.31 ± 0.47	9.13 ± 0.46
Серин	<i>Ser</i>	6.36 ± 0.32	6.57 ± 0.33
Треонин	<i>Thr</i>	2.58 ± 0.13	2.67 ± 0.13
Тирозин	<i>Tyr</i>	0.83 ± 0.04	1.00 ± 0.05
Аланин	<i>Ala</i>	9.40 ± 0.47	9.35 ± 0.47
Валин	<i>Val</i>	2.12 ± 0.11	2.12 ± 0.11
Лейцин	<i>Leu</i>	2.76 ± 0.14	2.90 ± 0.14
Изолейцин	<i>Ile</i>	1.47 ± 0.07	1.56 ± 0.08
Фенилаланин	<i>Phe</i>	2.40 ± 0.12	2.34 ± 0.12
Метионин	<i>Met</i>	1.57 ± 0.08	1.78 ± 0.09
Таурин	<i>Tau</i>	2.86 ± 0.14	3.67 ± 0.18



системы камер (48 + 12 Мпк) смартфона Apple iPhone 15 (Apple Inc., США).

Для исследования межмолекулярного взаимодействия РЖ–агар использовали методы ИК Фурье спектроскопии и абсорбционной УФ спектроскопии.

ИК-спектры образцов агара и смесей РЖК–агар в координатах волновое число  $\nu$  ( $\text{см}^{-1}$ ) – пропускание  $T$  (%) регистрировали с использованием инфракрасного спектрометра с Фурье-преобразованием ФСМ 2202 (Инфраспек, Россия) в диапазоне волновых чисел 700–1700  $\text{см}^{-1}$ . Проводили 50 сканирований с разрешением 2  $\text{см}^{-1}$ . Применяли следующий протокол приготовления образца. Исследуемые образцы смешивали с KBr, после чего высушивали в лиофильной сушилке BK-FD10T (Biobase, Китай) при температуре  $-60^\circ\text{C}$  и остаточном давлении не более 1 Па в течение 8 ч. Далее смеси высушивали в вакуумном сушильном шкафу VAC-24 (Stegler, Китай) при температуре  $60^\circ\text{C}$  в течение 6 ч для удаления остаточной влаги, после чего готовили Таблицатки с использованием гидравлического пресса. В качестве образца сравнения использовали Таблицатки, изготовленные из чистого KBr.

УФ-спектры поглощения водных дисперсий биополимеров и их смесей в области ближнего ультрафиолета (диапазон длин волн  $\lambda = 195\text{--}255$  нм) регистрировали с точностью до 0.1 нм в координатах  $\lambda$  – оптическая плотность  $A$  при  $23^\circ\text{C}$ . Использовали спектрометр T70 UV/visible (PG Instruments Ltd., Великобритания) с кварцевой кюветой толщиной 0.01 м.

Турбидиметрию в видимой части спектра применяли для проведения титрования растворов РЖК и РЖЭ раствором агара при установленной длине волны  $\lambda = 500$  нм; для определения размеров частиц дисперсной фазы в растворах биополимеров методом дисперсии светорассеяния (ДСР), иначе – «спектра мутности», в диапазоне  $\lambda$  от 450 до 550 нм с шагом 1 нм; а также – для определения влияния pH и  $I$  на фазовое состояние водных дисперсий при  $\lambda = 500$  нм. Турбидиметрические измерения проводили при  $23^\circ\text{C}$  на спектрофотометре Юнико-1200/1201 (United Products & Instruments Inc., США) с набором стеклянных кювет толщиной от 0.01 до 0.03 м. Полученные значения оптической плотности  $A$  пересчитывали на мутность  $\tau$  ( $\text{м}^{-1}$ ). Средний радиус частиц  $R$  определяли по значениям волнового экспонента, не зависящего от длины волны, из степенной модели Ангстрема.

Кроме того, средний гидродинамический радиус частиц  $R$  находили по методу динамического квазиупругого лазерного светорассеяния (КУЛСР). Метод основан на определении коэффициента диффузии дисперсных частиц в жидкой фазе путем анализа характерного времени флуктуаций рассеянного света.  $R$  определяется из коэффициента диффузии согласно уравнению Стокса–Эйнштейна с учетом допущения о сферической форме частиц.

$\zeta$ -Потенциал частиц оценивали посредством наложения на исследуемый раствор однородного электрического поля с постоянной напряженностью. Наблюдающийся при этом доплеровский сдвиг частоты связан

с линейной скоростью их движения.  $\zeta$ -потенциал частиц определяется из уравнения Гельмгольца–Смолуховского по величине электрофоретической подвижности частиц.

Использовали анализатор размеров частиц и  $\zeta$ -потенциала Photocor Complex-Z (Photocor, Россия) с термостабилизированным полупроводниковым лазером с длиной волны 636.8 нм и мощностью 35 мВт в качестве источника излучения. Угол светорассеяния в режиме определения  $R$  частиц составлял  $\theta = 90^\circ$ , в режиме определения  $\zeta$ -потенциала частиц  $\theta = -20^\circ$ . Измерения проводили при  $23^\circ\text{C}$ .

Турбидиметрические измерения оптической плотности, а также измерения  $R$  и  $\zeta$ -потенциала частиц дисперсной фазы проводили в трех повторностях. Относительная погрешность измерения не превышала 10%.

Морфологию лиофилизированных гелей РЖК и смеси РЖК с агаром анализировали посредством сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием эмиссионного сканирующего электронного микроскопа Merlin (Carl Zeiss AG, Германия) при ускоряющем напряжении 5 кВ. Эксперименты проведены с использованием криогелей, приготовленных следующим образом. Для получения гелей водные дисперсии РЖК ( $C_{\text{РЖ}} = 10\%$ ) и смеси РЖК с агаром ( $C_{\text{РЖ}} = 10\%$ ,  $Z = 0.8 \text{ г}_\text{А}/\text{г}_\text{РЖ}$ ) охлаждали до температуры от 4 до  $6^\circ\text{C}$  и выдерживали в течение 24 ч. Затем образцы были заморожены в жидком азоте и лиофилизированы для получения ксерогелей. Срезы ксерогелей были покрыты смесью золото–палладий (80/20) для получения снимков СЭМ. Размеры ячеек ксерогелей определены с помощью программного пакета Mountains SEM® software Digital Surf. Эксперименты СЭМ были проведены в Междисциплинарном Центре «Аналитическая микроскопия» (Казанский федеральный университет, Казань).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Формирование комплексов рыбный желатин–агар

Межмолекулярные взаимодействия в смеси РЖК и агара были изучены методом ИК Фурье спектроскопии. Получены ИК-спектры пропускания агара и смесей РЖК–агар при трех массовых соотношениях биополимеров  $Z$  ( $\text{г}_\text{А}/\text{г}_\text{РЖ}$ ): 0.02, 0.06 и 0.10 (Рис. 1).

Полосы пропускания в ИК-спектре агара были отнесены к колебаниям соответствующих связей определенных групп агарозы по данным, опубликованным в [29, 51, 52] (Таблица 2).

Как видно из Рис. 1, в спектрах смесей РЖК–агар относительно спектра агара происходят существенные низкочастотные сдвиги полос пропускания при 890  $\text{см}^{-1}$  (на 20  $\text{см}^{-1}$ ) и при 1250  $\text{см}^{-1}$  (на 10  $\text{см}^{-1}$ ). Также происходит высокочастотный сдвиг относительно полосы агара при 1155  $\text{см}^{-1}$  (на 10  $\text{см}^{-1}$ ). При этом величина сдвига не зависит от массового соотношения биополимеров в системе. Указанные полосы в спектре агара соотносятся с колебаниями связей при сульфогруппах (см. Таблицу 2). Следовательно, обнаруженные сдвиги могут говорить о формировании в смеси РЖК–агар



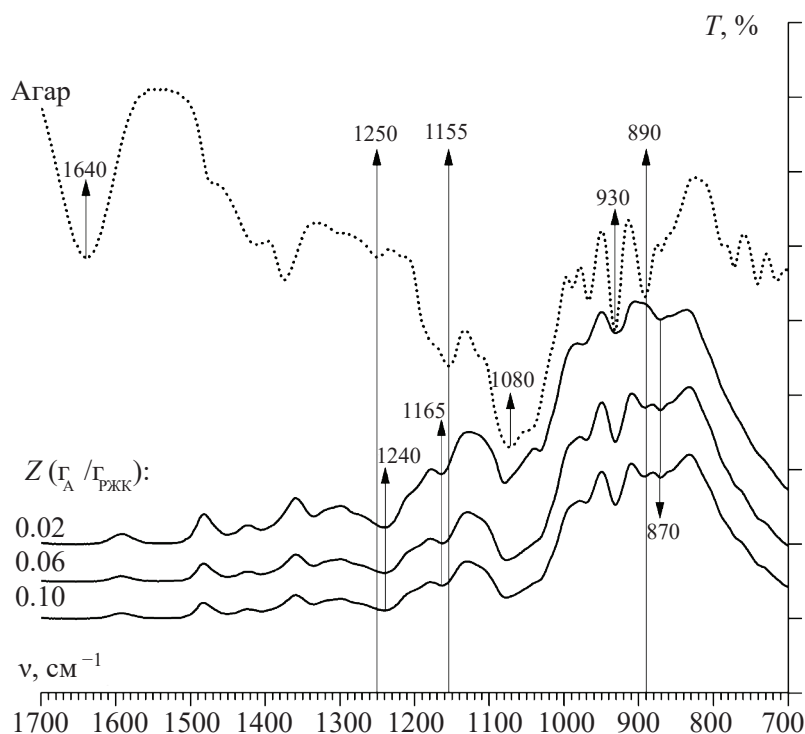


Рис. 1. ИК-спектры пропускания агар и смесей РЖК–агар.  
Fig. 1. IR transmission spectra of agar and CFG–agar mixtures.

супрамолекулярных комплексов, в которых биополимеры связаны нековалентными электростатическими взаимодействиями отрицательных сульфогрупп агара и положительных аминокислотных остатков *His*, *Arg* и *Lys* желатина.

В ходе дальнейших исследований было рассмотрено влияние ряда факторов на фазовое состояние водной смеси РЖ–агар.

## 2. Влияние массового соотношения биополимеров

Получены кривые турбидиметрического титрования растворов РЖК и РЖЭ растворами агара (Рис. 2). В целом кривые имеют форму, характерную для кривых титрования раствора белка (или полипептида) раствором любого заряженного полисахарида [8]. Ранее авторами были получены аналогичные кривые титрования раствором альгината натрия растворов РЖК [55] и РЖЭ [24], а также раствора коммерческого бычьего желатина типа В (БЖК) растворами  $\kappa$ -каррагинана [26] и альгината натрия [56].

Видно, что при увеличении массового соотношения биополимеров  $Z$  мутность раствора  $\tau$  возрастает до определенного предела, который соответствует «критическому» соотношению  $Z_C$  – верхней границе формирования стехиометричных комплексов РЖ–агар постоянного состава. Такие комплексы формируются при низком содержании агара и избытке желатина, когда все отрицательные группы агара экранированы положительными группами желатина. Значение  $Z_C$  для

РЖК составляет 0.80  $g_A/g_{РЖК}$ , для РЖЭ 1.10  $g_A/g_{РЖЭ}$ . Превышение значения  $Z_C$  для РЖЭ над таковым для РЖК можно объяснить большим содержанием в РЖЭ аминокислотных остатков, несущих положительный заряд (особенно остатков *Lys* – см. Таблицу 1).

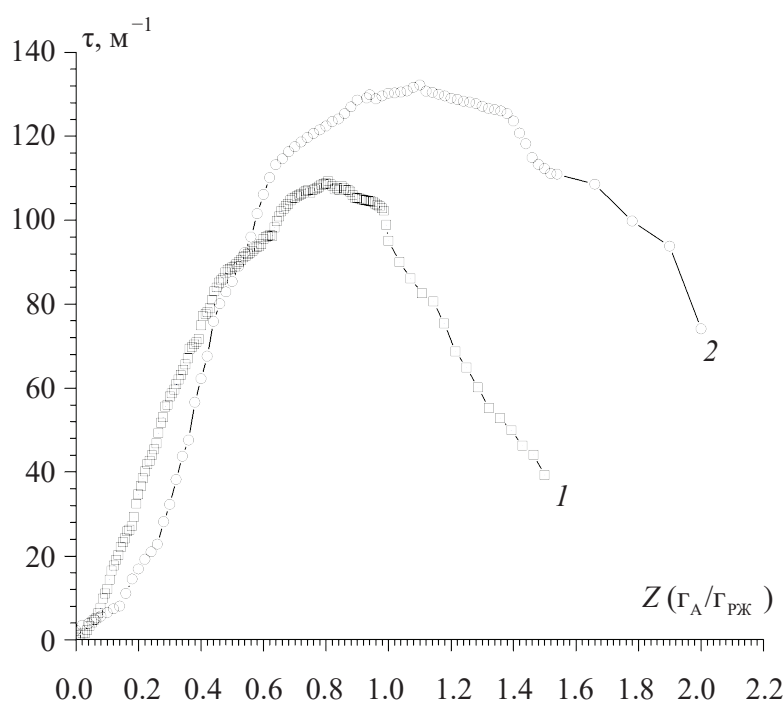
Рост  $\tau$  в области  $Z \leq Z_C$  связан с увеличением концентрации стехиометричных комплексов, способных формировать крупные агрегаты, усиливающие нерэлеевское светорассеяние водной смеси биополимеров. В области ниже  $Z_C$  остаются и свободные молекулы желатина – избыток, «неразобранный» молекулами агара. В области  $Z > Z_C$  происходит падение  $\tau$  водной смеси агара с желатином. Причиной этого является увеличение роли нестехиометричных комплексов переменного состава. Свободных молекул желатина в системе не остается, некомпенсированность отрицательных зарядов агара в комплексе при увеличении  $Z$  возрастает. Таким образом, электростатическое отталкивание комплексов усиливается, что приводит к уменьшению размеров агрегатов, а следовательно – мутности растворов.

С учетом полученных значений  $Z_C$  и молекулярных масс биополимеров (см. Экспериментальную часть) рассчитали соотношение между количеством связывающихся макромолекул биополимеров ( $mol_{РЖ}/mol_A$ ) в стехиометричном комплексе. Для РЖК полученные соотношения равны: при расчете по  $M_n$  – 1.9, по  $M_w$  – 1.3, по  $M_n$  – 2.3. Для РЖЭ: 0.6, 1.1 и 1.5 соответственно. Полученные значения не позволяют определить



**Таблица 2.** Полосы пропускания определенных функциональных групп агарозы.**Table 2.** Transmission bands of some functional groups of agarose.

Положение полосы пропускания, $\text{см}^{-1}$	Колебания связи в определенной группе
890	Валентные колебания эфирной связи C—O—S сульфогрупп в позиции 4 $\beta$ -D-галактопиранозных остатков
930	Валентные колебания связи C—O 3,6-ангидро-остатков
1080	
1155	Валентные колебания эфирной связи C—O—S сульфогрупп
1250	Валентные колебания связи S=O сульфогрупп
1640 (Амид I)	Валентные колебания связи C=O агарозы (а также остатков белка в образце агара)

**Рис. 2.** Кривые турбидиметрического титрования растворов РЖК (1) и РЖЭ (2) раствором агара. Концентрации исходных растворов (%):  $C_{РЖ} = 0.2$ ;  $C_A$ : 0.2 (1), 0.4 (2);  $\lambda = 500$  нм, 23°C.**Fig. 2.** Curves of turbidimetric titration of (1) CFG and (2) LEFG solutions with agar solution. Concentrations of initial solutions (%): CFG = 0.2, CA = 0.2 (1) and 0.4 (2);  $\lambda = 500$  nm, 23°C.

в рамках классических представлений, принятых в супрамолекулярной химии [10], какой из биополимеров является рецептором (или «хозяином»), а какой — субстратом (или «гостем»). Особенно это характерно для РЖЭ. Такая ситуация отличается от рассмотренного авторами ранее формирования супрамолекулярных комплексов желатина с другим сульфатированным полисахаридом красных водорослей —  $\kappa$ -каррагинаном [26]. Тогда было показано, что одна молекула  $\kappa$ -каррагинана (рецептора) связывает в комплексе 6 молекул БЖК (субстрата). Данное различие в комплексообразовании рассмотренных полисахаридов с желатином

объясняется значительно более низкой сульфатированностью агарозы по сравнению с полисахаридами группы каррагинанов [51, 52].

Дополнительную информацию о межмолекулярных взаимодействиях агара и РЖ получили из анализа представленных на Рис. 3 УФ-спектров поглощения водных дисперсий РЖ, агара и их смесей в области  $Z \leq Z_C$ .

Обнаружено, что оба использованных образца РЖ при концентрации 0.1% имеют близко лежащие спектры с широкой полосой поглощения, максимум которой лежит при длине волны  $\lambda_{\max} = 224$  нм (см. Рис. 3).



Согласно справочным данным [57] значительный вклад в полосу поглощения желатина вблизи указанного значения  $\lambda_{\max}$  дают гидроксильные группы аминокислотных остатков *Ser*, *Thr*, *His*; неподеленные электронные пары азота, сопряженные с двойными связями в остатках *His* и *Arg*; а также сопряженные двойные связи в бензольных ядрах ароматических аминокислот, в частности тирозина *Tyr* (см. Таблицу 1). По сравнению с желатином максимум поглощения в спектрах дисперсий агар при  $C_A$  от 0.01 до 0.08% лежит в более дальней УФ-области ( $\lambda_{\max} \leq 196$  нм), что связано с наличием в макромолекулах полисахарида таких хромофоров, как гидроксо- и сульфогруппы. Следует заметить, что увеличение  $C_A$  вызывает смещение  $\lambda_{\max}$  в длинноволновую область, что можно объяснить увеличением доли двухспиральных структур за счет агрегации макромолекул агарозы [48].

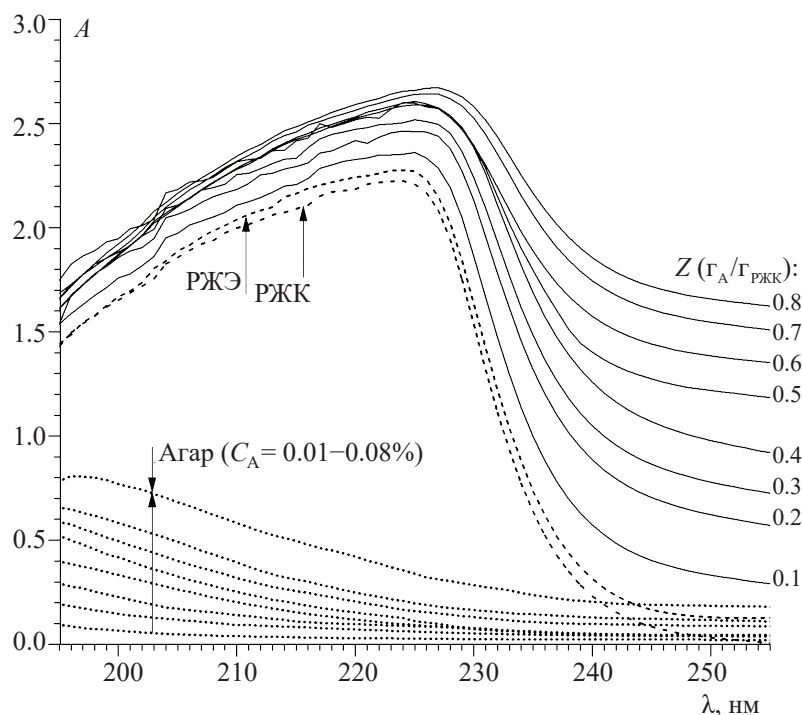
При введении добавок агара в раствор РЖ в области, соответствующей формированию стехиометричных комплексов (см. Рис. 2), происходит батохромный сдвиг  $\lambda_{\max}$  РЖ, сопровождающийся увеличением оптической плотности и значительным уширением полосы поглощения. На Рис. 3 это продемонстрировано для образца РЖК, когда при  $Z_C = 0.8$  г<sub>А</sub>/г<sub>РЖК</sub>  $\lambda_{\max}$  сдвигается с 224 (в спектре «чистого» образца РЖК) до 227 нм (в спектре смеси РЖК с агаром). Подобную картину наблюдали при таких же условиях и в случае образца РЖЭ. Аналогичные явления батохромного сдвига и уширения

полос поглощения в УФ-спектрах были ранее показаны авторами для водных смесей альгината натрия с РЖК [55], РЖЭ [24] и БЖК [56], а также  $\kappa$ -каррагинана с БЖК [26].

Смещение  $\lambda_{\max}$  в сторону больших длин волн свидетельствует об участии хромофоров в межмолекулярных нековалентных взаимодействиях: водородных связях между гидроксильными группами и электростатических взаимодействиях отрицательных сульфогрупп агара и положительных аминокислотных остатков РЖ. Уширение полосы поглощения дисперсий смесей биополимеров при увеличении их массового соотношения  $Z$  (г<sub>А</sub>/г<sub>РЖК</sub>) происходит по причине укрупнении частиц дисперсной фазы при агрегации комплексов РЖ–агар, что приводит к увеличению нерэлеевского светорассеяния в соответствии с теорией Ми.

Увеличение размеров частиц дисперсной фазы в растворах агара и в водных смесях РЖ–агар при увеличении концентрации  $C_A$  (а следовательно, и массового соотношения  $Z$ ), определенное методами КУЛСР и ДСР, а также – соответствующее этому изменению  $\zeta$ -потенциала продемонстрированы на Рис. 4.

Обнаружено, что средний радиус  $R$  частиц в водных смесях РЖ–агар при увеличении  $C_A$  резко возрастает, достигая условного «плато» примерно при 0.05% ( $Z = 0.5$  г<sub>А</sub>/г<sub>РЖ</sub>). При этом оба использованных метода – КУЛСР и ДСР – показывают сопоставимые



**Рис. 3.** УФ-спектры поглощения водных дисперсий агара (точечные линии), РЖК, РЖЭ (пунктирные линии) и смесей РЖК–агар (сплошные линии);  $C_{РЖ} = 0.1\%$ ,  $23^\circ\text{C}$ .

**Fig. 3.** UV absorption spectra of aqueous dispersions of agar (dotted lines), CFG, LEFG (dashed lines) and CFG–agar mixtures (solid lines);  $C_{FG} = 0.1\%$ ,  $23^\circ\text{C}$ .



результаты (см. точки 2 и 3 на Рис. 4а). В дисперсиях обоих образцов желатина без агара при  $C_{РЖ} = 0.1\%$   $R$  имеет порядок  $\sim 100$  нм, в дисперсиях комплексов агар–РЖК  $R$  достигает на «плато» значений 1300–1400 нм, в дисперсиях агар–РЖЭ – значений 2500–2900 нм. При этом в дисперсиях «чистого» агара  $R$  в диапазоне  $C_A$  от 0.01 до 0.10% возрастает всего лишь от  $\sim 10$  до  $\sim 300$  нм.

Неаддитивное увеличение размеров частиц в белок–полисахаридных водных смесях является широко известным фактом [4, 9]. Сопоставимые с полученными результатами значения  $R$  были ранее получены авторами для водных смесей БЖК– $\kappa$ -каррагинан ( $\sim 1400$  нм) [4] и БЖК–альгинат натрия ( $\sim 1500$  нм) [56].

$\zeta$ -Потенциал частиц «чистого» агара лежит в отрицательной области, испытывая тенденцию к падению от  $-5.5$  до  $-21.1$  мВ при увеличении  $C_A$  от 0.01 до 0.10% (см. точки 1 на Рис. 4б). Рост  $R$  частиц комплексов при увеличении  $C_A$  (и, соответственно,  $Z$ ) сопровождается падением  $\zeta$ -потенциала от  $\zeta_0 = 2.4$  мВ для «чистого» РЖК и 9.4 мВ для «чистого» РЖЭ с перезарядкой при  $Z_0 \sim 0.3$  г<sub>A</sub>/г<sub>РЖК</sub> и  $\sim 0.5$  г<sub>A</sub>/г<sub>РЖЭ</sub> соответственно (см. точки 2 и 4 на Рис. 4б). Превышение значений  $\zeta_0$  и  $Z_0$  для РЖЭ над таковыми для РЖК в процессе комплексообразования РЖ с агаром, как и в случае с  $Z_C$  (см. Рис. 2), объясняется существенно большим содержанием в РЖЭ по сравнению с РЖК аминокислотных остатков *Lys*, несущих положительный заряд (см. Таблицу 1). Этой же причиной, приводящей к большему количеству молекул агара, способных электростатически связаться

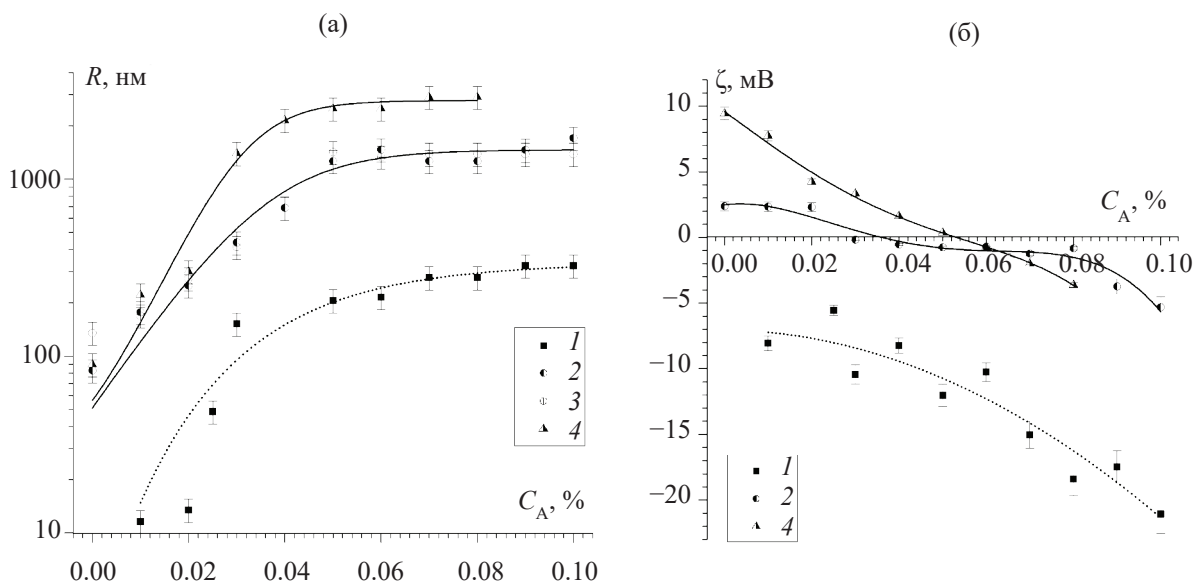
молекулой желатина, объясняется и больший размер на «плато» частиц РЖЭ–агар по сравнению с РЖК–агар (см. Рис. 4а).

В исследованном диапазоне  $Z$  системы в узкой области «естественных» значений  $pH_{nat}$  не происходит фазового разделения, а размер частиц РЖ–агар достигает некоторых предельных значений (см. Рис. 4а). Это можно объяснить сохранением частицами одноименного (отрицательного) заряда во всем исследованном диапазоне  $Z$ . Положительные значения  $\zeta$ -потенциала частиц в области низких  $Z$  объясняются избытком свободных молекул желатина, положительный заряд которых компенсируется отрицательным зарядом комплексов лишь в точке «обнуления»  $Z_0$  (см. Рис. 4б). Иная картина будет наблюдаться при движении от  $pH_{nat}$  в кислую и щелочную области.

### 3. Влияние pH среды

Зависимости мутности водных дисперсий РЖК, РЖЭ и смесей РЖК–агар при некоторых исследованных значениях  $Z$  от pH среды представлены на Рис. 5а. Очевидно, что максимумы на кривых зависимости  $\tau(pH)$  для образцов РЖ характеризуют турбидиметрически определенные положения их  $pI$  (7.8 для РЖК и 9.1 для РЖЭ – кривые 1 и 2 соответственно).

Общий вид кривых  $\tau(pH)$  для водных смесей РЖК–агар соответствует классической схеме эволюции мутности водной смеси отрицательно заряженного полисахарида с белком при переходе системы из щелочной в кислую область [5, 8]. В частности, подобные кривые были продемонстрированы для разнообразных



**Рис. 4.** Зависимость среднего радиуса  $R$  (а) и  $\zeta$ -потенциала (б) частиц агара (1) и комплексов РЖ–агар (2–4) в водных дисперсиях от концентрации агара  $C_A$ .  $R$  определён методами КУЛСР (1, 2, 4) и ДСР (3). Желатин РЖК (2, 3) и РЖЭ (4),  $C_{РЖ} = 0.1\%$ ,  $23^\circ\text{C}$ .

**Fig. 4.** Dependences of (a) average radius  $R$  and (b)  $\zeta$ -potential on agar concentration  $C_A$  for particles of (1) agar and (2–4) FG–agar complexes in aqueous dispersions.  $R$  has been determined by the methods of (1, 2, 4) QELS and (3) SLD. Gelatin (2, 3) CFG and (4) LEFG;  $C_{FG} = 0.1\%$ ,  $23^\circ\text{C}$ .



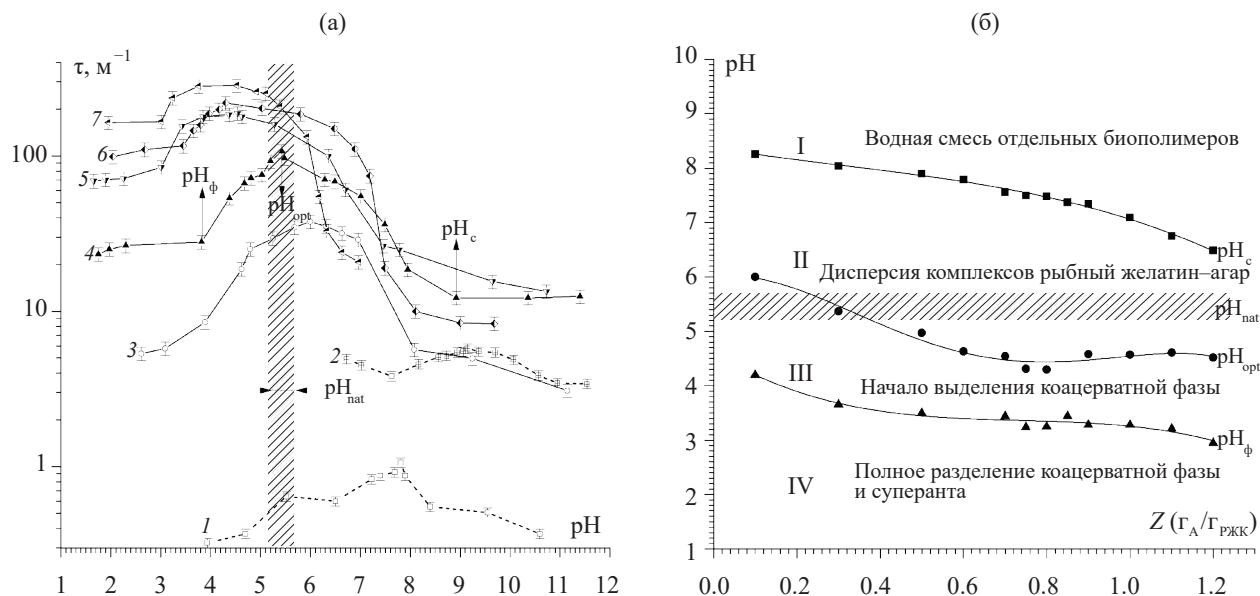
смесей данного типа: РЖК–агар [27, 28], РЖЭ–альгинат натрия [24], БЖК–хитозан [5], РЖК–карбоксилированный хитозан [14], изолят сывороточного белка–полисахарид опенка зимнего (*Flammulina velutipes*) [13].

На каждой кривой можно выделить несколько характеристических значений pH ( $pH_c$ ,  $pH_{opt}$ ,  $pH_\phi$  – показаны на примере соотношения  $Z = 0.3 \text{ г}_A/\text{г}_{РЖК}$  – см. кривую 4 на Рис. 5а). При понижении pH в области, близкой к  $pI$  желатина, наблюдается резкий излом на кривой  $\tau(pH)$ . В данной точке ( $pH_c$ ) начинают формироваться растворимые, а затем и нерастворимые комплексы РЖК–агар. Дальнейшее понижение pH вследствие увеличения размеров частиц дисперсной фазы вызывает рост мутности вплоть до максимального значения  $pH_{opt}$ , лежащего для данного  $Z$  в области  $pH_{nat}$ . В точке  $pH_{opt}$  начинается выделение из системы коацерватной фазы. При последующем движении pH в кислую область мутность оставшегося над коацерватной фазой супернатанта резко падает вплоть до достижения последней характеристической точки  $pH_\phi$ . Данная точка соответствует полному выделению коацерватной фазы комплексов РЖК–агар. Согласно [27] в области ниже  $pH_\phi$  водная смесь двух противоположно заряженных биополимеров представляет собой обогащенную интер-молекулярными комплексами коацерватную фазу и супернатант, являющийся очень разбавленным раствором полиэлектролитов.

Таким образом, характеристические значения  $pH_c$ ,  $pH_{opt}$  и  $pH_\phi$  соответствуют границам реализации тех или иных фазовых состояний системы. Фазовая диаграмма

в координатах  $pH(Z)$ , построенная путем анализа кривых  $\tau(pH)$  при разных массовых соотношения биополимеров в водной смеси РЖК–агар (см. Рис. 5а), представлена на Рис. 5б. В области I – выше кривой  $pH_c(Z)$  – система является однофазной водной смесью отдельных биополимеров, комплексы не образуются. В области II – между кривыми  $pH_c(Z)$  и  $pH_{opt}(Z)$  – формируются комплексы РЖК–агар. В области III – между кривыми  $pH_{opt}(Z)$  и  $pH_\phi(Z)$  – начинают выделяться коацерваты, обогащенные комплексами РЖК–агар. Наконец, в области IV – ниже  $pH_\phi(Z)$  – происходит полное разделение коацерватной фазы и супернатанта. Видно, что в большей части исследованного диапазона  $Z$  при «естественных» значениях  $pH_{nat}$  и соблюдении условий эксперимента водные смеси РЖК–агар являются дисперсией супрамолекулярных комплексов без выделения коацерватной фазы (см. заштрихованную область на Рис. 5б).

При увеличении соотношения биополимеров (т.е. концентрации агара  $C_A$ ) происходит падение значений всех трех характеристических pH. При этом  $pH_c$  и  $pH_\phi$  падают во всем исследованном диапазоне  $Z$ , а  $pH_{opt}$  – до  $\sim 0.8 \text{ г}_A/\text{г}_{РЖК}$ , выходя в дальнейшем на плато (см. Рис. 5б). Это можно объяснить тем, что при увеличении  $C_A$  происходит рост вклада отрицательного заряда в общий заряд частиц дисперсной фазы. В области формирования стехиометричных комплексов – за счет увеличения концентрации комплексов постоянного состава, в области нестехиометричных комплексов – за счет увеличения отрицательного заряда каждого комплекса. С целью



**Рис. 5.** (а) Зависимость мутности  $\tau$  водных дисперсий РЖК (1) и РЖЭ (2), а также смесей РЖК–агар с массовым соотношением  $Z$ ,  $\text{г}_A/\text{г}_{РЖК}$ : 0.1 (3), 0.3 (4), 0.7 (5), 0.8 (6), 1.2 (7) от pH среды. (б) Фазовая диаграмма  $pH(Z)$  водных смесей РЖК и агара.  $C_{РЖ} = 0.2\%$ ,  $\lambda = 500 \text{ нм}$ ,  $23^\circ\text{C}$ .

**Fig. 5.** (a) Dependences of turbidity  $\tau$  on medium pH for aqueous dispersions of (1) CFG and (2) LEFG, as well as CFG–agar mixtures with different mass ratios  $Z$  ( $\text{g}_A/\text{g}_{CFG}$ ): 0.1 (3), 0.3 (4), 0.7 (5), 0.8 (6), 1.2 (7). (b) The  $pH(Z)$  phase diagram of aqueous CFG–agar mixtures:  $C_{FG} = 0.2\%$ ,  $\lambda = 500 \text{ nm}$ ,  $23^\circ\text{C}$ .



достижения степеней нейтрализации, соответствующих каждому из характеристических рН, при увеличении  $Z$  необходимо вводить в систему все большее количество ионов  $H^+$  (т.е. понижать рН). Подобная зависимость  $pH_{opt}$  от содержания полисахарида была показана для комплексов РЖК–карбоксилированный хитозан [14]. Аналогичные результаты были получены и при исследовании влияния рН на фазовое состояние водных дисперсий комплексов РЖЭ–агар.

Зависимость размера и  $\zeta$ -потенциала частиц в водных дисперсиях агара, РЖ и смесей РЖК–агар от рН при двух значениях массового соотношения агар/РЖК, соответствующих формированию при  $pH_{nat}$  стехиометрических и нестехиометрических комплексов, продемонстрирована на Рис. 6.

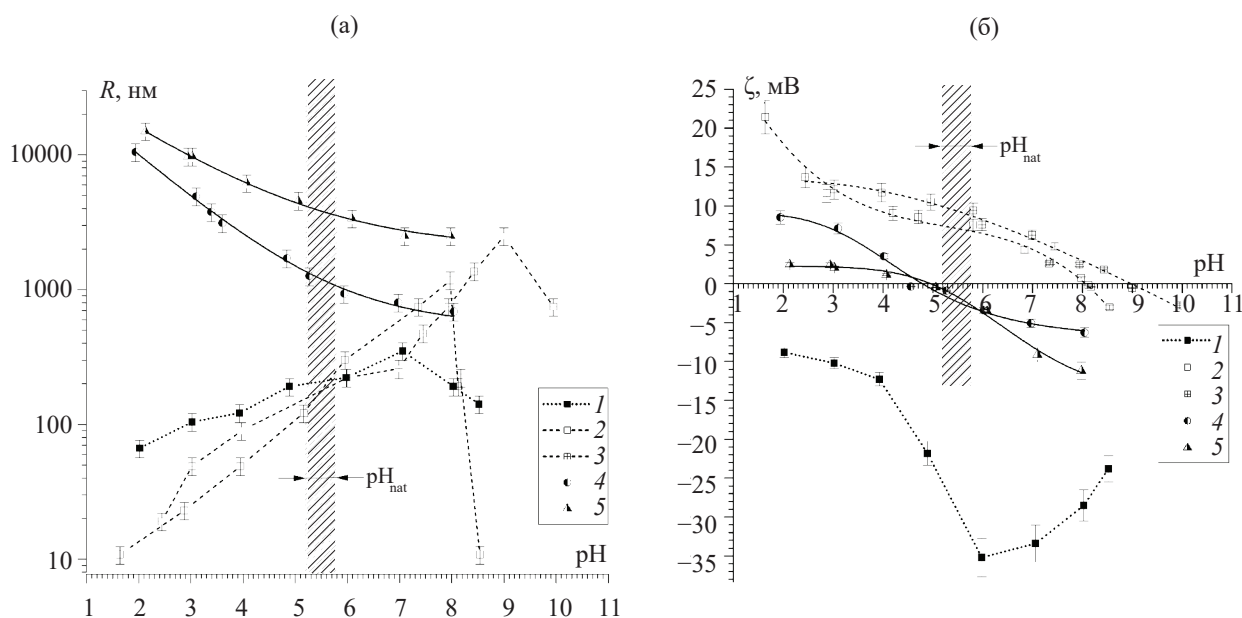
$\zeta$ -потенциал агара во всем исследованном диапазоне рН ожидаемо полностью лежит в отрицательной области. Минимальное значение  $\zeta$ -потенциала ( $-35.3$  мВ) и максимальное значение  $R$  (350 нм) частиц дисперсной фазы агара (см. кривые 1 на Рис. 6) наблюдаются при рН, близком к «естественному» значению рН агара. Рост  $\zeta$ -потенциала агара при движении от «естественного» значения в кислую и щелочную области объясняется нейтрализацией сульфогрупп полисахарида ионами  $H^+$  при введении HCl в первом случае и ионами  $K^+$  при введении КОН во втором.

Максимальные значения  $R$  и нулевые значения  $\zeta$ -потенциала РЖК и РЖЭ (см. соответственно кривые 2 и 3 на Рис. 6) наблюдаются в состоянии изоэлектрической точки данных образцов желатина. Полученные значения

( $pI_{РЖК}$  8.1,  $pI_{РЖЭ}$  9.0) согласуются со значениями  $pI_{РЖК}$  и  $pI_{РЖЭ}$ , найденными вискозиметрическим и турбидиметрическим методами (см. Экспериментальную часть).

Зависимости  $R(pH)$  и  $\zeta(pH)$  для частиц водных смесей РЖК–агар были получены в диапазоне рН примерно от  $pK_{a2}$  сульфогрупп (1.99, см. [58]) до  $pI_{РЖК}$  (см. кривые 4, 5 на Рис. 6). При движении водной смеси биополимеров из области  $pH_{nat}$  в кислую область (введение HCl) наблюдается выделение из дисперсии коацерватов (переход из области II в III, затем – в IV на Рис. 5б). При этом  $R$  частиц в коацерватной фазе возрастает. Так, для  $Z = 0.8$  г<sub>А</sub>/г<sub>РЖК</sub> (соответствует  $Z_C$ , см. Рис. 2)  $R$  увеличивается от 1300 до 11000 нм (см. кривую 4 на Рис. 6а). Увеличению  $R$  сопутствует возрастание значения  $\zeta$ -потенциала с переходом из отрицательной области в положительную (для  $Z = 0.8$  г<sub>А</sub>/г<sub>РЖК</sub> – от  $-0.896$  мВ при рН 5.27 до  $8.52$  мВ при рН 1.94, см. кривую 4 на Рис. 6б). Такая ситуация объясняется протонированием остатков *His*, *Arg* и *Lys* и деионизацией остатков *Asp* и *Glu* желатина, а также сульфогрупп агара. В результате формируются крупные комплексы коацерватной фазы, где сильно заряженные положительные макроионы РЖК связывают большое количество слабо заряженных отрицательных макроионов агара.

При движении исследуемых систем из области  $pH_{nat}$  по направлению к  $pI_{РЖ}$  (введение КОН) наблюдается уменьшение размеров частиц дисперсной фазы и соответствующее понижение  $\zeta$ -потенциала. Так, для  $Z = 0.8$  г<sub>А</sub>/г<sub>РЖК</sub> при рН 8.04  $R$  частиц достигает 700 нм, а  $\zeta$ -потенциал становится равным  $-6.28$  мВ. При этом



**Рис. 6.** Зависимость среднего радиуса  $R$  (а) и  $\zeta$ -потенциала (б) частиц агара  $C_A = 0.08\%$  (1), РЖК (2), РЖЭ (3) и комплексов РЖК–агар с массовым соотношением  $Z$ , г<sub>А</sub>/г<sub>РЖК</sub>: 0.8 (4) и 1.2 (5) от рН среды.  $R$  определен методом КУЛСР.  $C_{РЖ} = 0.1\%$ ,  $23^\circ\text{C}$ .

**Fig. 6.** Dependences of (a) average radius  $R$  and (b)  $\zeta$ -potential on medium pH for particles of (1) agar,  $C_A = 0.08\%$ ; CFG (2); LEFG (3); and CFG–agar complexes with different mass ratios  $Z$ , (г<sub>А</sub>/г<sub>CFG</sub>): 0.8 (4) and 1.2 (5) on medium pH.  $R$  was determined by the QELLS method.  $C_{FG} = 0.1\%$ ,  $23^\circ\text{C}$ .



система переходит на фазовой диаграмме в однофазную область раствора не связанных в комплекс биополимеров (область I на Рис. 5б). Данные изменения  $R$  и  $\zeta$ -потенциала частиц объясняются тем, что в области «справа» от  $pH_{nat}$  РЖК происходит депротонирование *His*, *Arg* и *Lys* и ионизация *Asp* и *Glu* желатина. Положительный заряд полиамфолита уменьшается, отрицательный — растет. В результате возникают электростатические препятствия формированию комплексов РЖК–агар. В системе появляются несвязанные в комплексе желатин и агар.

При увеличении  $Z$  до  $1.2 \text{ г}_A/\text{г}_{РЖК}$  при  $pH_{nat}$  в водной смеси формируются нестехиометричные комплексы ( $Z > Z_C$ , см. Рис. 2), в которых отрицательный заряд сульфогрупп агара не скомпенсирован положительным зарядом *His*, *Arg* и *Lys* желатина. Поэтому  $\zeta$ -потенциал таких комплексов в области «слева» от  $pH_{nat}$  при приближении к  $pK_{a2}$  сульфогрупп агара выходит на положительные значения, существенно меньшие, чем для  $Z = 0.8 \text{ г}_A/\text{г}_{РЖК}$  (2.46 мВ при  $pH 2.13$ , см. кривую 5 на Рис. 6б). По этой же причине в области «справа» от  $pH_{nat}$  при движении к  $pI_{РЖК}$   $\zeta$ -потенциал комплексов при  $Z = 1.2 \text{ г}_A/\text{г}_{РЖК}$  приобретает меньшие значения (–11.2 мВ при  $pH 7.98$ ), чем при  $Z = 0.8 \text{ г}_A/\text{г}_{РЖК}$ .

При переходе от  $pK_{a2}$  сульфогрупп до  $pI_{РЖК}$  размер частиц дисперсной фазы при  $Z = 1.2 \text{ г}_A/\text{г}_{РЖК}$  понижается (от 15 000 нм при  $pH 2.13$  до 2 500 нм при  $pH 7.98$ , см. кривую 5 на Рис. 6а). При этом во всей исследованной области  $pH$   $R$  частиц значительно больше, чем в случае  $Z = 0.8 \text{ г}_A/\text{г}_{РЖК}$ . Это объясняется лучшей агрегацией комплексов в области «слева» от  $pH_{nat}$  из-за меньшего взаимного электростатического отталкивания положительных зарядов и большей степенью электростатического связывания желатина отрицательным агаром в области «справа» от  $pH_{nat}$ .

#### 4. Влияние ионной силы

На Рис. 7 представлены зависимости среднего радиуса и  $\zeta$ -потенциала частиц агара, РЖК и комплексов РЖК–агар от ионной силы  $I$  среды (содержания  $NaCl$ ). Соотношение биополимеров в комплексе взяли равным  $Z_C$  при  $pH_{nat}$  ( $0.8 \text{ г}_A/\text{г}_{РЖК}$ ).

Показано, что  $R$  частиц агара падает от ~300 нм в отсутствие  $NaCl$  до ~100 нм при  $I = 1 \text{ мМ } NaCl$  и далее остается примерно постоянным вплоть до 100 мМ  $NaCl$ . Отрицательный  $\zeta$ -потенциал агара при введении небольших количеств соли возрастает до значения, максимально близкого к нулю (–0.52 мВ) при 10 мМ  $NaCl$ , затем снова падает до –6.50 мВ при 100 мМ  $NaCl$  (см. кривые 1 на Рис. 7). Очевидно, при малых значениях ионной силы происходит экранирование ионами  $Na^+$  сульфогрупп агара, приводящее в итоге к потере полисахаридом заряда. Макромолекулы полисахарида из-за оттока воды и отсутствия внутримолекулярного электростатического отталкивания становятся более компактными и менее вытянутыми друг относительно друга, что препятствует формированию двойных межмолекулярных спиралей [48]. Понижение  $\zeta$ -потенциала

агара при введении больших количеств  $NaCl$  объясняется избытком ионов  $Cl^-$ .

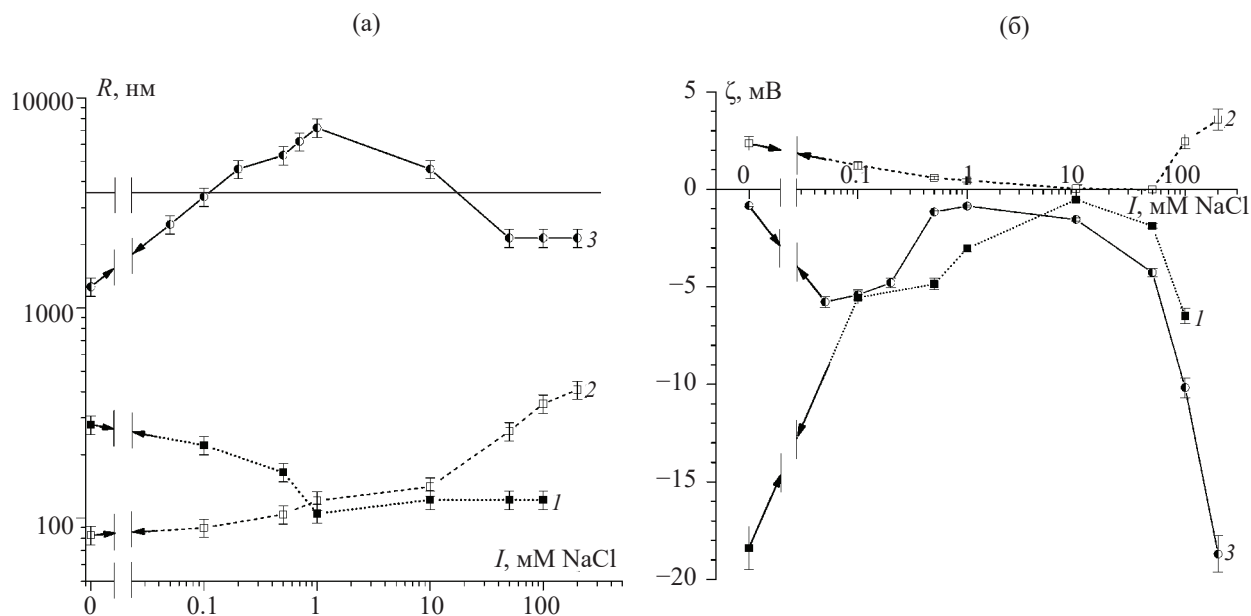
Размер частиц РЖК в растворе при увеличении  $I$  растет от ~100 нм ( $I = 0$ ) до 400 нм (200 мМ  $NaCl$ ). Это сопровождается падением положительного  $\zeta$ -потенциала до практически нулевых значений при содержании  $NaCl$  от 10 до 50 мМ с дальнейшим увеличением до 3.58 мВ при 200 мМ  $NaCl$  (см. кривые 2 на Рис. 7). Введение  $NaCl$  экранирует положительные и отрицательные заряды желатина, что уменьшает электростатическое отталкивание молекул полипептида и способствует их агрегации. При большом содержании  $NaCl$  имеет место избыток ионов  $Na^+$  в дисперсионной среде, что вызывает рост положительного  $\zeta$ -потенциала.

Стехиометричные комплексы РЖК–агар при  $Z_C = 0.8 \text{ г}_A/\text{г}_{РЖК}$  и  $pH_{nat}$  несут слабый отрицательный заряд (см. кривую 4 на Рис. 6б) за счет остатков *Asp* и *Glu* желатина. Введение  $NaCl$  вызывает агрегацию частиц комплексов и рост  $R$  от 1300 нм при  $I = 0$  до 7200 нм при 1 мМ  $NaCl$  (см. кривую 3 на Рис. 7а), благодаря экранированию ионами  $Na^+$  отрицательных зарядов *Asp* и *Glu* на макромолекулах РЖК и уменьшению, таким образом, электростатического отталкивания. При этом  $\zeta$ -потенциал сначала резко уходит в отрицательную область от –0.83 мВ ( $I = 0$ ) до –5.77 мВ (0.05 мМ  $NaCl$ ), затем вновь приближается к 0 вплоть до –0.86 мВ при 1 мМ  $NaCl$  (см. кривую 3 на Рис. 7б). Первоначальное понижение  $\zeta$  может быть вызвано избытком  $Cl^-$  в растворе при связывании  $Na^+$  комплексами, дальнейшее экранирование отрицательных зарядов комплексов приводит к повышению  $\zeta$ .

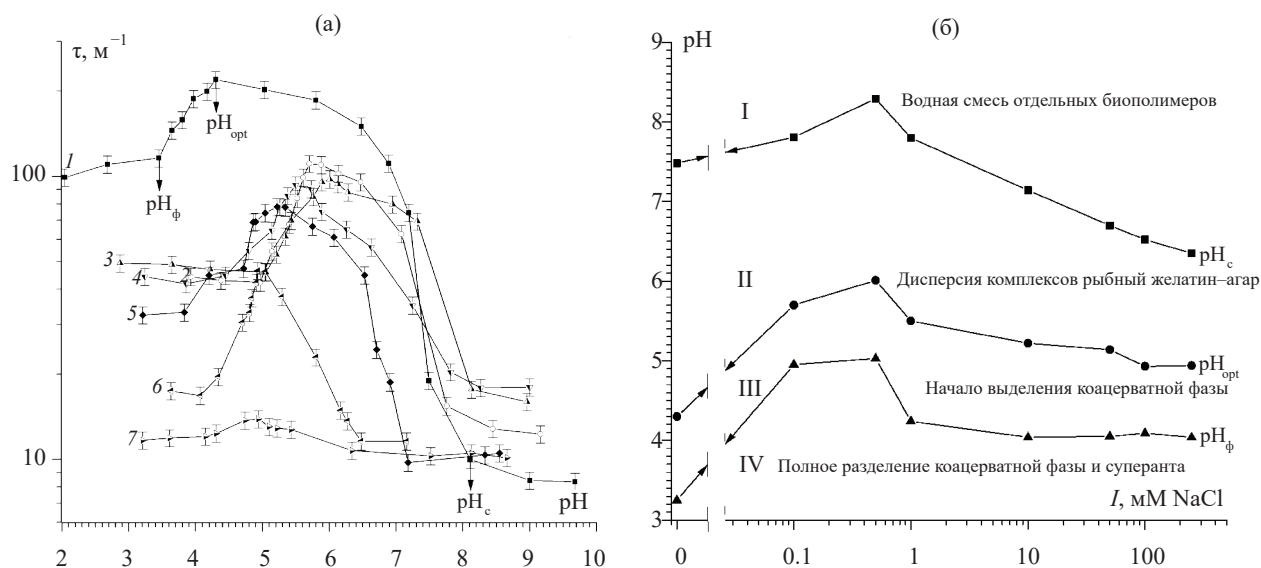
При последующем увеличении  $I$  ( $> 1 \text{ мМ } NaCl$ ) происходит уменьшение  $R$  и  $\zeta$ -потенциала комплексов (соответственно до 2100 нм и –18.7 мВ при 200 мМ  $NaCl$ ). Это связано с подавлением электростатических взаимодействий желатин–агар при больших значениях  $I$ , поскольку происходит экранирование не только остатков *Asp* и *Glu* желатина ионами  $Na^+$ , но также и положительных остатков *His*, *Arg* и *Lys* ионами  $Cl^-$ . Также возрастает отрицательный заряд комплексов за счет нескомпенсированных сульфогрупп агара (комплексы становятся нестехиометричными), что приводит к усилению электростатического отталкивания. Кроме того, уменьшение  $R$  связано с оттоком воды из комплексов при больших значениях  $I$ .

Ожидаемо, что ионная сила среды будет оказывать сильное влияние на общий вид кривых  $\tau(pH)$  при постоянном биополимерном составе водной смеси. На Рис. 8а представлены зависимости  $\tau(pH)$  для массового соотношения агар/РЖК  $Z_C = 0.8$  без  $NaCl$  и с добавками соли разной концентрации. Видно, что увеличение  $I$  приводит к смещению характеристических значений  $pH_C$ ,  $pH_{opt}$  и  $pH_{\phi}$  (показаны для кривой 1), соответствующих границам областей на фазовой диаграмме системы. При наибольшем рассмотренном значении  $I$  (250 мМ  $NaCl$ ) наблюдается падение мутности при  $pH_{opt}$  и  $pH_{\phi}$  примерно на порядок от первоначальных значений (при  $I = 0$ ) с существенным «выравниванием»





**Рис. 7.** Зависимость среднего радиуса  $R$  (а) и  $\zeta$ -потенциала (б) частиц агара  $C_A = 0.08\%$  (1), РЖК (2) и комплексов РЖК-агар при  $Z = 0.8 \text{ г}_A/\text{г}_{\text{РЖК}}$  (3) от ионной силы  $I$  среды.  $R$  определен методом КУЛСР.  $C_{\text{РЖК}} = 0.1\%$ ,  $23^\circ\text{C}$ .  
**Fig. 7.** Dependences of (a) average radius  $R$  and (b)  $\zeta$ -potential on medium ionic strength  $I$  for particles of (1) agar,  $C_A = 0.08\%$ ; (2) CFG; and (3) CFG-agar complexes at  $Z = 0.8 \text{ г}_A/\text{г}_{\text{CFG}}$ .  $R$  has been determined by the QELS method.  $C_{\text{CFG}} = 0.1\%$ ,  $23^\circ\text{C}$ .



**Рис. 8.** (а) Зависимость мутности  $\tau$  водных смесей РЖК-агар без добавок NaCl (1) и с различным значением ионной силы  $I$ , mM NaCl: 0.1 (2), 0.5 (3), 1.0 (4), 10 (5), 100 (6), 250 (7) от pH среды. (б) Фазовая диаграмма  $\text{pH}(I)$  водных смесей агара и РЖК.  $C_{\text{РЖК}} = 0.2\%$ ,  $Z = 0.8 \text{ г}_A/\text{г}_{\text{РЖК}}$ ,  $\lambda = 500 \text{ нм}$ ,  $23^\circ\text{C}$ .  
**Fig. 8.** (a) Dependences of turbidity  $\tau$  on medium pH for aqueous CFG-agar mixtures (1) without NaCl additives and with different ionic strength values  $I$ , mM NaCl: 0.1 (2), 0.5 (3), 1.0 (4), 10 (5), 100 (6), 250 (7). (b) The  $\text{pH}(I)$  phase diagram of aqueous agar-CFG mixtures.  $C_{\text{FG}} = 0.2\%$ ,  $Z = 0.8 \text{ г}_A/\text{г}_{\text{CFG}}$ ,  $\lambda = 500 \text{ нм}$ ,  $23^\circ\text{C}$ .

кривой  $\tau(\text{pH})$  (кривая 7), что объясняется значительным подавлением электростатических взаимодействий РЖК-агар.

Анализ кривых  $\tau(\text{pH})$  при разных значениях  $I$  для соотношения  $Z = 0.8 \text{ г}_A/\text{г}_{\text{РЖК}}$  позволил построить фазовую диаграмму  $\text{pH}(I)$  (см. Рис. 8б).

Из фазовой диаграммы видно, что введение соли в небольших количествах (до 0.5 mM NaCl) расширяет область полного разделения коацерватной фазы РЖК-агар и супернатанта (область IV на диаграмме), и сдвигает верхние границы областей IV, III, II в сторону больших значений pH. Таким образом,



небольшое количество NaCl оказывает противодействие подавлению комплексообразования в щелочной области pH. При дальнейшем увеличении  $I$  ( $> 0.5$  mM NaCl) соль, наоборот, начинает подавлять электростатическое притяжение РЖК–агар, усиливая влияние щелочи (KOH), что приводит к расширению границ области  $I$ , в которой комплексы не формируются.

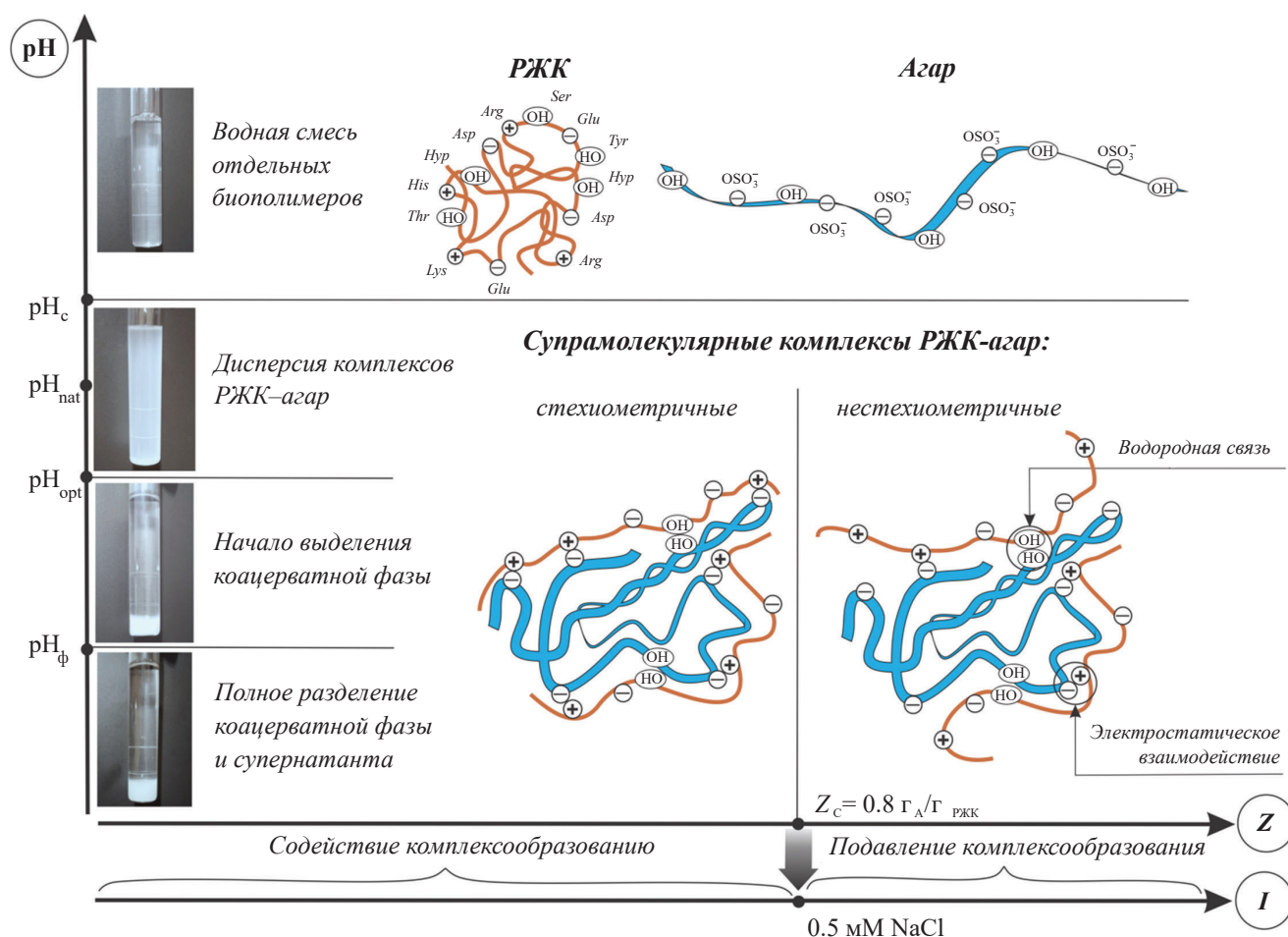
Итак, количество NaCl, наиболее благоприятствующее комплексообразованию РЖК–агар в условиях нашего эксперимента, лежит в пределах 0.5–1 mM. Похожее влияние NaCl на электростатические взаимодействия между двумя противоположно заряженными биополимерами было рассмотрено для водных смесей: БЖК–агар [27] и РЖК–альгинат натрия [21]. При этом улучшение комплексообразования белок–полисахарид при малых количествах соли и ухудшение при больших было объяснено с позиций уменьшения Дебаевской длины заряженных биополимеров под действием ионов соли.

Фазовое состояние исследованных водных смесей РЖК–агар наглядно представлено на Рис. 9 в виде

результатирующей схемы в зависимости от соотношения биополимеров  $Z$ , pH и ионной силы  $I$ . Показаны области, в которых комплексы не формируются, и система существует в виде смеси отдельных не связанных друг с другом биополимеров, а также – области формирования стехиометричных и нестехиометричных комплексов без выделения коацерватной фазы и с выделением коацерватов. Продемонстрированы фотографии систем в соответствующих фазовых состояниях. При фиксированном значении  $Z = Z_C$  (0.8 г<sub>А</sub>/г<sub>РЖК</sub>) показаны области значений  $I$ , при которых добавка NaCl оказывает содействие или подавляет комплексообразование.

### 5. Микроструктура гелей

Формирование комплексов рыбный желатин–агар оказывает существенное воздействие на микроструктуру гелей, образованных при охлаждении водных смесей биополимеров. Наглядно это продемонстрировано при сравнении морфологии структур ксерогелей рыбного желатина РЖК и смеси РЖК с агаром при

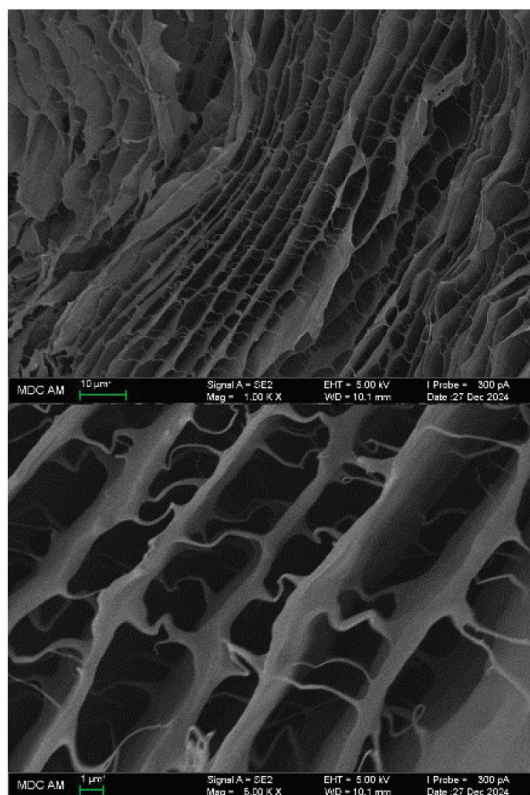


**Рис. 9.** Результирующая схема фазового состояния водных смесей РЖК–агар при 23°C в зависимости от соотношения биополимеров  $Z$ , pH и ионной силы  $I$ .

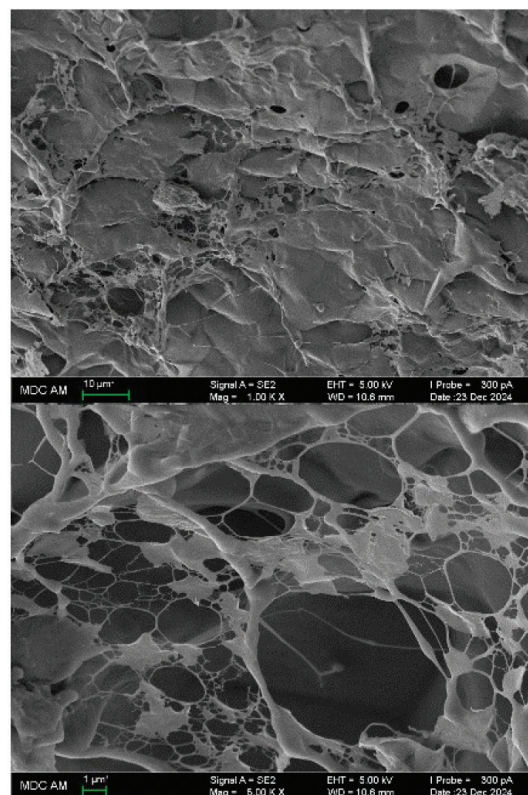
**Fig. 9.** The resulting scheme of the phase state of aqueous CFG–agar mixtures at 23°C as depending on the ratio  $Z$  of biopolymers, pH, and ionic strength  $I$ .



(a)



(б)



**Рис. 10.** Микрофотографии СЭМ ксерогелей: РЖК (а) и смеси РЖК–агар с массовым соотношением  $Z = 0.8 \text{ г}_A/\text{г}_{\text{РЖК}}$  (б).  
**Fig. 10.** SEM micrographs of xerogels: CFG (a) and CFG–agar mixture with mass ratio  $Z = 0.8 \text{ g}_A/\text{g}_{\text{CFG}}$  (b).

$Z = 0.8 \text{ г}_A/\text{г}_{\text{РЖК}}$ , представленных на микрофотографиях СЭМ (Рис. 10). При выбранном значении  $Z = Z_C$  в водной смеси РЖК и агара при  $\text{pH}_{\text{nat}}$  формируются стехиометричные комплексы (см. кривую 2 на Рис. 2).

Структура ксерогелей РЖК четко упорядочена (см. Рис. 10а). Структурные ячейки имеют вытянутую форму, расположены параллельно друг другу, их средний размер составляет  $(2.1 \pm 1.7) \text{ мкм}$ . При добавлении агара на поверхности желатиновой структуры формируется тонкая мембраноподобная пленка, содержащая локальные участки с повышенной плотностью (см. Рис. 10б). Под этой пленкой просматриваются стандартные ячейки, размер которых уменьшился по сравнению с исходным желатиновым образцом до среднего размера  $(254.1 \pm 184.0) \text{ нм}$ .

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрено формирование супрамолекулярных комплексов в водной смеси рыбного желатина и агара. Были использованы два образца рыбного желатина (РЖК и РЖЭ), отличающиеся по содержанию аминокислотных остатков. Описано влияние ряда факторов – массового соотношения  $Z$  биополимеров,  $\text{pH}$ , ионной силы  $I$  – на размер и  $\zeta$ -потенциал частиц, а следовательно, и на фазовое состояние водной смеси

рыбного желатина с агаром. Показано, что верхняя граница формирования стехиометричных комплексов для смесей РЖК–агар лежит при меньшем значении «критического» массового соотношения  $Z_C$ , чем для РЖЭ–агар, что объясняется большим содержанием протонированных остатков  $\text{Lys}$  в РЖЭ по сравнению с РЖК. По этой же причине частицы РЖЭ–агар имеют большие размеры в объеме водной дисперсии по сравнению с РЖК–агар при одинаковых значениях  $Z$ .

Определены характеристические значения  $\text{pH}_C$ ,  $\text{pH}_{\text{opt}}$ ,  $\text{pH}_\Phi$  и построены фазовые диаграммы водных смесей РЖК–агар в координатах  $\text{pH}(Z)$  в диапазоне  $Z$  от 0.1 до  $1.2 \text{ г}_A/\text{г}_{\text{РЖК}}$  и  $\text{pH}(I)$  при  $Z_C$  в диапазоне  $I$  от 0.1 до  $250 \text{ мМ NaCl}$ . Показано, что при «естественных» значениях  $\text{pH}$  исследуемые системы являются дисперсиями комплексов без выделения коацерватной фазы. Движение в кислую область приводит к выделению из дисперсии коацерватов, приводящему в итоге к полному разделению коацерватной фазы и супернатанта. Движение же в щелочную область вызывает разрушение комплексов, приводя систему к состоянию однофазного раствора отдельных не связанных биополимеров. Ионная сила при малых значениях (до  $0.5\text{--}1 \text{ мМ NaCl}$ ) противодействует подавлению комплексообразования в щелочной области  $\text{pH}$ . Однако дальнейшее увеличение содержания соли



в растворе, напротив, усиливает влияние щелочи, еще сильнее препятствуя комплексообразованию.

Показано, что формирование комплексов рыбный желатин–агар в водной смеси биополимеров существенно меняет микроструктуру геля рыбного желатина, образованного при охлаждении жидкой дисперсии.

Полученные результаты могут принести практическую пользу в отраслях, связанных со здоровьем и питанием человека, где требуется создавать условия для получения устойчивых белок–полисахаридных комплексов или, напротив, для их скорейшего разрушения. В частности, это может быть актуально при разработке

пищевых упаковочных пленок, пищевых эмульгаторов и желирующих агентов, а также — средств капсулирования и адресной доставки биологически-активных добавок в организм. В последнем случае исследованные в работе водные смеси (коллоидные растворы) рыбного желатина и агара рассматриваются как прекурсоры гидрогелей, формирующихся при охлаждении данных смесей. Настоящая работа будет продолжена исследованиями физико-химических характеристик комплексных гидрогелей рыбный желатин–агар, а также разработкой технологических рекомендаций для прикладного использования исследованных систем.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калинина М.А., Вацадзе С.З. Коллоидная химия супрамолекулярных систем в современном ландшафте российской науки // Коллоидный журнал. 2022. Т. 84. № 5. С. 499–502.  
<https://doi.org/10.31857/S0023291222600341>
2. Zueva O.S., Rukhlov V.S., Zuev Yu.F. Morphology of ionic micelles as studied by numerical solution of the Poisson equation // ACS Omega. 2022. V. 7. № 7. P. 6174–6183.  
<https://doi.org/10.1021/acsomega.1c06665>
3. Миргалеев Г.М., Шилова С.В. Связывание флуоресцеина хитозаном и полиэлектролитным комплексом на его основе в водных растворах // Коллоидный журнал. 2024. Т. 86. №3. С. 379–389.  
<https://doi.org/10.31857/S0023291224030074>
4. Деркач С.Р., Воронько Н.Г., Маклакова А.А., Кондратюк Ю.В. Реологические свойства гелей желатины с  $\kappa$ -каррагинаном: роль полисахарида // Коллоидный журнал. 2014. Т. 76. № 2. С. 164–170.  
<http://doi.org/10.7868/S0023291214020025>
5. Pathak J., Rawat K., Priyadarshini E., Bohidar H.B. Complex coacervation in charge complementary biopolymers: Electrostatic versus surface patch binding // Advances in Colloid and Interface Science. 2017. V. 250. P. 40–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.10.006>  
Кокшаров С.А., Алеева С.В., Лепилова О.В., Кричевский Г.Е., Фидоровская Ю.С. Свойства гидроколлоидов альгината натрия при сорбционном связывании папаина // Коллоидный журнал. 2021. Т. 83. № 6. С. 560–675.  
<https://doi.org/10.31857/S0023291221060070>
6. Кокшаров С.А., Лепилова О.В., Алеева С.В. и др. Влияние гидродинамических условий синтеза коллоидной системы альгинат натрия–папаин на сорбционные свойства биокомпозита // Коллоидный журнал. 2023. Т. 85. № 4. С. 511–525.  
<https://doi.org/10.31857/S0023291223600244>
7. Turgeon S.L., Laneuville S.I. Protein + polysaccharide coacervates and complexes: From scientific back-ground to their application as functional ingredients in food products // In: Modern biopolymer science. Kasapis S., Norton I.T., Ubbink J.B. Eds. London: Academic Press. 2009. P. 327–363.  
<http://doi.org/10.1016/B978-0-12-374195-0.00011-2>
8. Semenova, M. Protein–polysaccharide associative interactions in the design of tailor-made colloidal particles // Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2017. V. 28. P. 15–21.  
<https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.12.003>
9. Antipin I.S., Alifimov M.V., Arslanov V.V., et al. Functional supramolecular systems: design and application // Russian Chemical Reviews. 2021. V. 90. № 8. P. 895–1107.  
<https://doi.org/10.1070/rcr5011>
10. Li H., Wang T., Hu Y., Wu J., Van der Meeren P. Designing delivery systems for functional ingredients by protein/polysaccharide interactions // Trends in Food Science & Technology. 2022. V. 119. P. 272–287.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.007>
11. Falsafi S.R., Rostamabadi H., Sambroska K., et al. Protein-polysaccharide interactions for the fabrication of bioactive-loaded nanocarriers: Chemical conjugates and physical complexes // Pharmacological Research. 2022. V. 178. № 15. P. 106164.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106164>



12. Zhang L., Liang R., Li L. The interaction between anionic polysaccharides and legume protein and their influence mechanism on emulsion stability // *Food Hydrocolloids*. 2022. V. 131. P. 107814. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107814>
13. Cheng C., Tu Z., Wang H. pH-induced complex coacervation of fish gelatin and carboxylated chitosan: Phase behavior and structural properties // *Food Research International*. 2023. V. 167. P. 112652. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112652>
14. Xue H., Feng J., Tang Y., et al. Research progress on the interaction of the polyphenol–protein–polysaccharide ternary systems // *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2024. V. 11. № 1. P. 95. <https://doi.org/10.1186/s40538-024-00632-7>
15. Gentile L. Protein–polysaccharide interactions and aggregates in food formulations // *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2020. V. 48. P. 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.03.002>
16. Sun X., Wang H., Li S., et al. Maillard-type protein–polysaccharide conjugates and electrostatic protein–polysaccharide complexes as delivery vehicles for food bioactive ingredients: Formation, types, and applications // *Gels*. 2022. V. 8. № 2. P. 1–27. <https://doi.org/10.3390/gels8020135>
17. Wang H., Lin X., Zhu J., et al. Encapsulation of lutein in gelatin type A/B–chitosan systems via tunable chains and bonds from tweens: Thermal stability, rheologic property and food 2D/3D printability // *Food Research International*. 2023. V. 173. № 1. P. 113392. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113392>
18. Xue J., Luo Y. Protein–polysaccharide nanocomplexes as nanocarriers for delivery of curcumin: a comprehensive review on preparation methods and encapsulation mechanisms // *Journal of Future Foods*. 2023. V. 3. № 2. P. 99–114. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.12.002>
19. Li Y., Cheng Z., Zhang J., et al. Effect of protein–polysaccharide hybrid gelator system on the material properties and 3D extrusion printability of mashed potatoes // *Journal of Food Science*. 2024. V. 89. № 4. P. 2347–2358. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.17003>
20. Razzak M.A., Kim M., Chung D. Elucidation of aqueous interactions between fish gelatin and sodium alginate // *Carbohydrate polymers*. 2016. V. 148. P. 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.035>
21. Phawaphuthanon N., Yu D., Ngamnikom P., Shin I.-S., Chung D. Effect of fish gelatin–sodium alginate interactions on foam formation and stability // *Food Hydrocolloids*. 2019. V. 88. P. 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.041>
22. Zhang J., Du H., Ma N., et al. Effect of ionic strength and mixing ratio on complex coacervation of soy protein isolate/*Flammulina velutipes* polysaccharide // *Food Science and Human Wellness*. 2022. V. 12. № 1. P. 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.07.006>
23. Kolotova D.S., Borovinskaya E.V., Bordiyan V.V., et al. Phase behavior of aqueous mixtures of sodium alginate with fish gelatin: Effects of pH and ionic strength // *Polymers*. 2023. V. 15. № 10. P. 2253. <https://doi.org/10.3390/polym15102253>
24. Tong L., Kang X., Fang Q., et al. Rheological properties and interactions of fish gelatin– $\kappa$ -carrageenan polyelectrolyte hydrogels: The effects of salt // *Journal of Texture Studies*. 2021. V. 53. № 1. P. 122–132. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12624>
25. Voron'ko N.G., Derkach S.R., Vovk M.A., Tolstoy P.M. Formation of  $\kappa$ -carrageenan–gelatin polyelectrolyte complexes studied by  $^1\text{H}$  NMR, UV spectroscopy and kinematic viscosity measurements // *Carbohydrate Polymers*. 2016. V. 151. P. 1152–1161. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.060>
26. Boral S., Bohidar H.B. Effect of ionic strength on surface-selective patch binding-induced phase separation and coacervation in similarly charged gelatin–agar molecular systems // *The Journal of Physical Chemistry*. 2010. V. 114. № 37. P. 12027–12035. <https://doi.org/10.1021/jp105431t>
27. Pathak J., Rawat K., Bohidar H.B. Surface patch binding and mesophase separation in biopolymeric polyelectrolyte–polyampholyte solutions // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014. V. 63. P. 29–37. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.020>
28. Roy S., Rhim J.-W. Gelatin/agar-based functional film integrated with Pickering emulsion of clove essential oil stabilized with nanocellulose for active packaging applications // *Colloids and Surfaces A*. 2021. V. 627. P. 127220. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127220>



29. Du L., Ru Y., Weng H., et al. Agar-gelatin Maillard conjugates used for Pickering emulsion stabilization // Carbohydrate Polymers. 2024. V. 340. № 4. P. 122293.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122293>
30. Mendoza-Wilson A.M., Balandran-Quintana R.R., Azamar-Barrios J.A., Cabellos J.L. Effects of adding sorghum procyanidins on the structure, molecular interactions, and thermal properties of agar-glycerol-gelatin films // Journal of Computational Biophysics and Chemistry. 2024. V. 23. № 5. P. 605–622.  
<https://doi.org/10.1142/S2737416524500078>
31. Isik I., Yenipazar H., Saygün A., et al. Aloe vera oil-added agar gelatin edible films for kashar cheese packaging // ACS Omega. 2023. V. 8. № 21. P. 18516–18522.  
<https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00147>
32. Fathiraja P., Gopalrajan S., Kumar K., Obaiah M.C. Augmentation of bioactivity with addition of clove essential oil into fish scale gelatin, agar and chitosan composite film and biodegradable features // Polymer Bulletin. 2024. V. 81. № 6. P. 5329–5357.  
<https://doi.org/10.1007/s00289-023-04961-9>
33. Boonprab K., Chirapat A., Effendy W.N.A. Edible-algae base composite film containing gelatin for food packaging from macroalgae, Gracilaroid (*Gracilaria fisheri*) // Journal of The Science of Food and Agriculture. 2024. V. 104. № 11. P. 6987–7001.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.13531>
34. Kim H.-J., Roy S., Rhim J.-W. Gelatin/agar-based color-indicator film integrated with *Clitoria ternatea* flower anthocyanin and zinc oxide nanoparticles for monitoring freshness of shrimp // Food Hydrocolloids. 2022. V. 124. P. 107294.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107294>
35. How Y. H., Wong L. X., Kong I., Nyam K.L., Pui L.P. Development of multilayered pH-sensitive chitosan–gelatin–agar intelligent film incorporated with roselle anthocyanin extract for monitoring of the freshness of snapper fish // Food and Bioprocess Technology. 2024. V. 17. № 11. P. 4177–4194.  
<https://doi.org/10.1007/s11947-024-03377-1>
36. Garcia-Orue I., Santos-Vizcaino E., Uranga J., et al. Agar/gelatin hydro-film containing EGF and Aloe vera for effective wound healing // Journal of Materials Chemistry B. 2023. V. 11. № 29. P. 6896–6910.  
<http://doi.org/10.1039/D2TB02796H>
37. Razuidi D.A.A., Mahat M., Sofian Z.M., et al. Synthesis and characterization of porous, electro-conductive chitosan–gelatin–agar-based PEDOT: PSS scaffolds for potential use in tissue engineering // Polymers. 2021. V. 13. № 17. P. 2901.  
<https://doi.org/10.3390/polym13172901>
38. Zhou X., Yu J., Qian S., Chen Y. Study on texture detection of gelatin-agar composite gel based on bionic chewing // Journal of Food Measurement and Characterization. 2023. V. 17. № 2. P. 5093–5102.  
<https://doi.org/10.1007/s11694-023-02016-1>
39. González-Maldonado J., Ramírez-Valverde G., Rangel-Santos R., et al. Ram semen quality after supplementation with gelatin, agar or alginate prior to cooling storage // Reproduction in Domestic Animals. 2023. V. 58. № 10. P. 1487–1493.  
<https://doi.org/10.1111/rda.14463>
40. Haug I.J., Draget K.I. Gelatin // In: Handbook of hydrocolloids. Phillips G.O., Williams P.A. Eds. Boca Raton, Boston, New York, Washington DC: CRC Press. 2009. P. 142–163.  
<https://doi.org/10.1533/9781845695873.142>
41. Derkach S.R., Voron'ko N.G., Kuchina Yu.A., Kolotova D.S. Modified fish gelatin as an alternative to mammalian gelatin in modern food technologies // Polymers. 2020. V. 12. № 12. P. 3051.  
<http://doi.org/10.3390/polym12123051>
42. Joy J.M., Padmaprakashan A., Pradeep A., et al. A review on fish skin-derived gelatin: elucidating the gelatin peptides – preparation, bioactivity, mechanistic insights, and strategies for stability improvement // Foods. 2024. V. 13. № 17. P. 2793.  
<https://doi.org/10.3390/foods13172793>
43. Derkach S.R., Voron'ko N.G., Kuchina Yu.A., et al. Rheological properties of fish and mammalian gelatin hydrogels as basis for potential practical formulation // Gels. 2024. V. 10. № 8. P. 486.  
<https://doi.org/10.3390/gels10080486>
44. Oliveira V. de M., Assis C.R.D., Costa B. de A.M., et al. Physical, biochemical, densitometric and spectroscopic techniques for characterization collagen from alternative sources: A review based on the sustainable valorization of aquatic by-products // Journal of Molecular Structure. 2021. V. 1224. P. 129023.  
<http://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129023>



45. *Da Silva C.G., Rodrigues A.S., Lima A.C., et al.* Gelatin extracted from jundiá skin (*Rhamdia quelen*): An alternative to the discarded by-product // *Food Research International*. 2022. V. 161. P. 111829. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111829>
46. *Shi X.-D., Huang J.-J., Wu J.-L., et al.* Fabrication, interaction mechanism, functional properties, and applications of fish gelatin-polysaccharide composites: A review // *Food Hydrocolloids*. 2021. V. 122. № 15. P. 107106. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107106>
47. *Armisen R., Galatas F.* Agar // In: *Handbook of hydrocolloids*. Phillips G.O., Williams P.A. Eds. Boca Raton, Boston, New York, Washington DC: CRC Press. 2009. P. 82–107. <https://doi.org/10.1533/9781845695873.82>
48. *Usov A.I.* Polysaccharides of the red algae // *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. 2011. V. 65. P. 115–217. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385520-6.00004-2>
49. *Muthukumar J., Chidambaram R., Sukumaran S.* Sulfated polysaccharides and its commercial applications in food industries—a review // *Journal of Food Science and Technology*. 2020. V. 58. № 7. P. 2453–2466. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04837-0>
50. *Nishinari K., Fang Y.* Relation between structure and rheological/thermal properties of agar / A mini-review on the effect of alkali treatment and the role of agarpectin // *Food Structure*. 2017. V. 13. P. 24–34. <http://doi.org/10.1016/j.foostr.2016.10.003>
51. *Rochas C., Lahaye M., Yappe W.* Sulphate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy // *Botanica Marina*. 1986. V. XXIX. P. 335–340. <https://doi.org/10.1515/botm.1986.29.4.335>
52. *Derkach S.R., Kuchina Yu.A., Baryshnikov A.V., Kolotova D.S., & Voron'ko N.G.* Tailoring cod gelatin structure and physical properties with acid and alkaline extraction // *Polymers*. 2019. V. 11. № 10. P. 1724. <http://doi.org/10.3390/polym11101724>
53. *Zuev Yu.F., Derkach S.R., Bogdanova L.R., et al.* Underused marine resources: Sudden properties of cod skin gelatin gel // *Gels*. 2023. V. 9. № 12. P. 990. <https://doi.org/10.3390/gels9120990>
54. *Derkach S.R., Kolotova D.S., Voron'ko N.G., Obluchinskaya E.D., Malkin A.Ya.* Rheological properties of fish gelatin modified with Sodium alginate // *Polymers*. 2021. V. 13. № 5. P. 743. <http://doi.org/10.3390/polym13050743>
55. *Derkach S.R., Voron'ko N.G., Sokolan N.I., Kolotova D.S., Kuchina Yu.A.* Interactions between gelatin and sodium alginate: UV and FTIR studies // *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2020. V. 41. № 5. P. 690–698. <http://doi.org/10.1080/01932691.2019.1611437>
56. *Handbook of biochemistry and molecular biology*. Lundblad R.L., Macdonald F.M. Eds. Boca Raton. Boston. London. New York: CRC Press. 2010. <https://doi.org/10.1201/b21846>
57. *Handbook of chemistry and physics*. Lide D.R. Ed. Boca Raton: CRC Press LLC. 2004.