

ПОЛУЧЕНИЕ ХИТОЗАН-МЕЛАНИНОВОГО КОМПЛЕКСА ИЗ ПОДМОРА ПЧЕЛ И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ДИСБАКТЕРИОЗА МОЛОДНЯКА ЖИВОТНЫХ

Н.В. Позарская, М.И. Селионова

Ставропольский научно-исследовательский институт животноводства
и кормопроизводства РАСХН, Ставрополь, E-mail: niizhk@stv.runnet.ru

PRODUCTION OF CHITOSAN-MELANIN COMPLEX FROM DEAD BEES AND ITS USE FOR PREVENTION OF DISBACTERIOSIS OF YOUNG ANIMALES

N.V. Pogarskaya, M.I. Selionova

Stavropol Research Institute of Animal Husbandry and Feed Production,
Stavropol, E-mail: niizhk@stv.runnet.ru

ABSTRACT

The aim of the present study was to develop the technology of making of chitosan-melanin complex from dead bees. The optimal combination of process temperature, alkali concentration and mass-ratio of studied substances was found. Chitosan output in these conditions was over 22%. Supplementary reaction of melanin precipitations from used alkali solutions was suggested. Use of chitosan-melanin complex favours to decrease a quantity of microorganisms of genera *E. Coli*, *Proteus*, *Citrobacter*. Also, chitosan-melanin complex increases energy of growth and level of common pathogen resistance of animals.

В последнее время большие перспективы для применения в животноводстве представляют препараты на основе хитина. Эти природные полимеры имеют ряд интереснейших свойств: обладают высокой биологической активностью, совместимостью с тканями животных, оказывают иммуностимулирующее, противоопухолевое, бактериостатическое, ранозаживляющее действие. Среди производных хитина выделяется биологически активное вещество — хитозан.

Основу для промышленного производства хитина и хитозана в настоящее время представляют панцири промысловых ракообразных. Однако в силу того, что их основная база в России находится на Дальнем Востоке, и из-за некоторых особенностей сырья активно ведутся поиски новых источников получения хитина и хитозана. Одним из их перспективных сырьевых поставщиков может стать медоносная пчела, которая в силу своего быстрого воспроизводства может обеспечить большую биомассу. Кроме того, одновременное содержание в пчелином подморе хитина, воскоподобных веществ, витаминов и меланина делает разработку технологии извлечения биологически активных веществ еще более перспективной. Следует отметить, что получение меланина путём химического синтеза затруднено и весьма дорогостояще, поэтому более перспективным является его получение из сырья природного происхождения. Доказано, что меланин оказывает неспецифическое воздействие на организм и имеет свойства антиоксиданта, гепа- и радиопротектора, антимутагена [1].

С.В. Немцев и соавт. [2] в своих работах пришли к выводу, что хитозан-меланиновый комплекс имеет ряд существенных преимуществ перед традиционным хитином, добываемым из панцирей ракообразных.

В связи с этим в лаборатории БАВ СНИИЖК проводятся исследования по разработке технологии извлечения хитозана из подмора пчел и создание на его основе препарата для профилактики заболеваний желудочно-кишечного тракта молодняка сельскохозяйственных животных.

Для оптимизации этапов получения конечных продуктов были определены параметры исходного сырья. Исследование подмора пчел, полученного в разные годы, выявило его стабильность по содержанию белка (45–50%), минеральных веществ (2–3%), хи-

тина (22–26%), меланинов (10–12%) отсутствию липидов и некоторую вариабельность в содержании воскоподобных и других веществ (5–17%).

В лабораторных условиях экспериментально установлено оптимальное соотношение исходного сырья и экстрагента, его концентрация в стадии депротеинирования и дезацетилирования, температурный и временной режимы депротеинирования. Это позволило отработать технологию одновременного получения хитозан-меланинового комплекса и меланина из подмора пчел, пригодную для выделения этих соединений. Отработанный и оптимизированный процесс получения данных биологически активных веществ включает в себя несколько стадий, выполнение которых проводится без отделения и промывания промежуточных соединений, что значительно повышает процентный выход БАВ.

Предварительно высушенный до влажности 3–4% пчелиный подмор растирают в ступке (в лабораторных условиях) или в барабанной мельнице (при крупномасштабном производстве) до размера частиц 3–4 мм. В полученный порошок добавляют 10%-ный раствор NaOH в соотношении 1:10 по массе и проводят дезацетилирование при постоянном перемешивании при $t = 78–82\text{ }^{\circ}\text{C}$ в закрытом сосуде без доступа воздуха в течение 1,5 ч. Затем после охлаждения в тот же сосуд в том же количестве добавляют 50%-ный раствор NaOH доводя, таким образом концентрацию NaOH до 30% от исходной, и проводят процесс дезацетилирования полученного хитозана в закрытом сосуде без доступа воздуха при $t = 90–97\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1,5–2,0 ч при периодическом помешивании.

Для выделения хитозан-меланинового комплекса полученный гидролизат отфильтровывают на воронке Бюхнера. Промывают хитозан-меланиновый комплекс до нейтральной реакции промывных вод ($\text{pH} = 7$). Поскольку меланины хорошо растворяются в щелочной среде, в отделенном щелочном растворе после стадий депротеинирования и дезацетилирования содержится основное их количество, кроме меланинов, связанных в комплекс с хитозаном. Поэтому щелочной раствор оставляют для осаждения из него меланинов. Их извлечение из щелочного экстракта проводится осаждением концентрированной соляной кислотой до изменения pH среды в кислую область.

Отделение осажденных меланинов проводят центрифугированием раствора при 5000 об/мин в течение 15 мин. Полученный меланин промывают до нейтральной реакции промывных вод с последующим центрифугированием и сушкой. Полученный меланин сушат одновременно с хитозан-меланиновым комплексом в сушильном шкафу при $t = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Применение данной технологической схемы позволило получить выход хитозан-меланинового комплекса около 24% по массе от исходного сырья и сохранить меланины на 86–92% от их содержания в исходном подморе пчел.

Макро- и микроэлементный анализ полученного комплекса выявил высокое содержание органических форм фосфора — 846,2, железа — 194,0 и магния — 45,8 мг/кг.

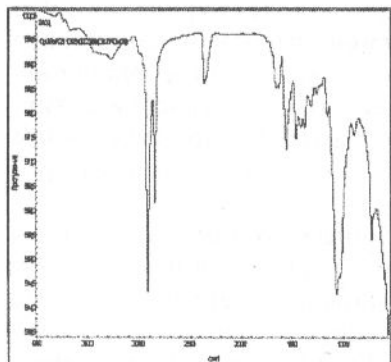
Интерпретация ИК-спектров экспериментальных образцов хитозан-меланинового комплекса и выделенных меланинов, на которых регистрировались полосы поглощения сопряженных углеродных связей при 1650 см^{-1} , карбоксильных — 1736 см^{-1} и 1712 см^{-1} , гидроксильных — 3288 см^{-1} и 1170 см^{-1} , валентных колебаний метильных и метиленовых групп в области $2900–2800\text{ см}^{-1}$, деформационных колебаний аминогруппы — 1600 см^{-1} подтвердила их групповую принадлежность к полимерам — хитозану и меланинам животного происхождения (рис.). Данные ИК-спектроскопии могут быть использованы для идентификации получаемых биологически активных веществ.

Применение хитозан-меланинового комплекса и меланина из подмора пчел приобретает популярность в разных областях: медицине, косметологии, сельском хозяйстве и, в частности, в ветеринарии [3, 4].

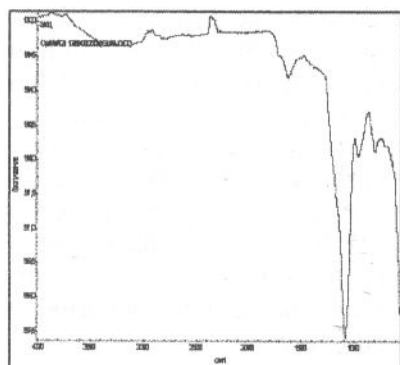
С целью обоснования возможности и эффективности использования хитозан-меланинового комплекса в качестве основы ветеринарных препаратов для профилактики и лечения дисбактериозов молодняка сельскохозяйственных животных были проведены микробиологические исследования и определение острой токсичности.

Исследования, проведенные в соответствии с ГОСТ 25311-82, не выявили присутствия в комплексе микроорганизмов родов сальмонелл, протей, кишечной и синегнойной палочки, золотистого стафилококка, а также токсинообразующих анаэробов, аспергилловых грибов и дрожжей рода *Candida*.

ИК-спектр: а) хитозан-меланинового комплекса, б) меланина, полученных из подмора пчел



а



б

Определение острой токсичности проводили по методу Кербера, путем расчета LD_{50} . Полученные экспериментальные данные позволили отнести полученный нами хитозан-меланиновый комплекс из подмора пчел в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 к 4-му классу веществ по степени опасности и токсичности и к малотоксичным веществам в соответствии с общепринятой классификацией.

Эффективность применения хитозан-меланинового комплекса в качестве основы ветеринарного препарата, поддерживающего необходимый положительный бактериальный баланс кишечника молодняка сельскохозяйственных животных, путем снижения количества условно-патогенной микрофлоры и повышающего общую резистентность организма, была подтверждена нами в серии опытов, проведенных на телятах, поросятах.

Хитозан-меланиновый комплекс выпаивали в различных дозах: 10 и 20 мг на кг живой массы (соответственно I и II опытная группы).

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что использование комплекса в первые дни жизни способствовало значительному снижению (на 25–30%) заболеваемости молодняка сельскохозяйственных животных желудочно-кишечными инфекциями с диарейным синдромом. Анализ гематологических и биохимических показателей выявил стимулирующий эффект комплекса на факторы неспецифической резистентности уже

на 14 сут после использования. В крови животных опытных групп на 25,8% ($P < 0,01$) было меньше содержание лейкоцитов, но выше концентрация гемоглобина, общего белка соответственно на 9,6 и 14,9% ($P < 0,05$).

Одновременно гуморальное звено иммунной системы отреагировало увеличением показателей лизоцимной и бактерицидной активности, уровень которых повысился по сравнению с контролем на 7,3 и 19,7%. Следует отметить десенсибилизирующее свойство хитозан-меланинового комплекса, проявившееся существенным снижением в крови животных опытных групп циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) на 20,1% ($P < 0,01$).

Применение комплекса также приводило к значительному снижению в кишечнике молодняка сельскохозяйственных животных количества микроорганизмов рода *E. Coli*, *Proteus*, *Citrobacter* соответственно на 48,0; 12,1 и 8,3%.

Помимо положительного влияния на факторы неспецифической защиты организма и микрофлору кишечника, выпойка хитозан-меланинового комплекса стимулировала увеличение живой массы и среднесуточных привесов в ранний период онтогенеза. Разница по живой массе и среднесуточным привесам между животными, которым выпаивался комплекс, и животными контрольной группы в 30 дней после использования препарата составила 8,6 и 6,0% ($P < 0,05$).

Таким образом, обобщая данные проведенных исследований, можно сделать заключение о том, что использование хитозан-меланинового комплекса в дозе 10–15 мг на кг живой массы способствует нормализации желудочно-кишечной микрофлоры, активизации иммунных реакций, повышению защитных свойств организма, что, в свою очередь, оказывает благоприятное влияние на рост и развитие молодняка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов А.Ю., Сидоренко З.Н. Биотехнология пигмента меланина // Московский международный конгресс: Биотехнология: состояние и перспективы развития. Москва, 2004. С. 96.

2. Пчела как потенциальный источник хитозана / *Немцев С.В., Зуева О.Ю., Хисматуллин Р.Г., Хисматуллин М.Р., Варламов В.П.* // Новые достижения в исследованиях хитина и хитозана: Материалы 6-й Междунар. конф. Москва–Щёлково, 22–24 окт. 2001 г.— М.: Изд-во ВНИРО, 2001. 398 с.

3. *А.И. Албулов, Е.В. Крапивина, А.В. Борода* и др. Влияние скармливания хитозана и фитохитодеза на резистентность организма телят // Достижения науки и практики АПК. 2004. № 3. С. 24–27.

4. *Ю.П. Фомичев, Р.Г. Шайдуллина, Ю.Н. Федоров* и др. Резистентность и интенсивность роста телят под влиянием хитозана // Сельскохозяйств. биология. 2004. № 2. С. 89–94.