

УДК 541.64:547.995

ПОЛУЧЕНИЕ ХИТОЗАНА ИЗ ХИТИНСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ УЗБЕКИСТАНА И ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ

© 2024 г. Р. Ю. Милушева¹*, Г. Д. Ахымбетова¹, С. Ш. Рашидова¹

¹Институт химии и физики полимеров АН Республики Узбекистан, Ташкент, 100128 Узбекистан

* e-mail: rumilusheva@gmail.com

Поступила в редакцию 19.09.2023 г.

После доработки 02.11.2023 г.

Принята к публикации 05.11.2023 г.

Из отходов производства шелка выделен хитозан *Bombyx mori*, охарактеризован его химический состав, определена молекулярная масса и степень деацетилирования хитозана, исследованы антибактериальные и иммунологические свойства. Выявлено, что хитин и хитозан обладали антибактериальной активностью по отношению к *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Bacillus subtilis*. Хитозан *B. mori* обладал также способностью увеличивать иммунный отклик живой системы: повышал число клеток как в центральных (тимус, костный мозг), так и в периферических (лимфатические узлы) органах иммунитета у мышей. Впервые получен хитозан из гидробионтов Аральского моря — цист *Artemia parthenogenetica*, исследован его состав и основные физико-химические характеристики. ИК-спектроскопические и рентгенологические исследования хитозана из цист *Artemia parthenogenetica* показали его чистоту. Определена молекулярная масса — 89 кДа и растворимость — 81.62%.

Ключевые слова: хитозан, *Bombyx mori*, отходы производства шелка, *Artemia parthenogenetica*, биологическая, иммунологическая активность

DOI: 10.31857/S0555109924020063 EDN: GAGJUR

В настоящее время вопросам рационального использования природных ресурсов и выделения из них природных полимеров, к которым относятся полисахариды и их производные, уделяется особое внимание. Хитин — один из наиболее распространенных в природе полисахаридов. Ежегодный биосинтез хитина превышает 100 млрд т. Синтез хитина происходит в особых клеточных органеллах (хитосомах) с участием фермента хитинсинтазы путем последовательного переноса остатков N-ацетил-D-глюкозамина из уридиндифосфат-N-ацетил-D-глюкозамина на растущую полимерную цепь [1].

Получаемый из хитина хитозан и его производные обладают бактерицидными, антибактериальными, противораковыми и противовирусными эффектами, включая способность индуцировать агрегацию эритроцитов, способствовать активации тромбоцитов, активировать системы комплемента и др. [2–4]. Хитозан и его производные могут широко использоваться в качестве нетоксичных или малотоксичных антибактериальных материалов [5, 6]. Антибактериальные материалы можно отнести к новому классу функциональных материалов, способных подавлять микробный рост [7]. В качестве сырья для производства хитина (ХТ) и хитозана (ХЗ) используют отходы промышленных панцирных ракообразных, однако существуют ограниченные объемы их вылова.

В Узбекистане традиционно развито производство шелка, поэтому отходы его переработки — куколки тутового шелкопряда (КТШ) *Bombyx mori* — могут также быть источником для выделения природного полисахарида ХТ, модификацией которого можно синтезировать не менее востребованный ХЗ. Это тем более актуально, поскольку речь идет о таких отходах возобновляемого местного сырья, которые накапливаются в достаточных количествах (10000–15000 т в год) после переработки натурального шелка. В КТШ *Bombyx mori* содержится до 50–53% белков, 18–25% жировых веществ, помимо этого покров куколки состоит из ХТ, из которого в дальнейшем можно синтезировать ХЗ [8, 9]. Химический состав ХТ, выделяемого из КТШ *Bombyx mori*, в значительной степени зависит от зрелости личинок и полноценного формирования хитинового покрова, жесткости химической обработки при отделении шелкового волокна кокона от куколки, сорта гренны и т.д.

Актуальность исследований по синтезу и модификации новых природных полимеров привела к поиску новых сырьевых источников, в частности в регионе Аральского моря. Однако Аральское море как среда обитания гидробионтов значительно изменилось в последние годы: изменился ионный состав воды, резко повысилась соленость, уменьшилось поступление биогенных элементов.

Начиная с 2000 г. на Аральском море проводились широкомасштабные акклиматизационные работы по направленному формированию фауны беспозвоночных, которые увенчались успехом. Акклиматизанты заняли ведущие места в зоопланктоне (*Artemia parthenogenetica*, *Calanipeda aquaedulcis*) и зообентосе (*Nereis diversicolor* и *Syndosmya segmentum*). Причем по мере осолонения моря их доля в общей биомассе зоопланктона и зообентоса постоянно увеличивается [10, 11]. Среди беспозвоночных, представленных в соленых водоемах Приаралья, вид *A. parthenogenetica* становится сейчас доминантным в зоопланктоне вследствие высокой минерализации водной среды. Рачки *A. parthenogenetica* стали практически единственным, успешно размножающимся видом в Аральском море, запасы которого в настоящее время достигают промысловых объемов.

Особую ценность представляют цисты, которые содержат высокий уровень полноценного белка, весь комплекс незаменимых аминокислот, водорастворимых витаминов, легкоусвояемых липидов, полиненасыщенных жирных кислот, макро- и микроэлементов, стимуляторов роста, антиоксидантов [12], что позволит создать широкий ассортимент биопродуктов.

Благодаря высоким адаптационным свойствам *A. parthenogenetica* динамично меняет свой биохимический состав в зависимости от места обитания, качества пищи и времени сбора.

Цель исследования — подбор оптимальных условий выделения ХТ и синтеза ХЗ, сравнительное исследование химического состава выделяемого ХТ из двух различных источников (традиционного и вновь обнаруженного) и синтезированного ХЗ, а также исследование их биологической и иммунологической активности.

МЕТОДИКА

Хитинсодержащее сырье обрабатывалось по стандартным методикам [13, 14]. В качестве сырья для получения ХЗ использовали КТШ *Bombyx mori*, которые не содержали посторонних примесей, имели влажность 2–3%. Кондиционная масса КТШ, взятых для проведения работы, составляла 1.066 кг.

Выделение хитина и синтез хитозана *Bombyx mori*. КШТ (100 г) обрабатывали 1.0%-ным раствором NaOH (1000 мл) при постоянном перемешивании и температуре 60°C, выдерживали в течение 3–4 ч. ХТ отделяли фильтрованием через стеклянный фильтр (размер пор 125–130 мкм), промывали дистиллированной водой до pH 7.0 и высушивали на воздухе до постоянной массы.

Для получения ХЗ использовали гетерогенное деацетилирование концентрированной 30–50%-ной щелочью NaOH. Соотношение твердой фазы

к раствору составляло 1 : 10, процесс осуществляли при температуре 120–130°C в течение 180 мин. Далее реакционную смесь промывали водой до нейтральной pH. Полученный продукт центрифугировали и высушивали при температуре 90–100°C. В зависимости от температуры и длительности процесса получали ХЗ различной молекулярной массы и СДА.

Выделение хитина и получение хитозана *A. parthenogenetica*. Для выделения ХТ использовали цисты *A. parthenogenetica*, измельченные до 40 мкм с влажностью 8–10%. Депротеинизацию сырья осуществляли путем обработки 3–4%-ным раствором NaOH при температуре 90–100°C и постоянном перемешивании в течение 3 ч. Деминерализацию осуществляли путем обработки 1.0 М раствором соляной кислоты при постоянном перемешивании в течение 2–4 ч при комнатной температуре.

Синтез ХЗ *A. parthenogenetica* осуществляли по той же методике, которую использовали для получения ХЗ *Bombyx mori*.

Очистка хитозана. Очистку ХЗ проводили по разработанной методике, которая заключалась в предварительном растворении ХЗ в 2%-ной уксусной кислоте, коагуляции и осаждении хитозана из раствора NaOH при pH 8–9, промывке водой и спиртом-ректификатом, центрифугировании и лиофильной сушке образца [15].

Для определения молекулярной массы готовили 0.5%-ный раствор ХЗ в 0.33 М ацетатном буферном растворе, pH 3.7. Молекулярную массу рассчитывали по формуле Марка–Куна–Хаувинка [16]:

$$M\eta = ([\eta] / K)^{1/\alpha},$$

где $K = 1.4 \times 10^{-4}$ и $\alpha = 0.83$.

Степень деацетилирования (СДА) образцов определяли кондуктометрическим титрованием на приборе “Mettler-Toledo AG” (“Analytical CH-8603 Schwerzenbach”, Швейцария) с использованием в качестве титранта 0.1 М раствора NaOH для ХЗ, растворенного в 0.1 М растворе HCl, и рассчитывали по формуле [17]:

$$\text{СД} = \frac{203 \times N_{\text{am}}}{1400 + 42N_{\text{am}}} \times 100\%,$$

где N_{am} — содержание аминного азота.

Определение зольности проводили по следующей методике. Навеску образца (0.1–0.5 г) помещали в предварительно прокаленный и взвешенный фарфоровый тигель, который осторожно нагревали до 500°C. Сожжение образца проводили до постоянной массы. По окончании сжигания тигель охлаждали в эксикаторе и взвешивали. Зольность образца (Z) вычисляли по формуле:

$$Z(\%) = m \times 100 / g,$$

где m — масса вещества после сожжения, г; g — навеска образца, г [18].

Для определения растворимости ХЗ в стеклянную колбу вносили навеску образца (0.1–0.5 г), добавляли 100 мл 2%-ной CH_3COOH и перемешивали до полного его растворения. Затем рабочий раствор отфильтровывали через фильтр Шотта и высушивали при 104°C в течение 2 ч [19].

Растворимость (P) определяли по формуле:

$$P (\%) = [(g - m)/g] \times 100,$$

где g — навеска вещества, г; m — количество вещества на фильтре, г.

ИК-спектроскопические исследования проводили на ИК-Фурье-спектрометре “Inventio-S” (“Bruker”, Германия) в диапазоне от 500 до 4000 cm^{-1} со спектральным разрешением 2 cm^{-1} . Образцы готовили в виде таблеток с КВг под давлением $7 \times 10^8 \text{ Па}$.

Рентгенографические исследования проводили на приборе “Miniflex 600” (“Rigaku”, Япония) с монокроматизированным $\text{Cu-K}\alpha$ -излучением. Содержание общего азота в ХТ и ХЗ определяли методом Дюма [20] путем сжигания навески в кварцевой трубке в атмосфере двуокиси углерода.

Определение антимикробной активности. Чувствительность микроорганизмов к хитину и хитозану определяли диско-диффузионным методом. Для исследования готовили свежие 18-часовые культуры микроорганизмов, относящиеся к грамположительным коккам, грамотрицательным бактериям и грибам. На поверхность подсушенной питательной среды Мюллер–Хинтона в чашке Петри вносили 1–2 мл исследуемой культуры (по стандарту мутности 1.0×10^6 клеток), равномерно распределяли, избыток удаляли пипеткой. Параллельно с этим в отдельных пенициллиновых флаконах готовили исследуемые растворы ХТ (растворитель — диметилацетамид с добавлением 3% LiCl) и ХЗ (растворитель — уксусная кислота) в концентрации 1–5–10 мг/мл. В качестве контроля использовали 2%-ную уксусную кислоту. После посева чашки Петри подсушивали при комнатной температуре в течение 10–15 мин, затем стерильным пинцетом подготовленные бумажные диски, пропитанные растворами ХЗ, выкладывали на поверхность питательной среды, засеянной определенной культурой (на чашку не более 6 дисков). Чашки ставили в термостат при температуре 37°C , инкубировали в течение 18–24 ч. По истечении срока инкубации оценивали результат, помещая чашки на темную матовую поверхность. С помощью специальной линейки измеряли диаметр зоны задержки роста микробов вокруг дисков, включая диаметр самих дисков с точностью до 1 мм. Использовали штаммы микроорганизмов из Национальной коллекции НИИ микробиологии, эпидемиологии и инфекционных болезней Минздрава

(Республики Узбекистан). Исследования проводили в Ташкентской медицинской академии.

Содержание лабораторных животных и обращение с ними осуществлялись в соответствии с требованиями положения “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей”.

Определение иммунологических и гематологических показателей в эксперименте. В качестве антигена использованы эритроциты барана (ЭБ), которые брали у животных из яремной вены в стерильные флаконы со стеклянными бусами. Перед иммунизацией их 2–3 раза центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об./мин и в дозе 2×10^7 вводили мышам однократно внутрибрюшинно.

В периферической крови иммунизированных мышей определяли титр антител к ЭБ, количество эритроцитов и лейкоцитов.

Статистическая обработка материала. Полученные данные подвергались статистической обработке с использованием прикладных программ статистического анализа MS Excel с вычислением среднеарифметической ошибки (M), среднего квадратичного отклонения (σ), стандартной ошибки (m), относительных величин (%). Статистическая значимость полученных измерений при сравнении средних величин определялась по критерию (t) Стьюдента. За статистически значимые изменения принимали уровень достоверности $p \pm 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение хитина и синтез хитозана из цист рачка *A. parthenogenetica* Аральского моря. В качестве сырья для получения ХЗ использовали цисты, для которых была использована модифицированная методика по выделению ХТ из КТШ *Bombyx mori*. Отличающим параметром для выделения ХТ из цист является стадия деминерализации сырья, так как, в отличие от КТШ, цисты довольно сильно минерализованы, поскольку это определялось соленостью водной среды Арала. Показано, что для получения однородных по свойствам ХТ и ХЗ требуются индивидуальные режимы обработки. Характеристики полученных образцов ХТ и ХЗ представлены в табл. 1.

Элементный анализ образцов выделенных ХТ показал, что содержание азота во всех образцах колебалось от 6.30 до 6.83%, что близко к теоретическим значениям и свидетельствовало о высокой степени чистоты полученных образцов. Содержание зольности в образцах ХТ и ХЗ, выделенных из цист *A. parthenogenetica*, незначительное, от 1.10 до 1.83% соответственно, что допустимо и соответствует данным, полученным при исследовании цист *Artemia sp.* [21], что также подтверждает факт получения достаточно чистых образцов ХТ и ХЗ.

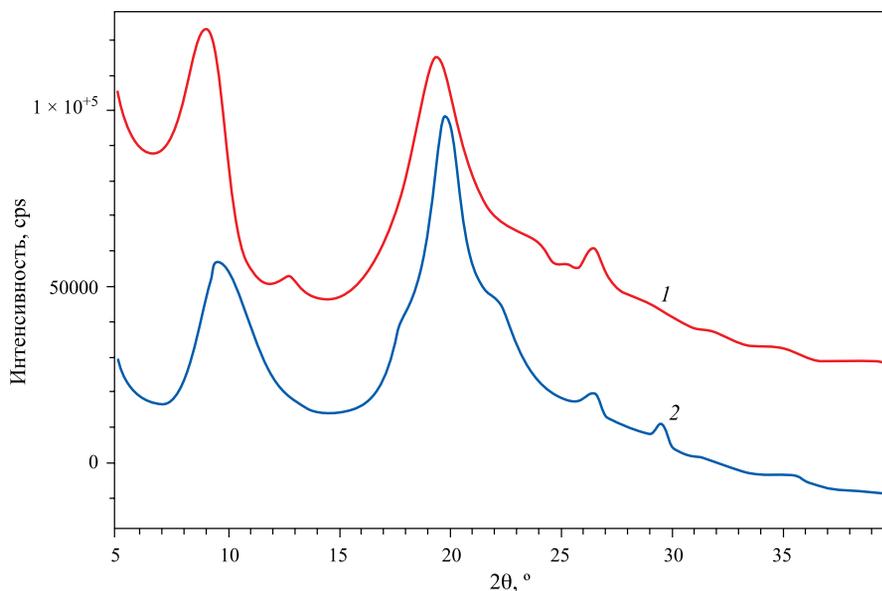


Рис. 1. Дифрактограммы хитина (1) и хитозана (2) из цист Аральского моря.

Как видно из табл. 1, по результатам элементного анализа полученные образцы ХЗ соответствуют показателям на ХЗ, отраженным в работе [14, 22]. Так, зольность в ХЗ из цист *A. parthenogenetia* Аральского моря составляет 1.83%, а содержание азота увеличилось до 8.28%, что также близко к теоретическим значениям содержания азота в ХЗ, получаемым из различных источников [1, 14]. Эти показатели свидетельствовали о достаточной чистоте полученных образцов, что зависело от условий его синтеза.

ХЗ из цист *A. parthenogenetia* характеризовался невысокой молекулярной массой 89 кДа, которая свидетельствовала о незавершенном формировании ХТ цист, степенью деацетилирования 72% и хорошей растворимостью — 81.62%, то есть в данных условиях возможно получение ХЗ с определенными характеристиками.

Рентгенофазный анализ образцов показал, что на дифрактограммах ХТ из цист наблюдались кристаллические рефлексы с максимумами при $2\theta = 9.5^\circ, 19.5^\circ$ в рассмотренном интервале углов рассеяния. Наиболее интенсивный максимум, наблюдаемый при $2\theta = 19.5^\circ$, относился к кристаллографическому рефлексу (110). Рентгенофазный анализ показал, что ХТ, выделенный из цист

A. parthenogenetia Аральского моря (рис. 1), существует в двух полиморфных модификациях, которые имеют различные кристаллические сингонии. Первая фаза — α -хитин с орторомбической сингонией — имеет параметры решетки: $a = 4.85 \text{ \AA}, b = 19.05 \text{ \AA}, c = 9.31 \text{ \AA}, \alpha = \beta = \gamma = 90.00^\circ$. Вторая фаза — β -хитин с параметрами решетки: $a = 9.55 \text{ \AA}, b = 2.98 \text{ \AA}, c = 10.41 \text{ \AA}, \alpha = \gamma = 90.00^\circ, \beta = 97.43^\circ$ обладает моноклинной сингонией. В образце ХТ, выделенного из цист, 65% кристаллической фазы имеет моноклинную сингонию, которая соответствует β -фазе, а 35% имеет орторомбическую сингонию, соответствующую α -фазе. Это подтверждает полиморфность образца хитина из цист.

Рентгенофазный анализ ХЗ из цист показал, что в образце существуют кристаллы с триклинной и моноклинной сингониями. ХЗ с триклинной сингонией имел параметры решетки: $a = 2.63 \text{ \AA}, b = 9.01 \text{ \AA}, c = 16.19 \text{ \AA}, \alpha = 75.80^\circ, \beta = 105.00^\circ, \gamma = 98.00^\circ$. Степень кристалличности при переходе ХТ в ХЗ уменьшалась, что хорошо согласовывалось с литературными данными [23, 24].

ИК-спектроскопические исследования ХТ, полученного из цист, выявили в спектре широкую полосу поглощения $3109\text{--}3600 \text{ см}^{-1}$ с максимумом в области 3444 см^{-1} за счет валентных колебаний

Таблица 1. Качественные характеристики хитина и хитозана из цист *A. Parthenogenetia* и *Bombyx mori*

Образец хитина, цвет	Влажность, %	Зольность, %	Содержание азота, %	Выход, %
Хитин из цист (темно-зеленый порошок)	8–10	1.10	6.30–6.83	3–10.5
Хитозан из цист (желтый порошок)	6.0 ± 0.8	1.83 ± 0.4	8.28	3.0 ± 0.8
Хитозан <i>Bombyx mori</i> технический (коричневый порошок)	9.47	4.20	8.15	—
Хитозан <i>Bombyx* mori</i> очищенный (светло-бежевый порошок)	10.55	2.01	8.52	66.0

*Показатели для очищенного хитозана обр. № 5.

межмолекулярных и внутримолекулярных связанных ОН-групп и симметричных колебаний N—H аминогрупп (рис. 2). Наблюдалась полоса поглощения при 1653 см^{-1} — амид I (валентные колебания C=O групп). Полоса поглощения при 1561 см^{-1} вызвана угловой деформацией N—H аминогруппы. Полосы 1075 и 1029 см^{-1} соответствуют валентным колебаниям групп C—O, то есть в ИК-спектре наблюдались все пики, характерные для ХТ, которые соответствуют литературным данным [25].

В ИК-спектре ХЗ выявлены валентные колебания CH—CH_2 -групп в области 2925 , 2923 и 2855 см^{-1} . Присутствовали также полоса поглощения в области 1658 см^{-1} , которую можно объяснить осевым растяжением связей C=O ацетамида (амид I), и полоса при 1596 см^{-1} — угловая деформация N—H аминогруппы (амид II), а также интенсивные полосы поглощения различных деформационных колебаний в области $1382\text{—}1200\text{ см}^{-1}$, то есть наблюдались все полосы поглощения, характерные для ХЗ.

При изучении качественного состава цист артемии Аральского моря было обнаружено, что в них содержались основные виды макро- и микронутриентов: белки — до 49%, липиды — до 16%, углеводы — до 30%, водорастворимые витамины — В₁, В₂, РР, В₆, С, микроэлементы в достаточно большом количестве, а также эссенциальные макроэлементы — К, Са, Mg, Na, Р [26]. Такой исходный состав источника сырья может служить предпосылкой для создания в дальнейшем производства

нутрицевтиков и БАДов в экологически кризисных зонах Приаралья.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что получены ХТ и ХЗ достаточной степени чистоты из нового источника — цист *A. parthenogenetia* Аральского моря, исследованы физико-химические свойства образцов. Использование нового сырья в качестве источника ХТ позволит увеличить производство этого природного биополимера и его производных и расширить ассортимент используемого сырья. Получение биологически активных природных полимеров из отходов переработки шелка, обладающих ценными функциональными свойствами, является востребованным для Узбекистана. Отходы — куколки тутового шелкопряда (КТШ) — представляют природный композит из хитина, липидов и белка и составляют около 50% от массы коконной оболочки. При производстве шелка волокнистые отходы используют на 30%, а куколки практически не используют. Поэтому в данной работе приводятся исследования по получению ХЗ из КТШ и исследование его физико-химических и биологических свойств.

Выделение хитина и синтез хитозана из КТШ *Bombyx mori*. Для получения ХЗ из КТШ необходимо было последовательно отделить белковую и минеральную составляющие сырья, перевести их в растворимое состояние и удалить [8]. ХТ и ХЗ выделяли из КТШ путем очистки и переработки исходного сырья, что позволило выявить наиболее общие и важные параметры при получении ХТ и ХЗ.

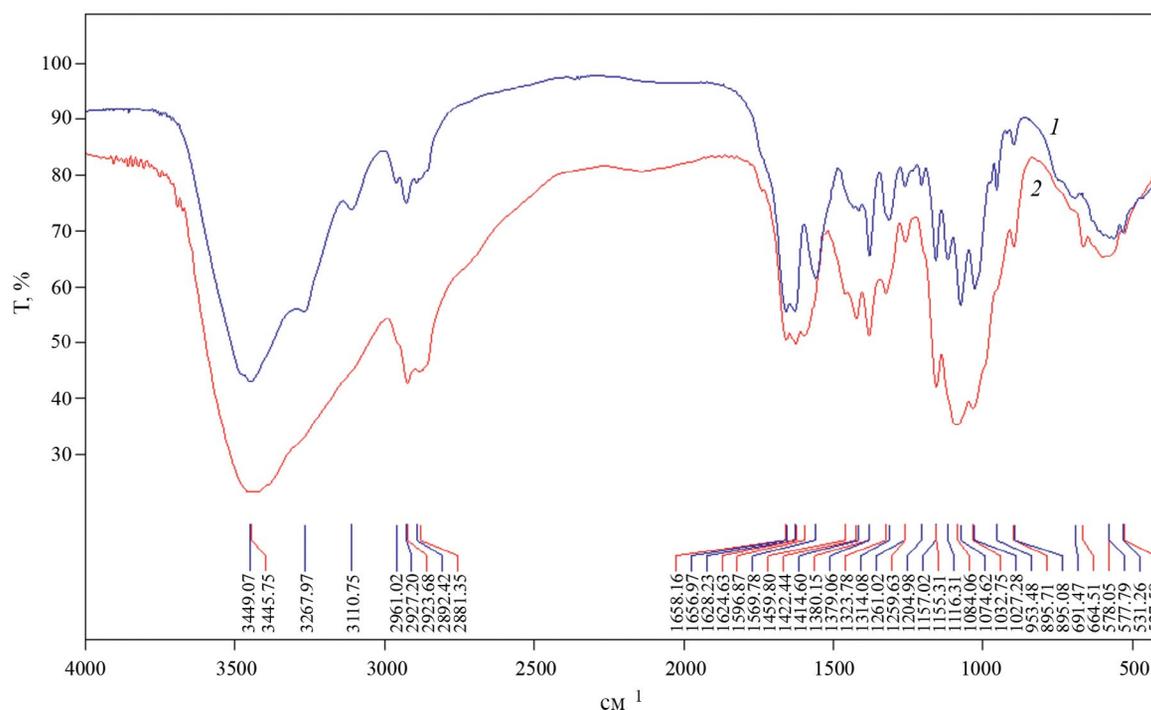


Рис. 2. ИК-спектры: ХТ (1) и ХЗ (2) из цист Аральского моря.

Процесс щелочного деацетилирования имел ряд особенностей. Высокая устойчивость ХТ к деацетилированию объясняется наличием водородной связи между карбонильной группой и азотом амидной группы [27]. Для разрушения этой прочной связи процесс вели при повышенной температуре. С увеличением температуры степень деацетилирования достигала предельного значения, но при этом снижалась молекулярная масса, поэтому для каждого вида сырья подбирались индивидуальные режимы при сохранении общепринятых принципов. При проведении синтеза при 120°С СДА и ММ полученных образцов ХЗ составляли 95% и 100 кДа соответственно (табл. 2).

Изучено влияние температуры и времени реакции, а также концентрации щелочи на молекулярные характеристики ХЗ. Показано, что увеличение концентрации щелочи в диапазоне 35–50% обуславливало увеличение степени деацетилирования ХЗ от 60 до 95%, увеличение времени реакции с 90 до 180 мин приводило к снижению молекулярной массы от 115 до 100 кДа.

Было изучено влияние температуры реакции на молекулярную массу и скорость деацетилирования полученного ХЗ. Обнаружено, что значительное уменьшение молекулярной массы и приведенной вязкости ХЗ происходит с повышением температуры реакции, что свидетельствовало о частичной деструкции ХЗ. Однако при высокой температуре происходило ускорение реакции деацетилирования, при этом содержание общего азота и свободных аминокрупп увеличивалось (табл. 3).

Результаты показали, что присутствие 50%-ного NaOH, продолжительность реакции 3 ч и температура 120°С являются оптимальными параметрами для проведения реакции деацетилирования ХТ и получения ХЗ из КТШ с высокой степенью деацетилирования. Полисахарид ХЗ характеризовался химической неоднородностью, широким молекулярно-массовым распределением и содержал небольшое количество минеральных примесей. Для дальнейшего использования необходимо было провести очистку ХЗ от примесей последовательным растворением технического хитозана

Таблица 2. Влияние условий реакции на свойства хитозана *B. mori* (соотношение ХТ : NaOH = 1 : 10, температура 120°С)

Условия деацетилирования хитина		Физико-химические свойства хитозана			
NaOH, %	Время, мин	N, %	СДА, %	NH ₂ , %	Молекулярная масса, кДа
50	180	8.5	95	7.4	100
50	120	8.2	87	7.10	110
50	90	7.4	66	4.2	115
40	180	8.0	70	5.6	130
40	120	7.2	67	4.8	140
30	180	6.8	60	4.1	125

Таблица 3. Характеристики хитозана, полученного при различных температурах проведения реакции деацетилирования хитина (соотношение ХТ : NaOH = 1 : 10, продолжительность реакции 180 мин)

Температура, °С	NH ₂ , %	Общий азот, %	СДА, %	[η], г/дл	ММ, кДа
120	7.10	8.20	87	2.20	110
100	6.60	7.95	83	2.24	116
85	4.96	6.52	76	2.80	151
60	4.20	6.50	66	2.90	160

Таблица 4. Физико-химические характеристики очищенного ХЗ из отходов производства шелка

Показатель	Технический хитозан	Очищенный хитозан, №				
		1	2	3	4	5
Содержание азота, %	8.15	8.28	8.48	8.35	8.49	8.52
Растворимость в 2%-ной CH ₃ COOH, %	78.50	96.70	98.37	98.22	98.83	98.85
Зольность, %	4.20	2.13	1.79	1.43	1.61	2.01
Влажность, %	9.47	11.85	11.17	10.78	10.34	10.55
СДА, %	70.50	77.20	88.30	81.10	88.80	90.50
ММ, кДа	140	135	127	120	125	109
Выход, %	—	62.5	65.8	63.7	67.2	66.0

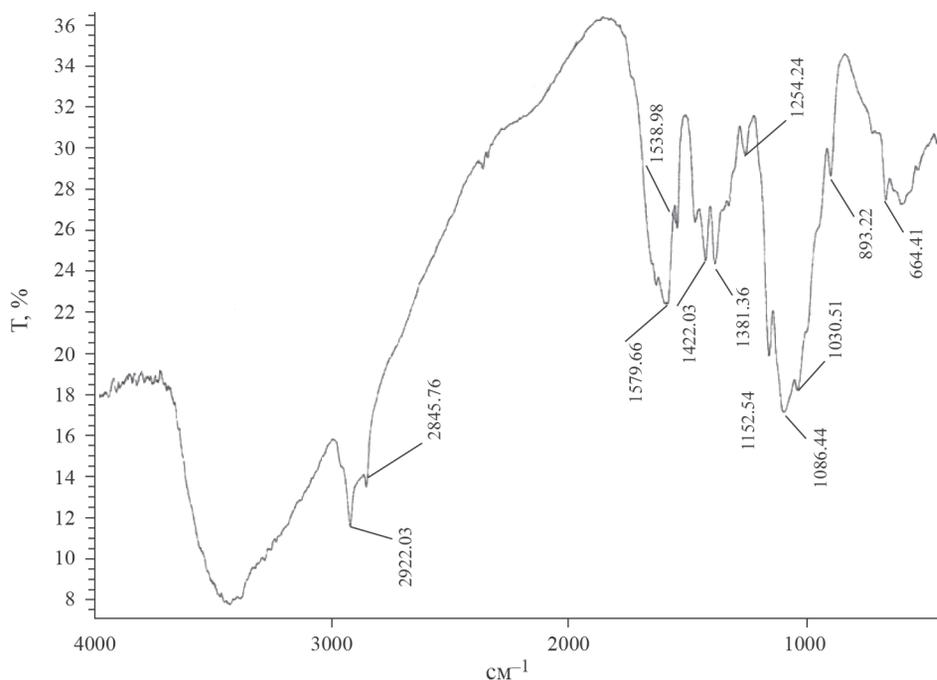


Рис. 3. ИК-спектр хитозана *B. mori*.

в 2%-ной уксусной кислоте и осаждением 0.5 N NaOH при pH 8–9, промывкой до pH 7 и лиофильной сушкой. При проведении очистки было получено пять образцов ХЗ (табл. 4). Очищенный ХЗ имел размер частиц 0.2–0.6 мм и выход 62–67%, pH 1%-ной водной суспензии полученных образцов хитозана не более 7.5. Содержание азота и растворимость полученных образцов достигало 8.28–8.52 и 96.7–98.85% соответственно. Уменьшение зольности образцов с 4.2 до 1.43–2.13% также

свидетельствовало об увеличении чистоты образца. Степень деацетилирования очищенных образцов ХЗ всех партий составляла 77–90%, молекулярная масса колебалась в пределах 109–135 кДа. Условия проведения очистки хитозана принципиально не различались, поэтому все партии полученного ХЗ имели близкие показатели. Однако, в зависимости от СДА, наблюдались небольшие различия по растворимости и молекулярной массе образцов. Очевидно, на эти параметры повлияло время,

Таблица 5. Антимикробная активность хитина *B. mori*

Вид	Контроль – ДМАА	Хитин		
		0.5%	1.0%	2.0%
<i>S. aureus</i> , № 2000, рег.004870	8.0 ± 0.3	8.0 ± 0.2	10.0 ± 0.1	13.0 ± 0.1
<i>S. epidermidis</i> , № 12, рег.004705	8.0 ± 0.1	15.0 ± 0.3	18.0 ± 0.2	24.0 ± 0.5
<i>S. saprofiticus</i> , № 121, рег.002771	0	13.0 ± 0.1	14.0 ± 0.2	18.0 ± 0.2
<i>E. coli</i> ЛП, № 051, рег.002839	10.0 ± 0.2	10.0 ± 0.1	20.0 ± 0.4	25.0 ± 0.5
<i>P. vulgaris</i> , № 49, рег.005047	0	10.0 ± 0.2	16.0 ± 0.2	18.0 ± 0.2
<i>P. aerogenosa</i> , № 237, рег.003480	0	5.0 ± 0.1	5.0 ± 0.1	8.0 ± 0.1
<i>C. albicans</i> , № 10, рег.003848	0	0	0	5.0 ± 0.1
<i>B. subtilis</i> , № В-1, рег.003591	0	10.0 ± 0.2	7.0 ± 0.1	5.0 ± 0.1

Примечание: зоны задержки роста представлены в мм.

необходимое для коагуляции очищенного ХЗ. Для дальнейших исследований использовали образец очищенного хитозана № 5 с ММ 109 кДА, СДА 90.5% и растворимостью 98.85%.

Получение ХЗ из ХТ было доказано данными ИК-спектроскопии и элементного анализа. В ИК-спектре ХЗ присутствуют характерные полосы поглощения при волновых числах 3450, 2923 и 2845 см⁻¹, соответствующие валентным колебаниям ОН-, NH- и СН-, СН₂-групп (рис. 3).

Выраженные полосы поглощения при 1579 и 1422 см⁻¹ соответствуют деформационным колебаниям NH-, CN-, CO- и СН-, СН₂-групп. Полосы поглощения, характеризующие СО-, СОС-эфирные связи, наблюдаются при 1152 и 1086 см⁻¹, также имеются полосы поглощения маятникового колебания СН₂-групп при 664 см⁻¹.

Выделенная масса ХТ с минеральными примесями составляла около 20% от общей массы отходов.

Антибактериальная активность — это одно из первых биологических свойств, которые были обнаружены у ХЗ. Исследованиями последних лет было установлено, что природные биополимеры, такие как ХЗ, стимулируют клеточный метаболизм и в первую очередь активируют функции клеток иммунной системы [28]. Широкий спектр действия препаратов объясняется тем, что роль полисахаридов заключается не столько в прямом воздействии на пораженный участок, сколько в локальной активации защитных ресурсов организма.

Полученный хитозан с молекулярной массой (ММ) 109 × 10³ Да и степенью деацетилирования (СДА) 90.5% испытывали на способность подавлять различные штаммы микроорганизмов, относящиеся к грамположительным коккам *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus subtilis*, к грамотрицательным бактериям: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, грибам *Candida albicans*. Результаты изучения антибактериальной активности

ХТ и ХЗ *Bombyx morino* по отношению к различным штаммам микроорганизмов приведены в табл. 6 и 7.

Показано, что ХТ оказал довольно выраженное действие в концентрации 0.5% на микробные культуры, такие как *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. pyogenes*, *E. coli* и *P. vulgaris*. Интересно отметить, что с увеличением концентрации этого полимерного препарата от 1 до 2% антибактериальное действие его достоверно возросло (табл. 5).

Испытание ХЗ в концентрациях 1.0 и 0.5% показало, что этот препарат в повышенной концентрации оказывался еще более эффективным, чем ХТ, так как к нему оказались чувствительными почти все группы микроорганизмов (табл. 6).

Из табл. 6 видно, что антибактериальная активность ХЗ имела тенденцию с повышением концентрации усиливать степень их воздействия и расширять спектр подавляемых микробов. Так, если в концентрации 0.5% ХЗ был активен по отношению к *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* и *S. pyogenes*, то при повышении концентрации до 1.0% он стал активным ко всей группе стафилококков, грамотрицательным микроорганизмам *E. coli*, *P. aeruginosa* и к грибам *C. albicans*. ХЗ *Bombyx mori* проявлял антимикробную активность и оказывал бактерицидное действие как на грамотрицательные, так и грамположительные бактерии. Одним из положительных действий ХЗ является его антистафилококковое воздействие, что, безусловно, важно при лечении гнойно-воспалительных заболеваний, так как стафилококк занимает ведущее место в этиологии гнойных заболеваний.

Механизм действия природных полисахаридов на центральные и периферические органы иммунитета, кроветворные стволовые клетки, иммунную систему в целом еще недостаточно изучен. Решение этих вопросов позволит разработать новые высокоэффективные лекарственные препараты как для лечения, так и для профилактики различных состояний.

Было изучено влияние ХЗ на иммунологические показатели: количество клеток в центральных

Таблица 6. Антимикробное действие ХЗ *B.mori* по отношению к различным культурам

Вид	Контроль — CH ₃ COOH	Хитозан	
		1.0%-ный раствор	0.5%-ный раствор
<i>S. aureus</i> , № 2000, пер.004870	8.0 ± 0.3	20.0 ± 0.3	10.0 ± 0.1
<i>S. epidermidis</i> , № 12, пер.004705	8.0 ± 0.1	25.0 ± 0.5	18.0 ± 0.2
<i>S. saprophyticus</i> , № 121, пер.002771	0	20.0 ± 0.4	15.0 ± 0.2
<i>E. coli</i> ЛП, № 051, пер.002839	10.0 ± 0.1	12.0 ± 0.2	8.0 ± 0.1
<i>P. vulgaris</i> , № 49, пер.005047	0	15.0 ± 0.2	8.0 ± 0.1
<i>P. aeruginosa</i> , № 237, пер.003480	0	10.0 ± 0.1	8.0 ± 0.1
<i>C. albicans</i> , № 10, пер.003848	0	15.0 ± 0.2	7.0 ± 0.1
<i>B. subtilis</i> , № В-1, пер.003591	0	10.0 ± 0.2	7.0 ± 0.1

Примечание: зоны задержки роста представлены в мм.

Таблица 7. Влияние ХЗ *V. mori* на количество клеток в центральных и периферических органах иммунитета у мышей ($M \pm m$, $n = 6$)

Группа	Доза, мг/кг	Клетки Тимуса, $\times 10^6$	ИС*	Клетки костного мозга, $\times 10^6$	ИС*	Клетки лимф. узлов, $\times 10^6$	ИС*
Контроль	—	42.2 ± 2.1	—	9.7 ± 0.4	—	26.7 ± 1.5	—
Хитозан	100.0	39.3 ± 2.1	-1.07	18.8 ± 0.5	+1.94	26.3 ± 1.4	-1.02

*ИС — отношение экспериментальных данных к контролю.

Таблица 8. Влияние ХЗ *V. mori* на количество эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови у мышей

Группа	Доза, мг/кг	Эритроциты, $\times 10^9$ /мл	ИС	Лейкоциты, $\times 10^6$ /мл	ИС
Контроль	—	4.9 ± 0.1	—	6.8 ± 0.2	—
Хитозан	100.0	$7.1 \pm 0.2^*$	+1.45	$9.4 \pm 0.3^*$	+1.38

Примечание: ИС — отношение экспериментальных данных к контролю.

и периферических органах иммунитета, количество эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови у мышей (табл. 7).

Под воздействием ХЗ число костномозговых клеток достоверно повышается в 1.94 раза ($18.8 \pm 0.5 \times 10^6$). ХЗ, не влияя на число клеток в тимусе, почти в 2 раза повышает число клеток в костном мозге (табл. 7). Определено также влияние ХЗ на количество эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови у мышей (табл. 8). При использовании препарата уровень эритроцитов и лейкоцитов в крови мышей значительно повысился: ХЗ в 1.45 раза повышает число эритроцитов и в 1.38 раза — число лейкоцитов.

На основании полученных данных можно сделать заключение, что ХЗ обладал иммуностимулирующими свойствами, поскольку при его использовании происходило повышение числа клеток как в костном мозге, так и увеличение количества лейкоцитов и эритроцитов в периферической крови.

Изучены оптимальные условия выделения ценных природных биополимеров: ХЗ из цист *A. parthenogenetia* Аральского моря и из КТШ *Bombyx mori*. Получен ХЗ из цист *A. parthenogenetia* с молекулярной массой 89 кДа, степенью деацетилирования 72% и растворимостью 81.62%. Показано, что возможно выделение ХЗ из КТШ достаточной степени чистоты с различной молекулярной массой и СДА в зависимости от условий синтеза и степени очистки. ХЗ из КТШ имеет более высокую молекулярную массу 100–160 кДа, высокую СДА — до 90% и растворимость 88%. Методами ИК-спектроскопии, рентгеноструктурного и элементного анализа показана чистота выделяемого ХЗ из различных источников. У ХТ из цист *A. parthenogenetia* Аральского моря наблюдается два типа модификации α и β с соответствующими сингониями, что подтверждает его полиморфную структуру.

Показана антибактериальная активность ХЗ *V. mori*, которая имеет тенденцию с повышением концентрации расширять спектр подавляемых бактерий и оказывать бактерицидное действие как на грамотрицательные, так и грамположительные бактерии. ХЗ *V. mori* оказывал иммуностимулирующее воздействие на живые организмы, что позволяет рекомендовать препараты на основе ХЗ для укрепления иммунитета.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Работа выполнена за счет средств бюджета института (Институт химии и физики полимеров АН РУз, Узбекистан). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. Содержание лабораторных животных и обращение с ними осуществлялись в соответствии с требованиями положения “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” и законодательством и принятыми нормативами АН РУз, Узбекистан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хитозан / Под ред. К. Г. Скрябин, С. Н. Михайлов, В. П. Варламов. М.: Центр Биоинженерия РАН, 2013. 593 с.
2. Caracciolo G., Vali H., Moore A., Mahmoudi M. // Nano Today. 2019. V. 27. № 6. P. 10. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2019.06.001>
3. Sheik S., Nagaraja G. K.; Chandrashekar K. R. // Mater. Today Proc. 2018. V. 5. № 10. P. 21011–21017.
4. Wang W., Meng Q., Li Q., Liu J., Zhou M., Jin Z., Zhao K. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 2. P. 487. <https://doi.org/10.3390/ijms21020487>

5. *Belbekhouche S., Bousserhine N., Alphonse V., Le Floch F., Charif Mechiche Y., Menidjel I., Carbonnier B.* // *Colloids Surf. B*. 2019. V. 181. P. 158–165.
6. *Le-Vinh B., Minh N., Le N., Nazir I., Matuszczak B., Bernkop-Schnürch A.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 133. P. 647–655.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.081>
7. *Wang W., Meng Q., Li Q., Liu J., Zhou M., Jin Z., Zhao K.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 487.
<https://doi.org/10.3390/ijms21020487>
8. *Рашидова С. Ш., Милушева Р. Ю.* Хитин и хитозан *Bombyx mori*. Синтез, свойства и применение. Ташкент: ФАН, 2009. 246 с.
9. *Милушева Р. Ю., Авазова О. Б., Рашидова С. Ш.* Белок из куколок тутового шелкопряда *Bombyx mori* L. Выделение, свойства, применение. Ташкент: ФАН, 2020. 216 с.
10. *Mirabdullayev I., Abdullaeva L., Musaev A., Zholdasova I., Mustafaeva Z., Jumaniezova N.* // *Geophysical Research Abstracts*. 2007. V. 9. P. 772.
11. *Aladin N. V., Plotnikov I. S.* // *Proceedings of the Zoological Institute RAS*. 2008. V. 312 № 1–2. P. 145–154.
12. *Rudneva I. I.* *Artemia/Prospects for Use in the National Economy*. Kiev: Naukova Dumka, 1991. С. 6–23.
13. *Ravikumar N. V.* // *Reactive and Functional Polymers*. 2000. V. 46. P. 1–27.
14. *Muzzarelli R. A.A.* The Discovery of Chitin. In: *Chitosan in Pharmacy and Chemistry* / Ed. R.A.A Muzzarelli, C. Muzzarelli. Italy: Atec., 2002. P. 1–8.
15. *Милушева Р. Ю., Пирнязов К. К., Рашидова С. Ш.* // *Вестник Тверского гос. ун-та. Серия: Химия*. 2016. № 2. С.119–124.
16. *Gamzazade A. I., Shlimak B. M., Sklyar A. M., Stykova E. V., Pavlova S. A., Rogozin S. V.* // *Acta. Polym.* 1985. V. 36. № 8. P. 421–424.
17. *Погодина Н. В., Павлов Г. М., Бунин С. В., Меньшиков А. В.* // *Высокомолек. соединения*. 1986. № 28. С. 232–239.
18. *Государственная фармакопея СССР*. 2012. XI. М: Медицина, Т. 2. С. 24.
19. *Государственная фармакопея СССР*. 1987. XI. М: Медицина, Т. 1. С. 175.
20. *Климова В. А.* Основные микрометоды анализа органических соединений. Москва: Химия, 2001. 75 с.
21. *Литвиненко Л. И., Бойко Е. Г.* // *Биология внутренних вод*. 2008. № 1. С. 40–48.
22. *Bansal V., Sharma P. K., Sharma N.* // *Adv. Biol. Res.* 2011. V. 5. № 1. P. 28–37.
23. *Rinaudo M.* // *Progress in Polymer Science*. 2006. V. 31. P. 603–632.
24. *Kumar M. R., Muzzarelli R. A. A., Muzzarelli C., Sashiva H., Domb A. J.* // *Chemical Reviews*. 2004. V. 104. P. 6017–6084.
25. *Югай С. М., Шахобутдинов С. Ш., Атаханов А. А., Рашидова С. Ш.* // *Химический журнал Казахстана*. 2019. Т. 67. № 3. С. 254–265.
26. *Хажибоев К. Г. Бердимбетова Г. Е., Карлыбаева Б. П., Ощепкова Ю. И.* // *Universum: химия и биология: электрон. научн. журн*. 2019. № 9. С. 63.
<http://7universum.com/ru/nature/archive/item/7769>
27. *Ильина А. В., Варламов В. П., Ермаков Ю. А.* // *Докл. Академии наук*. 2008. Т. 421. № 2. С. 199–201.
28. *Chen Y. M., Chung Y. C., Wang L. W., Chen K. T., Li S. Y.* // *J. Environ. Sci. Health A*. 2002. V. 37. P. 1379.

Obtaining Chitosan from Chitine-Containing Uzbekistan Raw Materials and Research of Antimicrobial Properties

R. Yu. Milusheva^{a, *}, G. D. Akhymbetova^a, and S. Sh. Rashidova^a

^a*Institute of Polymer Chemistry and Physics of Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, 100128 Uzbekistan,*

^{*}*e-mail: rumilusheva@gmail.com*

The optimal conditions for the isolation of valuable natural biopolymers were revealed. chitosan from cysts of *Artemia parthenogenetia* in the Aral Sea and from pupae of the silkworm *Bombyx mori*. Chitosan (Chs) was obtained from cysts of *A. parthenogenetia* with a molecular weight of 89 kDa, degree of deacetylation (DDA) — 72% and solubility — 81.62%. It has been shown that it is possible to isolate Chs from silkworm pupae of sufficient purity with different molecular weights and DDA depending on the synthesis conditions and the degree of purification. *Bombyx mori* Chs has a higher molecular weight of 100–160 kDa, a high DDA — up to 90% and a solubility of 88%. IR spectroscopy, X-ray diffraction and elemental analysis have shown the purity of the isolated Chs from various sources. In chitin from *A. parthenogenetia* cysts of the Aral Sea, two types of modifications α and β with corresponding syngonies are observed, which confirms its polymorphic structure. The antibacterial activity of *B. mori* Chs has been shown, which tends to expand the spectrum of suppressed bacteria with increasing concentration and have a bactericidal effect on both gram-negative and gram-positive bacteria. Chs *B. mori* had an immunostimulating effect on living organisms, which allows us to recommend drugs based on Chs to strengthen the immune system.

Keywords: chitosan, *Bombyx mori*, silk production waste, *Artemia parthenogenetica*, biological, immunological activity