

## НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 541.64:678.5

**СИНТЕЗ И ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА НАНОАСКОРБАТ ХИТОЗАНА *BOMBYX MORI*****Кудрат Кадамбаевич Пирниязов, Дилором Ибрагимовна Асракулова, Сайёра Шарафовна Рашидова**

Институт химии и физики полимеров АН РУз

**Автор, ответственный за переписку:** Кудрат Кадамбаевич Пирниязов, qudratpirniyazov8875@gmail.com

**Аннотация.** Описан синтез суспензионным методом наноаскорбат хитозана *Bombyx mori* на основе низкомолекулярного хитозана (НМХЗ). Изучены его физико-химические и противомикробные свойства по отношению к *Fusarium oxysporum*, вызывающего заболевания тутовых деревьев. Полученный наноаскорбат хитозана на основе низкомолекулярного хитозана обладает большей зоной подавления по сравнению со всеми вариантами против культуры *Fusarium oxysporum* тутовника. Установлено, что при обработке семян пшеницы наноаскорбат хитозаном при соотношении компонентов НМХЗ : АК = 4 : 1 снижается уровень заболеваемости головнёвым грибом на 6,6 и 2,4% по сравнению с контролем и эталонам соответственно. Определено влияние соотношения компонентов хитозана и аскорбиновой кислоты на образование наноаскорбат хитозана. Методом ИК-спектроскопии изучены структурные характеристики наноаскорбат хитозана *Bombyx mori*.

**Ключевые слова:** наноаскорбат хитозана *Bombyx mori*, наночастицы, антимикробные свойства, степень связывания

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2024-65-5-424-430

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Республики Узбекистан «Фундаментальные исследования по синтезу и выявлению кинетических закономерностей формирования нанополимерных систем» 2022 года.

**Для цитирования:** Пирниязов К.К., Асракулова Д.И., Рашидова С.Ш. Синтез и противомикробные свойства наноаскорбат хитозана *Bombyx mori* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2024. Т. 65. № 5. С. 424–430.

## ORIGINAL ARTICLE

**SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF CHITOSAN NANOASCORBATE *BOMBYX MORI*****Kudrat K. Pirniyazov, Dilorom I. Asrakulova, Sayyora Sh. Rashidova**

Institute of Chemistry and Physics of Polymers

**Corresponding author:** Kudrat Kadambaevich Pirniyazov, qudratpirniyazov8875@gmail.com

**Abstract.** This paper describes the synthesis of chitosan nanoascorbate *Bombyx mori* based on low molecular weight chitosan (LMWC) by the suspension method. Its physicochemical and antimicrobial properties against *Fusarium oxysporum*, which causes diseases of mulberry trees, have been studied. The resulting chitosan nanoascorbate based on low molecular weight chitosan has a larger suppression zone compared to all

variants against the culture of *Fusarium oxysporum* mulberry and melon, which makes it possible to use it in presowing seed treatment at a ratio of LMWC:AA components 4:1. It was found that when wheat seeds were treated with chitosan nanoascorbate, the incidence of smut fungus decreased by 6.6 and 2.4 % compared to the control and the standard, respectively. The effect of the ratio of the components of chitosan (CS) and ascorbic acid (AA) on the formation of chitosan nanoascorbate (CSNA) was determined. IR spectroscopy established the structural characteristics of chitosan nanoascorbate *Bombyx mori*.

**Keywords:** chitosan nanoascorbate *Bombyx mori*, nanoparticles, antimicrobial properties, degree of binding

**Financial Support.** The work was carried out with the financial support of the grant of the Republic of Uzbekistan “Fundamental research on the synthesis and identification of kinetic patterns of formation of nanopolymer systems” in 2022.

**For citation:** Pirniyazov K.K., Asrakulova D.I., Rashidova S.Sh. Synthesis and Antimicrobial Properties of Chitosan Nanoascorbate *Bombyx mori* // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2024. T. 65. № 5. S. 424–430.

Во всем мире увеличивается потребность в экологически безопасных препаратах, полученных на основе природных полимеров, которые ускоряют рост растений и являются эффективными в борьбе с грибковыми заболеваниями. Такие препараты высокоэффективны в малых концентрациях и благодаря их активному действию используются в сельском хозяйстве в качестве комплексного средства против болезней [1, 4–5]. Нанопроизводные хитозана, в частности наноаскорбат хитозана, являются нетоксичными и экологически безопасными, в составе почвы полностью разлагаются под действием микроорганизмов [2, 3, 8]. В связи с этим большое значение приобретают научно-практические исследования, направленные на изучение условий синтеза и производства наноаскорбат хитозана *Bombyx mori*, определения его структуры и свойств, а также его применения в сельском хозяйстве. Известно, что производные хитозана, в том числе наноаскорбат хитозана, обладают антимикробными свойствами к патогенам и ростостимулирующими свойствами, что делает их эффективными при обработке семян сельскохозяйственных культур [6–8].

Наночастицы производных хитозана получают разными методами: ионотропным гелеобразованием, распылительной сушкой, ультразвуковым диспергированием, электроспиннингом, осадительной коацервацией и т.п. Некоторые из вышеуказанных способов являются многоэтапными и требуют недоступных реактивов. Метод ионотропного гелеобразования позволяет полу-

чить нанопроизводные хитозана при комнатной температуре в водном растворе, при этом не требуется дополнительной очистки полученных веществ с помощью перекристаллизации и диализа [2, 3, 9–11].

В работе [1] рассмотрены вопросы применения нанопроизводных хитозана, экспериментального материала и методов по созданию наносистем на основе хитозана *Bombyx mori*. В работах [2, 4] проведен синтез аскорбат хитозана *Bombyx mori*, а также оценены возможности взаимодействия хитозана *Bombyx mori* с аскорбиновой кислотой на основе квантово-химических расчетов. Подтверждено, что в результате взаимодействия хитозана *Bombyx mori* с аскорбиновой кислотой образуются донорно-акцепторные связи за счет аминогрупп хитозана и енольной группы аскорбиновой кислоты. Ранее было подтверждено образование олигохитозана *Bombyx mori* методом кислотного гидролиза на основе высокомолекулярного хитозана и показано образование аскорбат олигохитозана, что доказывает формирование низкомолекулярных производных хитозана *Bombyx mori* [3]. Проведен анализ научной литературы по получению аскорбат и наноаскорбат хитозана на основе различных источников сырья [2]. Установлена ярко выраженная биологическая активность аскорбат хитозана и наноаскорбат хитозана к заболеваниям человека и растений. Анализ литературы свидетельствует, что методом ионотропного гелеобразования синтезируются нанопроизводные хитозана с органическими кислотами, в том числе с аскорбиновой кислотой [2].

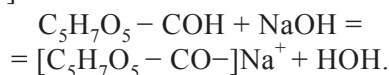
В настоящей работе впервые подтверждено образование наноаскорбат хитозана на основе низкомолекулярного хитозана (олигохитозана) *Bombyx mori* в отсутствие стабилизатора или ионноснивателей, что сокращает многоэтапность процесса и длительное промывание от избыточных ионов стабилизатора. Проведено сравнительное исследование противомикробных свойств наноаскорбат хитозана, полученного на основе низкомолекулярного и высокомолекулярного хитозана *Bombyx mori*.

### Объекты и методы исследований

Синтез наноаскорбат хитозана на основе хитозана *Bombyx mori* мало изучен, в литературе не встречаются оптимальные условия синтеза этого производного [2]. С учетом вышеизложенного проведен синтез наноаскорбат хитозана на основе хитозана *Bombyx mori* методом ионотропного гелеобразования в присутствии 0,5%-го раствора стабилизатора – триполифосфата натрия (ТПФNa). Проведен также синтез на основе низкомолекулярного хитозана (олигохитозана), который состоит из наноструктурного хитозана. Молярная концентрация аскорбиновой кислоты 0,05 М. Изучено влияние соотношения компонентов на образование наноаскорбат хитозана. При этом соотношение компонентов низкомолекулярного хитозана и аскорбиновой кислоты варьировали в определенном порядке (1:1, 2:1, 3:1, 4:1). Время синтеза 30 мин. В качестве осадителя использовали ацетон. Степень связывания хитозана с аскорбиновой кислотой (АК) оценивали по соотношению

$$(M_{AK})_{\text{эксп.}} / (M_{AK})_{\text{расч.}}$$

Избыточное количество аскорбиновой кислоты определяли методом щелочного титрования индикатором фенолфталеина с помощью уравнения [12]:



### Определение молекулярной массы исходного хитозана

В работе использовали хитозан *Bombyx mori* с молекулярной массой 101 кДа и степенью деацетилирования 84%, полученный из куколок тутового шелкопряда. В целях синтеза наноаскорбат хитозана из низкомолекулярного хитозана использовали хитозан с молекулярной массой 17,1 кДа. В качестве растворителя использовали буферный раствор (0,3 М  $CH_3COOH$  + 0,3 М  $CH_3COONa$ ).

При определении характеристической вязкости растворов хитозана поддерживали температуру  $303,15 \pm 0,05$  К. При этом концентрация исходного хитозана составляла 0,5%. Установлено время истечения раствора ( $t$ ) и растворителя ( $t_0$ ), отношение вязкости ( $\eta/\eta_0$ ), удельная вязкость ( $\eta_{\text{уд.}} = (\eta - \eta_0)/\eta_0$ ) и число вязкости  $\eta_{\text{уд.}}/C = (\eta - \eta_0)/\eta_0 C$  [1, 2, 12]. Характеристическую вязкость определяли методом графической экстраполяции величин  $\eta_{\text{уд.}}/C$  к нулевой концентрации. При этом получили линейные зависимости приведенной вязкости  $\eta_{\text{уд.}}/C$  от концентрации по уравнению Хаггинса:

$$\eta_{\text{уд.}}/C = [\eta] + K_x[\eta]^2 \times C.$$

Молекулярная масса определена согласно формуле

$$[\eta] = 1,41 \times 10^{-4} \times M_{\eta}^{0,83}.$$

### Определение степени деацетилирования хитозана

Степень деацетилирования (СДА) исходного и низкомолекулярного хитозана определяли методом кондуктометрического титрования в растворителе (0,1 н. соляная кислота) на приборе «Metler Tollo»». Для щелочного титрования был подготовлен 1%-й раствор хитозана. Степень деацетилирования хитозана определена по формуле:

$SDA = 203,3 \times 100 / (42 + 1000 \times m_0 / C_{NaOH} \times V_{NaOH})$ , где 203,3; 42; 100; 1000 – расчетные коэффициенты;  $m$  – навеска хитозана;  $V$  – объем расходуемого титранта NaOH, мл;  $C_{NaOH}$  – концентрация NaOH.

### Определение противомикробных свойств наноаскорбат хитозана

Посев производили в питательной среде: агар Чапека (состав, мг/л: сахараза – 30;  $NaNO_3$  – 2,0;  $KH_2PO_4$  – 1,0; KCl – 0,5;  $MgSO_4$  – 0,5  $FeSO_4$  – 0,01; pH 7,2).

В качестве тест-культур использовали коллекционные штаммы микромицетов, представляющие собой фитопатогены, возбудители болезни тутовника *Fusarium oxysporum*. Проводили также производственные опыты в богарных условиях Кашкадарьинской области на экспериментальных полях Научно-исследовательского института зерна и зернобобовых культур против пыльной и твердой головни. В качестве объекта выбраны семена озимой пшеницы сорта «Тезпишар», районированной в Республике Узбекистан. Исследования проводили на двух гектарах опытного поля в четырехкратной

повторности. В качестве эталона использовали препарат «Далтебу». Уровень заболеваемости был проанализирован в соответствии с эталоном и Наноаскорбат хитозаном. Для предпосевной обработки семян пшеницы путем капсулирования использовали 0,5%-й раствор наноаскорбат хитозана при соотношении компонентов ХЗ : АК = 4:1.

**Результаты и их обсуждение**

Полученные результаты подтверждают, что при соотношении низкомолекулярного хитозана (НМХЗ) и аскорбиновой кислоты (АК), равном 2:1, содержание аскорбиновой кислоты в составе НАХЗ составляет 16,5%, а при соотношении компонентов НМХЗ : АК = 4:1 массовая доля аскорбиновой кислоты снижается до 14,6%. Полученные данные представлены в табл. 1. Полученные результаты показывают, что с увеличением мольного соотношения исходного и низкомолекулярного хитозана в реакционных средах по сравнению с аскорбиновой кислотой и стабилизатором (триполифосфатом натрия) обнаружено увеличение степени связывания (СС) аскорбиновой кислоты и выхода реакции образования наноаскорбат хитозана. Замечено, что при использовании триполифосфата натрия в качестве стабилизатора наблюдается увеличение содержания и степени связывания аскорбиновой кислоты, что не только свидетельствует о взаимодействии аскорбиновой кислоты с хитозаном, но и подтверждает, что аскорбиновая кислота частично нейтрализуется ионами натрия, образующимися за счет диссоциации соли триполифосфата натрия.

**Результаты исследований атомно-силовой микроскопии (АСМ)**

Результаты атомно-силовой микроскопии (АСМ) подтверждают, что в полученных образцах наноаскорбат хитозана сформированы наночастицы размерами от 350 до 50 нм с равномерным распределением по поверхности (рис. 1, 2).

**Результаты ИК-спектроскопических исследований**

Структура полученных образцов исходного хитозана и наноаскорбат хитозана подтверждена методом ИК-спектроскопии на спектрометре «IR Bruker» (Германия). Полученные ИК-спектры приведены на рис. 3. В ИК-спектре исходного хитозана *Bombyx mori* выявлены основные характерные полосы поглощения при 1587 и 1640 см<sup>-1</sup>, соответствующие аминогруппам и ацетамидным группы макромолекул хитозана. Кроме того, в области 1420 см<sup>-1</sup> обнаружены соответствующие полосы деформационных колебаний для метиленовых групп. В диапазоне 3200–3350 см<sup>-1</sup> выявлены полосы поглощения, относящиеся к валентным колебаниям гидроксильных групп макромолекул хитозана. В ИК-спектре полученного наноаскорбата хитозана проявляется смещение полос поглощения в сторону меньших волновых чисел от 1587 до 1550 см<sup>-1</sup> по сравнению с полосами поглощения хитозана, что указывает на образование донорно-акцепторной связи аминогрупп исходного хитозана с енольными группами аскорбиновой кислоты.

Установлено некоторое различие при сопоставлении полос поглощения ацетамидных групп хитозана и карбонильных групп

Таблица 1

**Зависимость степени связывания хитозана с аскорбиновой кислотой при образовании наноаскорбат хитозана ( T = 25 °C, t = 30 мин) от соотношения компонентов (исходная концентрация аскорбиновой кислоты 0,05 моль/л)**

| Соотношение компонентов | Расчетная концентрация АК (C, %) | Концентрация ΔАК (C, %) | Степень связывания, % | Выход, C % | Размер частиц, нм |
|-------------------------|----------------------------------|-------------------------|-----------------------|------------|-------------------|
| НМХЗ:АК 2:1             | 35,3                             | 16,5                    | 46,7                  | 66,4       | –                 |
| НМХЗ:АК 3:1             | 26,7                             | 14,9                    | 56,0                  | 71,0       | –                 |
| НМХЗ:АК 4:1             | 21,4                             | 14,6                    | 68,4                  | 77,5       | 50–200            |
| НМХЗ:АК 5:1             | 17,9                             | 12,1                    | 67,6                  | 74,7       | –                 |
| ХЗ:АК:ТПФNa 4:1:0,25    | 21,4                             | 18,8                    | 87,8                  | 87,5       | 50–350            |
| ХЗ:АК:ТПФNa 3:1:0,5     | 25,0                             | 20,5                    | 82,0                  | 77,8       | 50–200            |



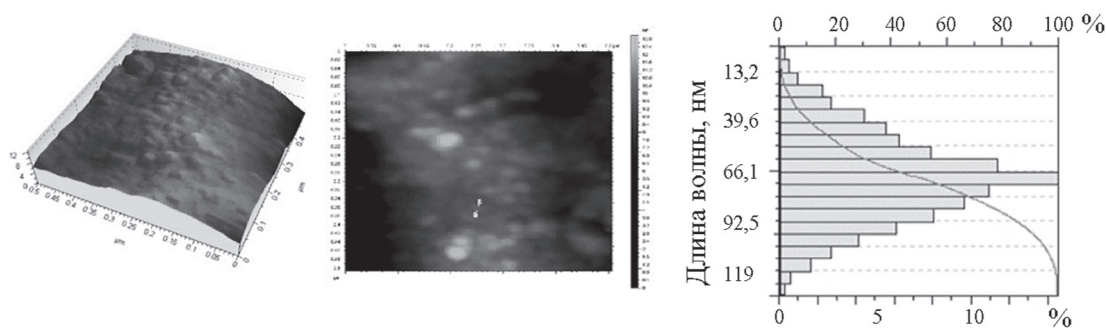


Рис. 1. Топография поверхности наночастиц наноаскорбат хитозана при соотношении компонентов 4:1, снятая атомно-силовым микроскопом «Agilent 5500» в полуконтактном режиме

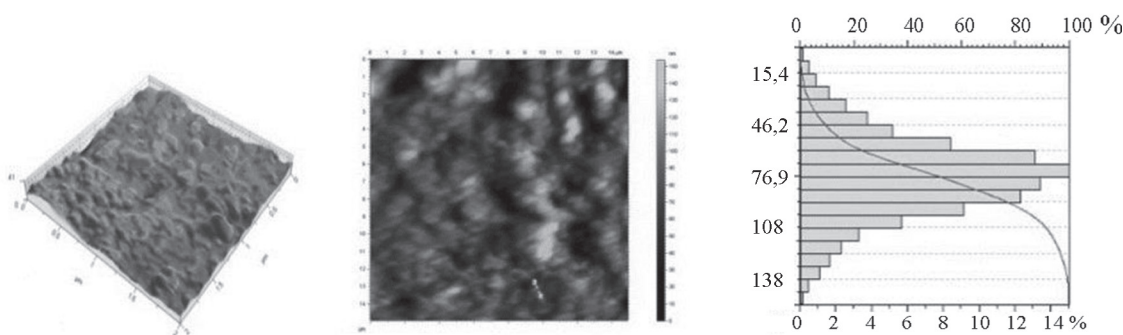


Рис. 2. Топография поверхности наночастиц наноаскорбат хитозана при соотношении компонентов 3:1:0,5, снятая атомно-силовым микроскопом «Agilent 5500» в полуконтактном режиме

аскорбиновой кислоты в области  $1624\text{ см}^{-1}$ . В диапазоне  $1400\text{--}900\text{ см}^{-1}$  проявляются полосы поглощения, характерные для хитозана. Изменение интенсивности и смещение характерных полос поглощения на ИК-спектре наноаскорбат хитозана в сравнении с ИК-спектром исходного хитозана свидетельствуют об образовании нанопроизводного хитозана – наноаскорбат хитозана.

### Противомикробные свойства НАХЗ

Проведены исследования по определению противомикробных свойств наноаскорбат хитозана к чистым культурам *Fusarium oxysporum*, вызывающим заболевания сельскохозяйственных растений, в частности тутовых деревьев. Поражаемость тутовника определена общепринятыми фитопатологическими и микологическими методами [13]. Штаммы *Fusarium oxysporum*, полученные из корней и стеблей растений, размножены в лабораторных условиях. Выделенные штаммы выращивали в чашках Петри с помощью искусственной питательной среды Чапека с агаром. В центр чашки Петри наливали 0,3 мл

анализируемых растворов НМХЗ, НАХЗ и препарата УЗХИТАН. Эксперименты проводили в трех повторностях при температуре  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Зона подавления определена через 6 дней после посева штамма. Полученные данные представлены в табл. 2. В результате исследований установлено, что использование наноаскорбат хитозана при соотношении низкомолекулярного хитозана и аскорбиновой кислоты, равном 4:1, позволяет получить наилучшие зоны подавления по сравнению с исходным НМХЗ. Необходимо отметить, что с увеличением концентрации наноаскорбат хитозана и низкомолекулярного хитозана происходит заметное увеличение зоны подавления. Кроме того, при изучении развития грибов установлено, что грибной мицелий не развивается вокруг зон подавления наноаскорбат хитозана.

Таким образом, в лабораторных условиях определены антимикробные свойства наноструктурных соединений НМХЗ и НАХЗ, а также препарата УЗХИТАН, синтезированных в Институте химии и физики полимеров на основе хитозана *Bombyx mori*. Полученные результаты подтверждают, что наноаскорбат хитозана при соотношении

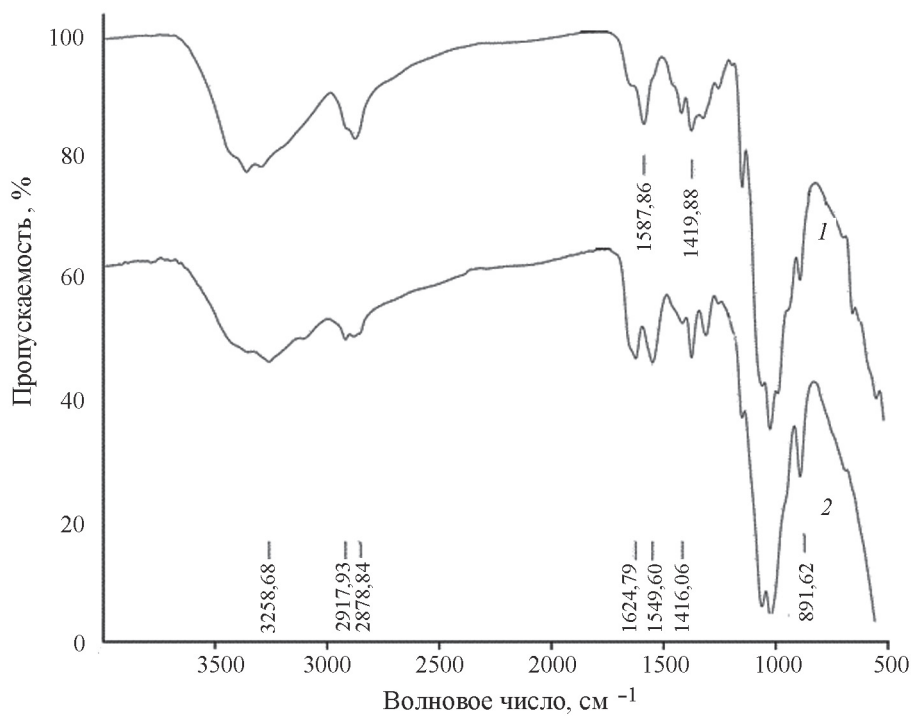


Рис. 3. ИК-спектры исходного хитозана *Bombyx mori* (1) и наноаскорбат хитозана *Bombyx mori* (2)

Т а б л и ц а 2

Влияние наноаскорбат хитозана на развитие *Fusarium oxysporum* на тутовнике

| Образцы         |                                  | Зона подавления, мм |    |     | Средняя зона подавления, мм |
|-----------------|----------------------------------|---------------------|----|-----|-----------------------------|
|                 |                                  | I                   | II | III |                             |
| УЗХИТАН         |                                  | –                   | –  | –   | –                           |
| НаноУзхитан     |                                  | 10                  | 10 | –   | 7,0                         |
| НАХЗ 4:1 (0,1%) | синтезирован на основе НМХЗ      | 20                  | 24 | 27  | 23,0                        |
| НАХЗ 4:1 (0,5%) |                                  | 35                  | 35 | 33  | 34,0                        |
| НАХЗ 2:1 (0,1%) |                                  | 16                  | 10 | 14  | 13,0                        |
| НАХЗ 2:1 (0,5%) |                                  | 20                  | 26 | 28  | 24,6                        |
| НМХЗ (0,1%)     |                                  | 32                  | 29 | 35  | 32,0                        |
| НМХЗ (0,5%)     |                                  | 36                  | 30 | 30  | 32,0                        |
| НАХЗ 4:1 (0,1%) | синтезирован в присутствии ТПФNa | 22                  | 24 | 28  | 24,6                        |
| НАХЗ 4:1 (0,5%) |                                  | 26                  | 20 | 30  | 25,3                        |

компонентов ХЗ : АК = 4:1 обладает лучшей по сравнению с эталоном зоной подавления культуры *Fusarium oxysporum* (34 мм). Отметим, что полученный наноаскорбат хитозана на основе низкомолекулярного хитозана также обладает большей зоной подавления по сравнению со всеми вариантами культуры *Fusarium oxysporum* тутовника, что дает возможность использования его при предпосевной обработке семян. Также установлено, что с увеличением концентрации

раствора от 0,1 до 0,5% происходит значительное увеличение антимикробных свойств наноаскорбат хитозана.

Изучены физико-химические характеристики наноаскорбат хитозана методами ИК- и АСМ-спектроскопии. Установлено, что смещенные полосы поглощения в области  $1550\text{ см}^{-1}$  на ИК-спектре наноаскорбат хитозана в сравнении с ИК-спектром исходного хитозана свидетельствуют об образовании наноаскорбат хитозана *Bombyx mori*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Милушева Р.Ю., Рашидова С.Ш. Хитин, хитозан *Bombyx mori* и наносистемы на их основе. Ташкент, 2016.
2. Пирниязов К.К., Рашидова С.Ш. // Наука и инновационное развитие. 2020. № 5. С. 47.
3. Pirniyazov K.K., Tixonov V.E., Rashidova S.Sh. // International J. Modern Agriculture. 2021. Vol. 10. N 2. P. 1244.
4. Пирниязов К.К. Синтез, свойства и применение аскорбат хитозана *Bombyx mori*: Дис. ... PhD. хим. наук. Ташкент, 2020. С. 67.
5. Sekara V., Rajendrana K., Vallinayagama S., Deepakb V.S. // J. Industrial and Engineering Chemistry 62 (2018) 239–249 (<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.01.001>).
6. Shipovskaya A.B., Zudina I.V., Fomina V.I., Malinkina O.N. // Butlerov Communications. 2015. Vol. 41. N 3. P. 82.
7. Farhatun N.M., Mohd Z.H. // Molecules. 2020. N 25. P. 1611 (Doi:10.3390/molecules25071611).
8. Рашидова Д.К., Амантурдиев Ш.Б. // Аграрный вестник Узбекистана. 2020. № 1. С. 26.
9. Silvia R., Barbara V. et al. // Mar. Drugs. 2017. N 15. P. 319 (DOI: 10.3390 / md15100319).
10. Altınışık A.T. et al. // Hacettepe J. Biol. Chem. 2018. Vol. 46. N 1. P. 69 (<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.01.001>).
11. Pirniyazov K.K., Tixonov V.E., Rashidova S.Sh. // Bulletin of the Karaganda University Chemistry Series. 2021. N 1 (101). P. 91 (<https://doi.org/10.31489/2021Ch1/91-98>).
12. Pirniyazov K.K., Rashidova S.Sh. // Bulletin of the Karaganda University chemistry series. 2020. № 3 (99). P. 38 (DOI 10.31489/2020Ch3/38-43).
13. Пименова М.Н., Гречушкина Н.Н., Азова Л.Г., Семенова Е.В., Мыльникова С.И. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Практическое пособие / Под ред. Н.С. Егорова. М., 1983. С. 130.

## Информация об авторах

Кудрат Кадамбаевич Пирниязов – мл. науч. сотр. Института химии и физики полимеров АН РУз ([qudratpirniyazov8875@gmail.com](mailto:qudratpirniyazov8875@gmail.com));

Дилором Ибрагимовна Асракулова – мл. науч. сотр. Института химии и физики полимеров АН РУз ([a.dilorom@inbox.ru](mailto:a.dilorom@inbox.ru));

Сайёра Шарафовна Рашидова – директор Института химии и физики полимеров АН РУз, докт. хим. наук, проф., академик ([polymer@academy.uz](mailto:polymer@academy.uz)).

## Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Соблюдение этических стандартов

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных.

Статья поступила в редакцию 16.09.2022;  
одобрена после рецензирования 16.01.2023;  
принята к публикации 16.02.2024.