

March 2024

ENVIRONMENTALLY SAFE PRODUCTS BASED ON PROTEIN AND CHITOSAN BOMBYX MORI

Rakiya MILUSHEVA

Institute of Polymer Chemistry and Physics, Tashkent, Uzbekistan, rumilusheva@gmail.com

Sayyera RASHIDOVA

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

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

Recommended Citation

MILUSHEVA, Rakiya and RASHIDOVA, Sayyera (2024) "ENVIRONMENTALLY SAFE PRODUCTS BASED ON PROTEIN AND CHITOSAN BOMBYX MORI," *CHEMISTRY AND CHEMICAL ENGINEERING*: Vol. 2023: No. 1, Article 10.

DOI: 10.34920/cce2023110

Available at: <https://cce.researchcommons.org/journal/vol2023/iss1/10>

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

ENVIRONMENTALLY SAFE PRODUCTS BASED ON PROTEIN AND CHITOSAN *BOMBYX MORI*

Rakiya MILUSHEVA (rumilusheva@gmail.com),
Sayyera RASHIDOVA (polymer@academy.uz)
Institute of Polymer Chemistry and Physics, Tashkent, Uzbekistan

The aim of the study is to obtain polymolecular complexes based on chitosan and Bombyx mori protein. To obtain complexes, protein and chitin are isolated from silk production waste, from which chitosan is synthesized. The optimal parameters for obtaining chitosan and protein determined: temperature, reaction time, concentration of components. The molecular weight and degree of deacetylation of chitosan determined, which are 95-140 kDa and 77-90%, respectively. The fact of the formation of protein and chitosan proved by IR spectroscopy and elemental analysis. The definition of amino acid analysis of the protein showed that 16 amino acids identified in the protein, nine of which are essential. Studies have been carried out on the antibacterial activity of the Bombyx mori protein to suppress various strains of microorganisms under in vitro conditions. We found that the Bombyx mori protein has a bactericidal effect on both gram-negative and gram-positive bacteria. Polymolecular protein-chitosan complexes obtained by potentiometric titration of protein solutions with chitosan. A technological scheme developed for obtaining complexes. The obtained complexes tested at the Research Institute for the Development of Fish Farming as part of compound feed. A preparation based on protein and chitosan Bombyx mori leads to increase of the fish survival, an increase of the growth rate of fish and a decrease of the feed coefficient.

Keywords: chitosan, protein, polymolecular complex, antibacterial activity, technology

ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ БЕЛКА И ХИТОЗАНА *BOMBYX MORI*

Ракия МИЛУШЕВА (rumilusheva@gmail.com),
Сайера РАШИДОВА (polymer@academy.uz)
Институт химии и физики полимеров, Ташкент, Узбекистан

Целью исследования является получение полимолекулярных комплексов на основе хитозана и белка Bombyx mori. Для получения комплексов из отходов производства шелка выделяются белок и хитин, из которого синтезируется хитозан. Определены оптимальные параметры получения хитозана и белка: температуры, времени реакции, концентрации компонентов. Определены молекулярная масса и степень деацетилирования хитозана, которые составляют 95-140 кДа и 77-90%, соответственно. Факт образования белка и хитозана доказан ИК спектроскопией и элементным анализом. Определение аминокислотного анализа белка показало, что в составе белка идентифицировано 16 аминокислот, девять из которых являются незаменимыми. Проведены исследования по антибактериальной активности белка Bombyx mori на подавление различных штаммов микроорганизмов в условиях in vitro. Выявлено, что белок Bombyx mori оказывает бактерицидное действие, как на грамотрицательные, так и грамположительные бактерии. Методом потенциометрического титрования растворов белка хитозаном получены полимолекулярные комплексы белок-хитозан. Разработана технологическая схема получения комплексов. Проведены испытания полученных комплексов в Научно-исследовательском Институте развития рыбководства в составе комбикормов. Показано, что при использовании препарата на основе белка и хитозана Bombyx mori, произошло увеличение выживаемости рыбы, увеличились темпы роста рыбы и снизился кормовой коэффициент.

Ключевые слова: хитозан, белок, полимолекулярный комплекс, антибактериальная активность, технология

PROTEIN VA XITOZAN *BOMBYX MORI* ASOSIDAGI EKOLOGIK XAVFSIZ MAHSULOTLAR

Rakiya MILUSHEVA (rumilusheva@gmail.com),
Sayyora RASHIDOVA (polymer@academy.Uz)
Polimerlar kimyosi va fizikasi instituti, Toshkent, O'zbekiston

Tadqiqotning maqsadi xitozan va Bombyx mori oqsili asosidagi polimolekulyar komplekslarni olishdan iborat. Komplekslarni olish uchun ipak ishlab chiqarish chiqindilaridan oqsil va xitin ajratib olinadi, undan xitozan sintez qilinadi. Xitozan va oqsil olishning optimal parametrlari: harorat, reaksiya vaqti, komponentlarning konsentratsiyasi aniqlandi. Xitozanning molekulyar og'irligi va deatsetillanish darajasi aniqlandi, ular mos ravishda 95-140 kDa va 77-90% ni tashkil qiladi. Oqsil va xitozan hosil bo'lganligi IQ spektroskopiyasi va elementlar tahlili tadqiqot usullari orqali isbotladi. Oqsilning aminokislotalar tahlilini aniqlash bo'yicha olib borilgan tadqiqotlar natijasiga ko'ra, oqsilda 16 hil aminokislotalar mavjud bo'lib, ulardan to'qqiztasi muhim ahamiyatga egadir. In vitro sharoitida mikroorganizmlarning turli shtammlarini bostirish xususiyatini o'rganish maqsadida Bombyx mori oqsilining antibakterial faolligini aniqlash bo'yicha tadqiqotlar olib borildi. Bombyx mori oqsili gramm-manfiy va gramm-musbat bakteriyalarga bakteritsid ta'sir ko'rsatishi aniqlandi. Oqsilli xitozan eritmalarini potentsiometrik titrlash usuli orqali polimolekulyar oqsil-xitozan komplekslari olindi. Komplekslarni olishning texnologik sxemasi ishlab chiqildi. Olingan komplekslar Baliqchilikni rivojlantirish ilmiy-tadqiqot institutida omuxta yem tarkibida sinovdan o'tkazildi. Bombyx mori oqsili va xitozan asosidagi preparatni qo'llash natijasida baliqlarning yashovchanligi, baliqlarning o'sish tezligining oshishi va oziqa koeffitsientining pasayishi ko'rsatildi.

Kalit so'zlar: xitozan, oqsil, polimolekulyar kompleks, antibakterial faollik, texnologiya

DOI: 10.34920/cee2023110

Введение

Основным ограничением развития новых, современных технологий в рыбоводстве является отсутствие кормов, прежде всего - продуктов животного происхождения с высоким содержанием протеина. В состав кормов, употребляемых в настоящее время на рынке Узбекистана, вводится белок, который закупается из-за рube-

жа. В основном это растительный белок, произведенный из аргентинской сои. В этом направлении особую перспективу для развития рыбоводства имеет животный белок из куколок тутового шелкопряда с высоким содержанием незаменимых аминокислот.

Использование местных видов сырья, которые являются отходами, ежегодно накаплива-

емыми в Республике в количестве 10-15 тыс. т при производстве шелка, позволит рационально использовать природные ресурсы и утилизировать отходы. Отходы - куколки тутового шелкопряда (КТШ) представляют природный композит из хитина, липидов и белка, содержание которого в куколках составляет до 50%.

К числу неоспоримых достоинств природных полимеров и белка относится также то, что их применение не вызывает загрязнения окружающей среды и не связано с использованием токсичных растворителей.

Хитозан считается перспективным биоматериалом будущего; интерес к нему связан с уникальными физиологическими и экологическими свойствами, такими как биосовместимость, биодеструкция, физиологическая активность при отсутствии токсичности, доступность сырьевых источников для его получения [1-3].

Применение биodeградирующего полимера позволяет осуществлять иммунологическую коррекцию, вызывая повышенную однородность по иммунологическому статусу у генетически гетерогенных видов рыб, что возможно снимет проблему повышения вирулентности возбудителя [4].

В литературе отсутствуют данные о препаратах на основе ХЗ и белка *Bombyx mori* и их использование для рыбоводства и других отраслей.

В основном проведены исследования по изучению свойств полимолекулярных комплексов хитозана с белками молочной сыворотки. Разработана технология выделения белка из молочной сыворотки с использованием коллоидного раствора хитозана и получения на его основе функционально-активных полимерных комплексов белок – полисахарид [5]. На основе этих полимолеку-

лярных комплексов получены кормовые добавки для рыбы и птицы.

Ранее, нами в рамках инновационных проектов разработана технология, позволяющая выделять белок из отходов производства шелка и использовать его в рыбоводстве и птицеводстве [6].

Белки - высокомолекулярные органические вещества, состоящие из альфа-аминокислот, соединённых в цепочку пептидной связью. Белковая молекула, как правило, принимает определенную конфигурацию, которую формируют полярные (электростатические) взаимодействия и водородные связи. Все белки построены из аминокислот, которые соединены между собой пептидными связями, образованными карбоксильной и α -аминогруппами соседних аминокислотных остатков. Конформация белка определяется последовательностью аминокислотных остатков в молекулярной цепи. Она стабилизируется водородными связями между пептидными и боковыми группами аминокислотных остатков, а также гидрофобными и электростатическими взаимодействиями (рис. 1).

Важнейшим свойством белков является их способность проявлять как кислые, так и основные свойства, то есть выступать в роли амфотерных электролитов. Это обеспечивается за счет различных диссоциирующих группировок, входящих в состав радикалов аминокислот. Общий фрагмент молекулы белка обладает полярными свойствами, т.к. содержит кислую карбоксильную группу ($-\text{COOH}$) и основные ($-\text{NH}_2$) группы, поэтому белок обладает амфотерными свойствами.

Биополимер хитозан, благодаря наличию уникальных физико-химических характеристик, а также способности к биоразложению и низкой токсичности является весьма

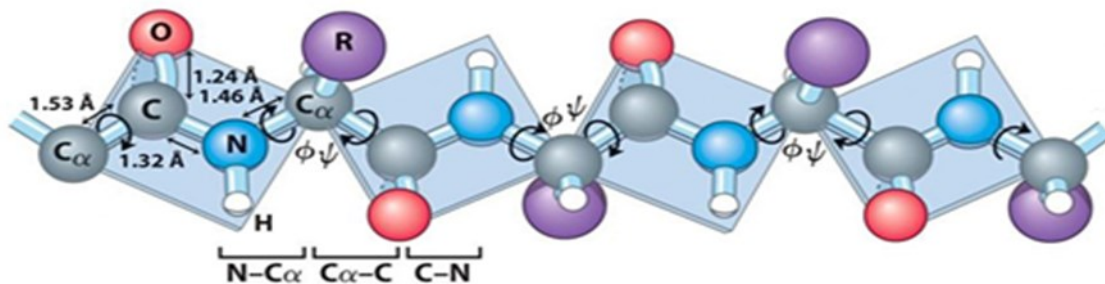


Рисунок 1. Первичная структура белка.

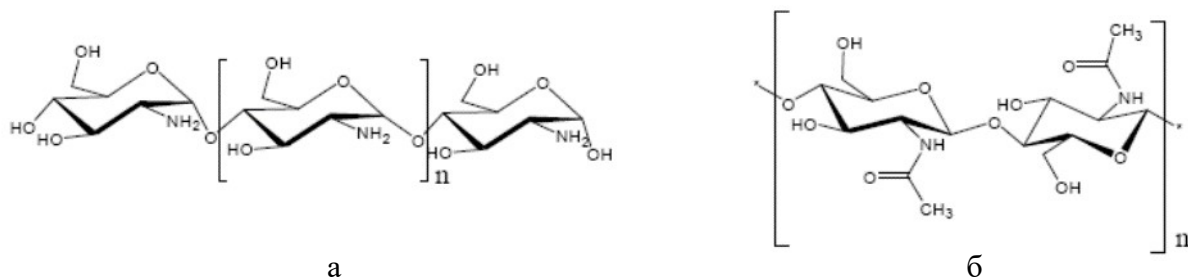


Рисунок 2. Химические формулы хитозана (а) и хитина (б).

перспективным в этом аспекте. Полисахаридная природа хитозана и присутствие функциональных групп обеспечивает возможность разнообразных химических модификаций, позволяющих придавать им новые свойства в соответствии с предъявляемыми требованиями [7-10]. Получение комплексов хитозана с другими биополимерами (белками, нуклеиновыми кислотами, полисахаридами и др.) также расширяет спектр его применения.

Выделение из отходов производства таких ценных полимеров, как белок и хитин с дальнейшим его синтезом в хитозан, позволит получать на их основе полимолекулярные комплексы

Как и хитин, хитозан представляет собой аморфно-кристаллический полимер, для которого характерно явление полиморфизма, причем конформация макромолекул при переходе от хитина к хитозану существенно не изменяется.

Основным мономером хитозана является 2-амино-2-дезоксиглюкопираноза (рис. 2). Благодаря своему полимерному строению, наличию большого числа свободных гидроксильных и аминогрупп, хитозан эффективно связывает различные органические и неорганические соединения.

Хитозан – это сополимер, состоящий из глюкозамина и N-ацетилглюкозамина. Элементарное звено хитозана $[(C_6H_5O(OH)CH_2OH(NH_2)]_n$ характеризуется наличием аминогруппы (NH_2^+), алифатической метиленовой ($CH-$) группы и гидроксильных ($OH-$) групп при C-3 и C-6. Уникальная структурная особенность хитозана – это присутствие первичного амина в C-2 положении остатков глюкозамина. Строение хитозана, благодаря наличию аминогруппы у второго атома углерода пиранозного цикла обуславливает его

комплексообразующие свойства по отношению к белкам.

Полисахаридная природа хитозана и присутствие реакционноспособных функциональных групп обеспечивает возможность разнообразных химических модификаций, позволяющих усиливать присущие им свойства или придавать новые в соответствии с предъявляемыми требованиями. Получение комплексов хитозана с другими биополимерами (белками, нуклеиновыми кислотами, полисахаридами и др.) также расширяет спектр его применения [11-13].

В то же время в процессе деацетилирования хитина заметно уменьшается общая упорядоченность структуры (степень кристалличности снижается до 30-40%). Для получения хитозана из куколок тутового шелкопряда необходимо последовательно отделить белковую и минеральную составляющие сырья, т.е. перевести их в растворимое состояние и удалить [14].

В настоящее время в Республике отсутствуют белковые препараты, обладающие не только питательной ценностью и хорошей усвояемостью, но также и бактерицидной активностью и предотвращающие наиболее часто встречающиеся болезни рыб, обладающие эффективным спектром действия на различные патогенные микроорганизмы. Поэтому разработка технологии получения препаратов на основе белка и хитозана, обладающих не только питательной ценностью и хорошей усвояемостью, но также и бактерицидной активностью и предотвращающие болезни рыб, является целью проводимых исследований. Это позволит создавать сбалансированные высокопротеиновые корма для рыбоводства, используя нетоксичное местное сырье, являющееся отходом производства шелка.

Методы исследований

В качестве объекта исследования были использованы куколки тутового шелкопряда и выделяемый из него белок и хитозан. Белок из КТШ выделяется на лабораторном реакторе Vuchiglasuster- V=10 л с регулируемой температурой и непрерывным перемешиванием от 50 до 300 об/мин. после процесса выделения хитина.

Молекулярная масса (M_h) полимера рассчитывалась по уравнению Марка-Куна-Хаувинка [15]:

$$M_h \approx ([\eta]/K)^{1/a},$$

где $K = 1,4 \times 10^{-4}$ и $a = 0,83$ – коэффициенты взяты из литературы для образцов хитозана.

Степень деацетилирования (СДА) хитозана определяли методом кондуктометрического титрования на автоматическом титраторе Metler Tolloedo в растворителе 0,1 н. соляной кислоты. Степень деацетилирования хитозана определена по формуле [16]:

$$\text{СДА} = 203,3 \times 100 / (42 + 1000 \times m / C_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}})$$

где: 203,3; 42; 100; 1000 – расчетные коэффициенты; m – навеска хитозана; V – объем расходуемого титранта NaOH, мл; C_{NaOH} – концентрация NaOH.

Очистка технического хитозана проводилась по разработанной методике, которая заключалась в предварительном растворении хитозана в 2% уксусной кислоте, осаждении и коагуляции раствора при определенном pH, промывке спиртом, центрифугировании и лиофильной сушке образца [17].

Получение полимолекулярного комплекса из белкового гидролизата и хитозана осуществляют осаждением хитозана при различных pH среды: 4,88; 6,27; 6,7.

ИК спектроскопические исследования проводили на ИК-Фурье спектрофотометре Inventio-S (Bruker, Germany) со спектральным разрешением 2 см^{-1} . Образцы готовили в виде таблеток с KBr под давлением 7×10^8 Па.

Аминокислотный анализ проводили на аминокислотном анализаторе E 339 (Чехословакия- Amino acid analyzer E 339, Mikro-techna – Prague- Czechoslovakia). Предварительно лиофильно высушенные навески (по

50 мг) образцов гидролизовали 5,7 н соляной кислотой в течение 24 ч. при температуре $110 \text{ }^\circ\text{C}$ в вакууме.

Результаты и обсуждение

Хитин и хитозан выделяли из куколок тутового шелкопряда *Bombyx mori*, включая этапы очистки и переработки исходного сырья. Полученные экспериментальные результаты позволяют выделить наиболее общие и важные параметры при получении хитина из куколок тутового шелкопряда *Bombyx mori*.

Изучено влияние температуры и времени реакции, а также концентрации щелочи на молекулярные характеристики хитозана. Увеличение концентрации щелочи в диапазоне 30–50% обуславливает увеличение степени деацетилирования хитозана от 55% до 95%. Подтверждено, что увеличение интервала времени реакции с 60 до 180 мин приводит к снижению молекулярной массы со 140 кДа до 95 кДа. При проведении реакции при $120 \text{ }^\circ\text{C}$ степень деацетилирования и молекулярная масса полученных образцов хитозана составляют 95% и 100 кДа, соответственно. Полученные результаты подтверждают, что получение хитозана с высокой степенью деацетилирования в присутствии 50% NaOH, продолжительностью 3 ч. при температуре $t=120 \text{ }^\circ\text{C}$ являются оптимальными технологическими параметрами для проведения реакции деацетилирования хитина и получения хитозана из куколок тутового шелкопряда.

Полисахарид хитозан характеризуется химической неоднородностью и содержит небольшое количество минеральных примесей, а также характеризуется широким молекулярно-массовым распределением. Поэтому для дальнейшего использования необходимо провести очистку хитозана от примесей. Получен очищенный хитозан с выходом 62-67%. pH 1% водной суспензии полученных образцов хитозана не более 7,5. Уменьшение зольности образцов свидетельствует об увеличении чистоты образца. Степень деацетилирования очищенных образцов всех партий составляет 77-90%. Молекулярная масса очищенных образцов хитозана колеблется от 109 до 135 кДа.

Процесс выделения белка из куколок *Bombyx mori* заметно отличается от процедуры, используемой для отделения белка из других видов источников сырья. Поверхность большинства белковых молекул заряжена вследствие того, что в каждой молекуле белка имеются свободные заряженные COO^- и NH_3^+ группы. При взаимодействии таких ионов под влиянием притяжения между ними и дипольными молекулами воды образуется гидратная оболочка белковой молекулы [18-19].

Используемый при этом щелочной раствор в определенной степени влияет на физическое состояние белков, что может сопровождаться изменением нативной структуры в зависимости от условий проведения опытов. В связи с этим особое внимание было уделено сохранению нативной структуры белков при выделении их из щелочных растворов. Факт образования белка и хитозана доказан на основе ИК спектроскопии и элементного анализа (рис. 3, 4).

Использование более высокой концентрации гидроксида натрия, т.е. 7% NaOH приводит к денатурации белка, образованию темноокрашенных продуктов окисления фенольных соединений белка и значительному изменению качественных характеристик. Извлечение белка экстракцией в щелочной раствор позволяет выделить значительное количество белка. При осаждении белка из 1% щелочного белкового гидролизата на физико-химические свойства белковых веществ влияют многие факторы, которые вызывают изменения структуры макромолекул. Для эффективного осаждения куколичного белка из раствора очень важен выбор необходимого значения pH. Осаждение белка проводилось из белкового гидролизата раствором уксусной кислоты при различном pH.

Повышение pH приводит к повышению степени осаждения белка, которая к значению pH 4,4-5,0 (при приближении pH к изоэлектрической точке) достигает максимума и выход составляет 40-45%, содержание азота при этом увеличивается на 10-15%.

При изоэлектрической точке происходит максимальное осаждение белка (увеличение выхода на 30-60%).

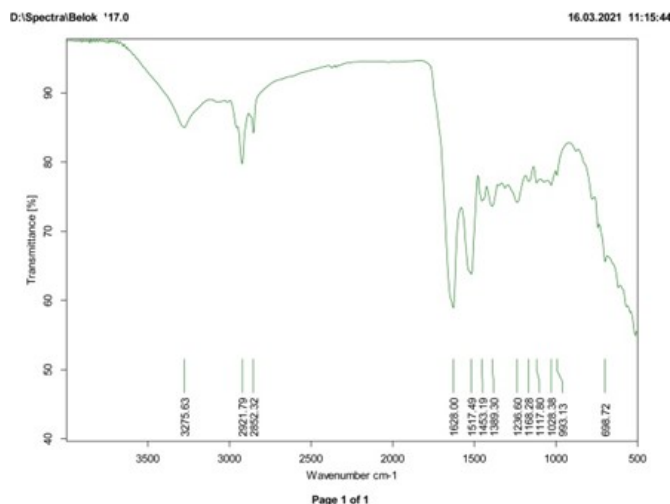


Рисунок 3. ИК спектр хитозана *Bombyx mori*.

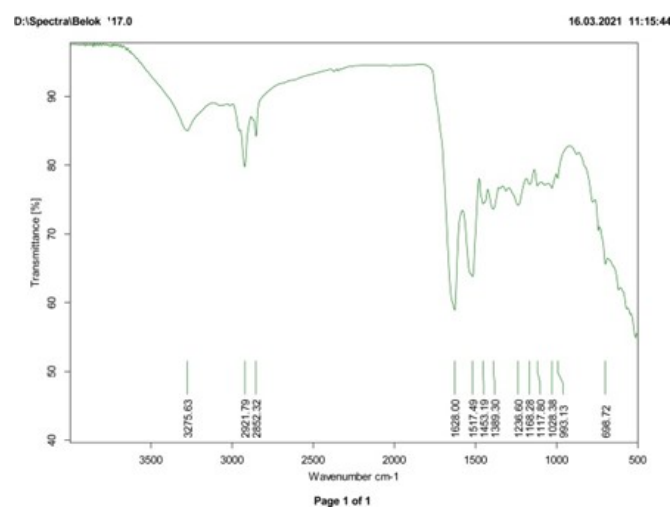


Рисунок 4. ИК спектр белка *Bombyx mori*.

Большое число антимикробных пептидов с антибактериальной активностью выделяется в последнее время из различных насекомых, которые по силе воздействия сопоставимы с антибиотиками и могут быть использованы для лечения бактериальных и грибковых инфекций.

Проведены исследования по изучению антибактериальной активности белка *Bombyx mori*, выделенного из отходов производства шелка, в различных концентрациях: 1 мг/мл; 5 мг/мл; 10 мг/мл на подавление различных штаммов микроорганизмов в условиях *in vitro* (табл. 1).

Из таблицы видно, что антибактериальная активность данного белка имеет тенденцию с повышением концентрации усиливать степень их воздействия и расширять спектр подавляемых микробов. Так, если в концентрации 1 мг/мл белок был активен по отноше-

Таблица 1

Чувствительность различных микроорганизмов к белку *Bombux mori* (M±m)мм

Микроорганизмы	Концентрация раствора белка		
	1 мг/мл	5 мг/мл	10 мг/мл
<i>Staph. aureus</i>	0	12.0±0.2	15.0±0.2
<i>St.saprofiticus</i>	20.0±0.4	10.0±0.1	5.0±0.1
<i>Str. pyogens</i>	0	12.0±0.2	12.0±0.2
<i>Esch. coli ЛП</i>	5.0±0.1	15.0±0.2	17.0±0.3
<i>Esch. coli ЛН</i>	5.0±0.1	15.0±0.2	15.0±0.2
<i>Prot. vulgaris</i>	5.0±0.1	5.0±0.1	5.0±0.1
<i>Klebsiella</i>	15.0±0.2	20.0±0.4	22.0±0.4
<i>Bac.subtilis</i>	5.0±0.1	5.0±0.1	10.0±0.1

нию к *St.saprofiticus* и *Klebsiella*, то при повышении концентрации до 5 и 10 мг/мл он стал активным, как к грамположительной, так и к грамотрицательной флоре: *Esch. coli* ЛН, *Esch. coli* ЛП и особенно к анаэробным микроорганизмам - *Klebsiella*. Т.е. белок *Bombux mori* проявляет антимикробную активность и оказывает бактерицидное действие, как на грамотрицательные, так и грамположительные бактерии. Т.е. можно заключить, что белок *Bombux mori* является важным компонентом антимикробных защитных механизмов и, действуя синергетически, оказывает бактерицидное действие, как на грамотрицательные, так и грамположительные бактерии.

Процесс получения комплексов на основе белковых щелочных гидролизатов и хитозана *Bombux mori*, неизбежно сопровождается распадом надмолекулярной и молекулярной структуры отдельных функциональных групп и элементов его макромолекул. При этом скорость процесса образования комплекса зависит от pH среды и температуры. Однако эффективность образования комплекса во многом определяется также исходным поведением макромолекулы биополимеров в среде растворов.

Методом потенциометрического титрования растворов белка хитозаном при изоэлектрической точке (ИЭТ) получают полимолекулярные комплексы белок-хитозан.

На рис. 5 представлен ИК спектр комплекса хитозан-белок.

Титрование раствора белка хитозаном проводят до выпадения осадка комплекса до изоэлектрической точки (ИЭТ) при pH=4,88. Комплекс должен реализоваться при pH, при котором происходит ион-дипольное взаимодействие между отрицательно заряженным белком и хитозаном с полярными группами NH₂. Полученный осадок отфильтровывают, промывают до pH=7 и высушивают лиофильно в течение 2 часов. Содержание азота в комплексе – 12,57%. Видно, что на ИК спектрах имеются характерные полосы поглощения комплексов белок: хитозан. Появляются выраженные полосы из-за смещения валентных колебаний NH₂-групп хитозана и NH-групп белка, которые проявляются увеличением интенсивности полос поглощения при волновых числах 3200-3800 см⁻¹. Как видно из спектров, полоса амид I (1600-1690 см⁻¹) более восприимчива к вторичной структуре белка и преимущественно связана с валентным колебанием C = O амидной группы.

Наблюдаются выраженные полосы поглощения деформационных колебаний NH- и CN- связи (амид II) при 1574 см⁻¹ и NH₂-связи (амид I) при 1463 см⁻¹, а также полоса в области CH₂-OH связи при 1466 см⁻¹. Полоса поглощения эфирных связей наблюдается при 1068 см⁻¹. Во всех спектрах заметные изменения происходят в области 1000 см⁻¹, где находятся полосы поглощений эфирных связей и CO-групп при 1250-1110 см⁻¹.

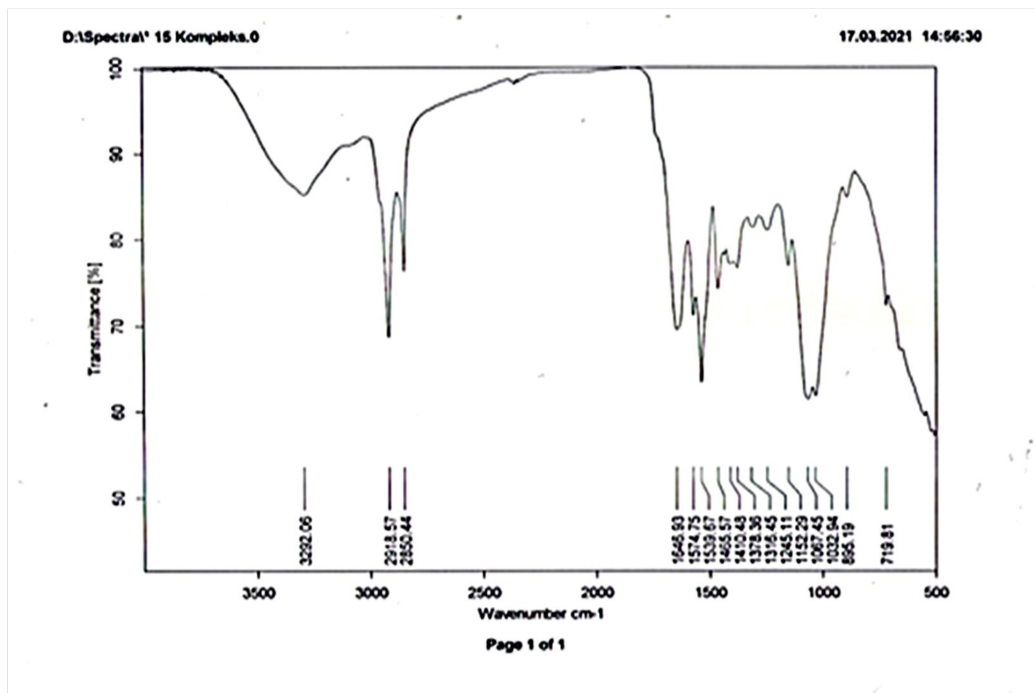


Рисунок 5. ИК спектр ХЗ:белок.

Водородные связи могут возникать между сложными эфирными связями полисахарида и гидроксильными, амидными и карбоксильными группами белков, обычно возникающие при рН выше рН белка с более низкой плотностью зарядов. В образце комплекса проявляются несколько полос поглощения при $900-660\text{ см}^{-1}$ NH_2 связи (амид I), характерные для хитозана.

По результатам экспериментальных работ синтеза полимолекулярных комплексов

на основе белка и хитозана *Bombyx mori* разработана технологическая схема получения комплексов (рис. 6).

В настоящее время с прогрессом развития рыбоводства в Узбекистане и выращивания рыбы индустриальными методами большое внимание уделено проведению научно-исследовательских работ для дальнейшего внедрения инновационных технологий в процесс производства рыбы и укрепления кормовой базы путем создания новых

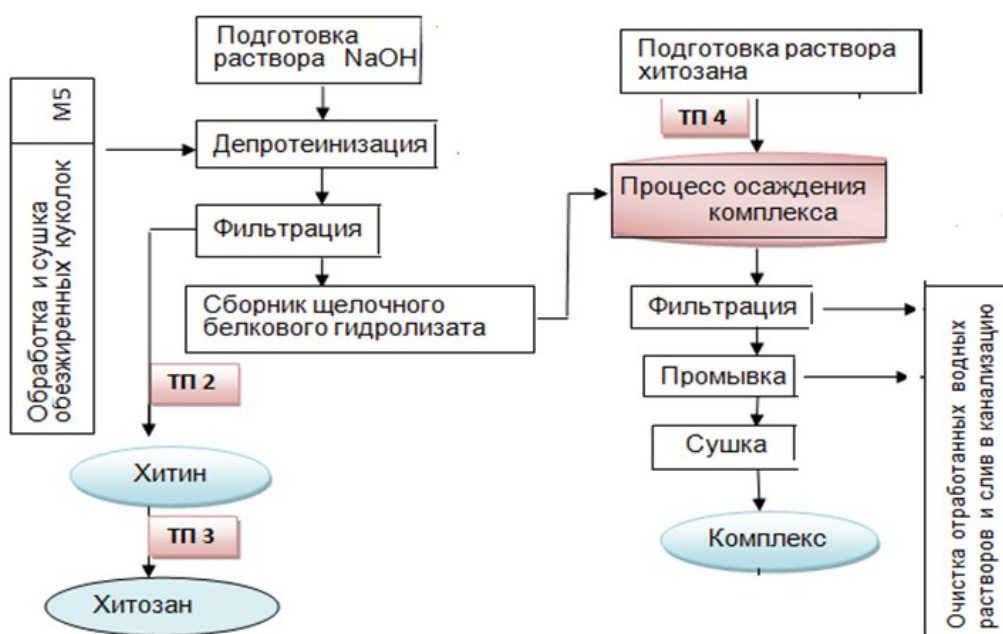


Рисунок 6. Технологическая схема получения комплексов белок-хитозан.

производств высокобелковых кормов для рыб. Нами проведены испытания полученных препаратов в Научно-исследовательском Институте развития рыбоводства (Янгиюль) в составе комбикормов (с содержанием сырого протеина 33,3%) по различным показателям: выход рыбопродукции, выживаемость, эффективность использования корма. Работы проводились на промышленном виде рыбы – карпе (*Carpinus carpio*), который является одним из основных объектов рыбоводства во многих странах мира.

Исследования проводились в бетонных бассейнах с проточными системами на экспериментальном участке НИИ рыбоводства (рис. 7).

Корм для рыб представляет значительную часть эксплуатационных расходов в аквакультуре. Рыбная мука является основным ингредиентом источником белка для выращиваемых рыб. Уменьшение поставки и высокая стоимость рыбной муки делают актуальным исследование частичной замены рыбной муки в кормах на альтернативный ингредиент. Ингредиенты животного происхождения считаются лучшей альтернативой источников белка в рыбных кормах, потому что они содержат больше незаменимых аминокислот, чем ингредиенты растительного происхождения [20]. Исследования проводились в течение 60 дней. В рамках эксперимента карпов разделили на 2 группы: I – контрольная группа (корм без добавления комплекса). II - экспериментальная группа (корм с добавлением комплекса).

Контрольный улов проводили каждые 15 дней, а суточный рацион корректировали



Рисунок 7. Бассейн с проточной системой воды на экспериментальном участке НИИ рыбоводства.

Таблица 2
 Показатели темпа роста рыб во время эксперимента

Показатели	Экспериментальные бассейны	
	I (контроль)	II (эксперимент)
Исходная масса тела, г	96.2±0.13	95.8±0.11
Конечная масса тела, г	258.7±0.22	263.6±0.55
Средний привес массы тела, г	162.5±0.8	167.8±0.44
Среднесуточная прибавка массы тела, г/сут	2.70	2.78
Кормовой коэффициент (FCR)	3.11	2.96

в соответствии с ростом рыбы. Рыба во всех группах положительно росла в ходе эксперимента (табл. 2). Суточные темпы роста рыб в г/сут были практически одинаковыми. Этот показатель равен 2,70 в 1-й группе и 2,78 во 2-й группе. Известно, что одним из основных факторов достижения экономического успеха в искусственном рыбоводстве является то, сколько кг корма расходуется на кг живой биомассы. В нашем эксперименте он показал хороший результат у 2 групп рыб и был равен 2,96. Полимерный комплекс, используемый в наших исследованиях, богат незаменимыми для рыб аминокислотами, что отчетливо ощущалось в эксперименте.

За время опыта выживаемость рыб в контрольной группе составила 85,7 %, а в опытной группе этот показатель был выше на 3,7 % и составил 89,4 % (рис. 8). Экспериментальными опытами показано, что при использовании препарата на основе белка и хитозана *Bombux mori*, произошло увеличение выживаемости рыбы, увеличились темпы роста рыб и снизился кормовой коэффициент.

Процентное соотношение выживаемости рыб

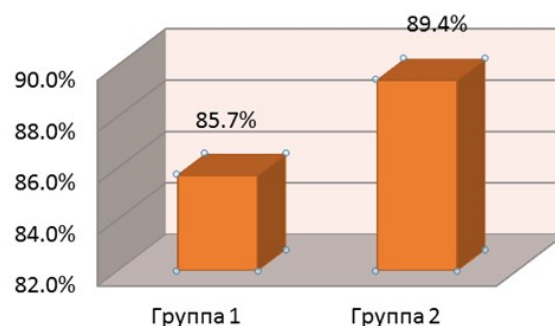


Рисунок 8. Процентное соотношение выживаемости рыб в эксперименте.

Заклучение

Получены полимолекулярные комплексы на основе белка и хитозана, структура комплексов доказана ИК спектроскопией и элементным анализом. Проведенные испытания полученных комплексов в Научно-исследовательском Институте развития рыбководства в составе комбикормов выявили, что комплексы положительно воздействовали на динамику развития рыб и в перспективе могут использоваться как активные добавки в составе комби-

кормов при разведении рыбы.

Исследование выполнено в рамках прикладного проекта № Ф3-2019062110 «Разработка технологии получения препаратов на основе белка и хитозана Bombyx mori для рыбководства»

Авторы выражают благодарность сотруднику Научно-исследовательского Института развития рыбководства PhD Курбанову А.Р за проведение испытаний по использованию разработанных препаратов в кормах при разведении рыб.

REFERENCES

1. Yi H., Wu L.Q., Bentley W.E., Ghodssi R., Rubloff G.W., Culver J.N., Payne G.F. Biofabrication with chitosan. *Biomacromolecules*, 2005, 6, 2881-2894.
2. Zhang H., Neau S.H. In vitro degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents. *Biomaterials*, 2002, 23, 2761-2766.
3. Huang M., Fong C.W., Khor E., Lim LY. Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. *J. Control Release*, 2005, 106, 391-406.
4. Rinaudo M., Milas M., Le Dung P. Characterization of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2001, 15/5, 281-285.
5. Kablov V.F., Ioshchenko Yu.P. Ispolzovanie khitosana kak flokylanta v prosessax videlenia belka iz molochnoi sivorotki [The use of chitosan as a flocculant in the processes of protein extraction from whey]. *Uspekhi sovremennogo yestestvoznaniya*, 2005, 7, 59-60.
6. Kurbanov A.R., Milusheva R.Yu., Rashidova S.Sh., Kamilov B.G. Effect of replacement of fish meal with silkworm (*Bombyx mori*) pupa protein on the growth of *Clarias gariepinus* fingerling. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studie*, 2015, 2/6, 25-27.
7. Rinaudo M., Milas M., Le Dung P. Characterization of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2001, 15/5, 281-285.
8. Varlamov V.P., Nemtsev S.V., Tikhonov V.E. *Khitin i khitosan: priroda, poluchenie i primeneniye* [Chitin and chitosan: nature, production and application]. Moscow, Rossiskoye Khimicheskoye Obshchestvo Publ., 2010, 292.
9. Vasquez D., Milusheva R., Baumann P., Constantin D., Chami M., Palivan C. *The amine content of PEGylated chitosan Bombyx mori nanoparticles acts as a trigger for protein delivery*. Langmuir, ACS Publication, 2014, 30/4, 965-975.
10. Madyarov Sh.R. Biotechnological Approaches in Sericultural Science and Technology of Uzbekistan (Review). *Int. J. Indust. Ehtomol.*, 2005, 11/1, 13-19.
11. Tien Le, Lacroix M., Ispas-Szabo P. N-acylated chitosan: hydrophobic matrices for controlled drug release. *J. Control Release*, 2003, 93/1, 1-13.
12. Ioshchenko Yu.P. *Poluchenie i issledovaniye polimolekulyarnykh kompleksov khitosana s belkami i gidroksilsodersashchimi polimerami* [Preparation and study of polymolecular complexes of chitosan with proteins and hydroxyl-containing polymers. PhD diss.]. Volgograd, 2006. 119.
13. Alieva L.R., Butkevich T.V., Golovach T.N., Evdokimov I.A., Kurchenko V.P. Mekhanizm vzaimodeystviya khitosana s belkami [The mechanism of interaction of chitosan with proteins]. *Sovremennai nauka i innovasia*, 2017, 19/3, 100-108.
14. Rashidova S.Sh., Milusheva R.Yu. *Khitin i khitosan Bombyx mori. Sintez, svoystva i primeneniye* [Chitin and chitosan Bombyx mori. Synthesis, properties and application]. Tashkent, FAN Publ., 2009. 246.
15. Riccardo A.A. Muzzarelli, Martin G. Peter. *Chitin Handbook*, Grottammare, Atec Publ., 1997. 528
16. Pogodina N.V., Pavlov G.M., Byshin S.V. i dr. Konformatsionnyye kharakteristiki molekyl khitosana po dannym diffusionno-sedimentatsionnogo analiza i viskozimetrii [Conformational characteristics of chitosan molecules as demonstrated by diffusion-sedimentation analysis and viscometry]. *Vysokomolekuly. soed. A*, 1986, 28/2, 232-239.
17. Milusheva R.Yu., Pirniyazov K.K., Rashidova S.Sh. Ochistka khitosana Bombyx mori [Purification of chitosan Bombyx mori]. *Bulletin of the Tver State University. Series: Chemistry*, 2016, 2, 119-124.
18. Benichou A., Aserin A., Garti N. Protein-polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2002, 23, 93-123.
19. Doublier J. L., Garnier C., Renard D., Sanchez C. Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2000, 5, 202-214.
20. Robinson E.H., Li M.H. Comparison of practical diets with and without animal protein at various concentrations of dietary protein on performance of channel catfish *Ictalurus punctatus* raised in earthen ponds. *J. World. Aquacult. Soc.*, 1998, 29, 273-280.