

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ХИТОЗАНА ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ, ВЕТЕРИНАРИИ И АГРОБИОЛОГИИ

А.И. Албулов, В.П. Варламов, М.А. Фролова, А.Я. Самуйленко, А.В. Гринь

Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, Щелково, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Хитозан – деацетилированное производное хитина – обладает многочисленными полезными свойствами, основными из которых являются сорбционные, иммуномодулирующие, антисептические, радиопротекторные, антиоксидантные и другие, что делает перспективным применение его в различных областях народного хозяйства. В настоящее время все больше расширяются такие сферы применения хитозана, как медицина и ветеринария, где он используется в составе биологически активных добавок для людей и препаратов для животных, а также агробиология в практике защиты растений от патогенов [1, 3, 4, 5].

Хитозан, как природный полисахарид, имеет достаточно широкое молекулярно-массовое распределение. Входящие в его состав фракции обладают различными физико-химическими характеристиками, с чем связано разнообразие свойств хитозана. В то же время применение хитозана в отдельных областях требует от него строго специфического действия, которое определяется такими физико-химическими характеристиками, как молекулярная масса и степень чистоты продукта [2].

Целью работы явилось получение хитозана, с узким молекулярно-массовым распределением, оценка его биологически активных свойств и применение в составе препаратов для человека, животных и растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исходного сырья для получения низкомолекулярного хитозана использовали хитозан с ММ 270 кДа. Ферментативный гидролиз хитозана проводили с использованием фермента Целловеридин Г20 при pH 5,2–5,6 и температуре 52–54° С. Гидролиз останавливали добавлением 10 %-ного раствора гидроксида натрия до значения pH в смеси 9,5.

Раствор хитозана фильтровали, промывали деминерализованной водой до pH 8,0–8,4, растворяли в соляной кислоте при pH 6,0–6,3 и сушили на установке для распылительной сушки.

Показатель активности водородных ионов pH определяли потенциометрически, остаточную влажность методом высушивания пробы при 105° С, вязкость методом ротационной вискозиметрии на вискозиметре фирмы «Brookfield».

Ультрафильтрацию образцов низкомолекулярного хитозана осуществляли на установке ФМ 02–1000 через полисульфонамидные и ацетатцеллюлозные мембраны с размером пор 5, 10, 20 и 50 кДа. Молекулярную массу полученных фракций определяли методом ВЭЖХ.

Суммарную антиоксидантную емкость (АОЕ) хитозана определяли кулонометрическим методом на кулонометре «Эксперт-006».

Испытание хитозана в качестве энтеросорбента и иммуномодулятора при желудочно-кишечных заболеваниях молодняка сельскохозяйственных животных проводили в хозяйствах Тульской, Московской, Курской и Брянской областей в период массовых отелов и опоросов. Контролем служили группы телят и поросят, которым вводили антибиотики или не назначали лечебный препарат.

Оценку лечебного эффекта хитозана осуществляли по клиническому состоянию, среднесуточному привесу массы тела и биохимическим показателям сыворотки крови опытных животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из перспективных методов снижения молекулярной массы хитозана является его ферментативная деструкция, как наиболее химически чистый и экологически безопасный способ. Применение ферментов позволяет до минимума сократить использование токсичных реактивов, избежать модификации полисахарида, регулировать молекулярную массу полученных полимеров. Низкомолекулярный водорастворимый хитозан получали по технологии, включающей в себя стадии растворения хитозана, создания оптимальных условий для проведения гидролиза, освобождения от нерастворимых примесей, переосаждения, фильтрации с последующей промывкой и лиофильной сушкой.

В результате гидролиза был получен хитозан со средневязкостной молекулярной массой 28,7 кДа. Дальнейшее фракционирование проводили на ацетат-целлюлозных мембранах производства «Владисарт» с размером пор 5, 10, 20, 50 кДа.

Таблица 1. Средневязкостная молекулярная масса гидролизованного хитозана

Размер пор мембран, кДа	Молекулярная масса хитозана, кДа	Содержание фракции в гидролизованном хитозане, %
5	2,8	0,3
5–10	7,8	27,9
10–20	17,4	37,2
20–50	30,8	32,3
> 50	42,8	2,3

Исследованиями, проведенными совместно с МГАВМиБ, Институтом проблем химической физики РАН, Брянской государственной сельскохозяйственной академией, было показано, что фракция хитозана массой 7,8 кДа проявляет радиопротекторную и адаптогенную активность, фракция с молекулярной массой 17,4 кДа обладает иммуномодулирующей активностью, препарат с молекулярной массой 30,8 кДа оказывает стимулирующее действие на кишечную микрофлору.

Антиоксидантная активность, определенная окислительным галогенированием электрогенерированными галогенами в пересчете на кверцетин составляла 554.42 ± 41.99 мг кверцетина на 100г абсолютно сухого образца, относительная ошибка определения составляла 1–3 %. В результате проведенных нами исследований установлено, что хитозан представляет интерес как антиоксидантный компонент различных лечебно-профилактических препаратов, влияющих на окислительные процессы организма.

Испытание препаратов на основе хитозана в животноводческих хозяйствах Московской, Курской, Тульской и Брянской областей показало, что применение хитозана с профилактической целью в дозе 2 мл 2 %-ного раствора на 1 кг живого веса 2 раза в день за 30 минут до еды в течение 2 дней дает профилактический эффект в 75–100 % случаев, применение хитозана с лечебной целью в дозе 3 мл 3 %-ного раствора на 1 кг живого веса 3 раза в день за 30 минут до еды в течение 3 дней дает лечебный эффект в 50–80 % случаев.

Отмечено увеличение среднесуточного привеса массы тела у телят и поросят опытных групп до 50 % по сравнению с контрольными группами животных.

Биохимические показатели сыворотки крови у телят и поросят опытных групп по содержанию фосфора, резервной щелочности, белковых фракций крови соответствовали физиологическим нормам, а у животных контрольных групп эти показатели были несколько ниже.

Таким образом, проведенные испытания показали, что хитозан является эффективным средством для поддержания жизнеспособности молодняка сельскохозяйственных животных, может быть применен для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний телят и поросят.

В настоящее время на лекарственное средство «Хитозан» производства ВНИТИПБ утверждены в установленном порядке Технические условия, Инструкция по применению и Свидетельство о госрегистрации.

На основе низкомолекулярного водорастворимого хитозана получен препарат «Агрохит», регулирующий рост и индуцирующий болезнеустойчивость растений. Разработчиком этого препарата является Центр «Биоинженерии» РАН Низкомолекулярные фракции хитозана способны индуцировать биосинтез защитных белков и фитоалексинов растения, а также повышать прочность клеточных стенок, что делает растение более устойчивым к неблагоприятным воздействиям внешней среды. Проведенные исследования показали, что применение препарата на яблонях стимулирует рост побегов и корнеобразование у саженцев, повышает устойчивость к болезням коры и древесины, стимулирует ускоренную лигнификацию пораженных участков коры. Высокая ризогенная активность препарата обнаружена на черенках вишни, сливы, груши, смородины, крыжовника, облепихи. «Агрохит» также успешно испытан на тепличных культурах огурцов, томатов и зеленых культурах.

Хитозан, полученный предложенным выше способом, вошел в состав ряда биологически активных добавок к пище – «Хитан», «Полихит» и «Фитохитодез», эффективность которых подтверждена Институтом питания РАН.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хитозан полученный по технологии, разработанной ВНИТИБП – ЗАО «Биопрогресс», обладает высокой биологической активностью, позволяющей использовать его в различных областях медицины и сельского хозяйства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Албулов А.И., Самуйленко А.Я., Нифатьев Н.Э., Фоменко А.С., Фролова М.А., Шинкарев С.М. // Материалы V конференции «Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана», М. – Щелково, 1999, с. 115–117.
2. Ильина А.В., Варламов В.П. // Материалы 7 Международной конференции «Новые достижения в исследовании хитина и хитозана», М.: ВНИРО, 2003, с. 311–315.
3. Куликов С.Н., Алимова Ф.К., Захарова Н.Г., Немцев С.В., Варламов В.П. // Прикладная Биохимия и Микробиология, М, 2006, Т.42, № 2, с. 224–228.
4. Самуйленко А.Я., Шинкарев С.М., Албулов А.И., Фролова М.А., Крапивина Е.В., Кузнецов П.А. // Ж. «Аграрная Россия», М.: 2004, с. 8–12.
5. Червинец В.М., Албулов А.И., Червинец Ю.В. // VII Международная научно-практическая конференция «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов», г. Щелково, 2005, с. 438–444.
6. Xing R., Liu S., Guo Z. Et all. // Bioorg. Med. Chem, Institute of Oceanology, 2005, p. 1573–1577.