



APIS MELLIFERA ASOSIDA OLINGAN XITIZANNING XUSUSIYATLARI

Xabibullayeva N.F.¹, Xaitbayev A.X.²

¹Toshkent Davlat Tibbiyot universiteti o'qituvchisi

²Mirzo Ulug'bek nomidagi O'zbekiston Milliy universiteti professori

E-mail: habibullayeva.nozima 1996@mail.ru

Annotatsiya. So'nggi vaqtlarda biomaslik, bioparchalanuvchanlik, saraton, bakteriya va zamburug'larga qarshi yuqori biologik faolliklarni namoyon qiluvchi xitin va uning muhim hosilasi xitizanga bo'lgan talab, yangi xomashyo manbaalarini aniqlash va foydalanilish sohalarini kengaytrishga doir ko'plab tadqiqotlar amalga oshirilmoqda. Shu maqsadda olib borgan tadqiqotimiz davomida mahalliy xomshyo manbaasi *Apis mellifera* asosida xitin va undan xitizan olishni, olingan moddalarning tuzilishi va termik xossalari IQ, TGA/DSC usullari yordamida o'rganishni maqsad qilib oldik.

Kalit so'zlar: Xitin, xitizan, α -xitin, IQ spektroskopiya, termogravimetriya, differensial skanerlovchi kalorimetriya

Аннотация. В последние годы проведено множество исследований, посвящённых изучению биосовместимости, биоразлагаемости и высокой биологической активности хитизана в противоположность раковым клеткам, бактериям и грибкам. Особое внимание уделяется хитину и его важному производному - хитизану - в контексте поиска новых источников сырья и расширения областей их применения. В рамках наших исследований с целью достижения указанных целей мы поставили задачу получения хитина и хитизана из местного сырья - пчёл (*Apis mellifera*), а также изучения их структурных и термических свойств посредством методов ИК-спектроскопии, термогравиметрии и дифференциальной сканирующей calorиметрии.

Ключевые слова: хитин, хитизан, ИК-Фурье-спектроскопия, термогравиметрия, дифференциальная сканирующая calorиметрия.

Annotation. Recently, numerous studies have been conducted on the demand for biocompatibility, biodegradability, and high biological activity against cancer, bacteria, and fungi, as well as the demand for chitin and its important derivative, chitosan, to identify new sources of raw materials and to expand the fields of use. During our research for this purpose, we aimed to obtain chitin and chitosan from the local raw material *Apis mellifera*,

to study the structure and thermal properties of the obtained substances using IR and TGA/DSC methods.

Keywords: Chitin, chitosan, FTIR spectroscopy, thermogravimetry, differential scanning calorimetry.

Kirish. So‘nggi vaqtlarda tabiiy polisaxaridlar (polimerlar) dan olingan mahsulotlarga talab ortib bormoqda. Chunki ular bioparchalanish, biomoslik, saraton, bakteriya va zamburug‘larga qarshi faolliklari va shunga o‘xshash ko‘plab xossalarni namoyon qilganligi uchun keng foydalanilish sohalariga ega. Nafaqat tabiiy polisaxaridlar, balki ularning biosintetik polimerlari ham biologik parchalanadi va atrof-muhitga zarar keltirmaydi. Bu xildagi polisaxaridlarga alginat, karraginan, agaroz, glyukomannon, galaktomannon, pektin, xitin va xitozan, gialuron kislota hosilalari va boshqalar kiradi [1]. Nontoksiklik, biomoslik, bioparchalanuvchanlik, ko‘plab terapevtik xossalar (antioksidant, mikrob va zamburug‘lar, o‘simta va rak hujayralariga qarshi faolliklari yuqoriligi, og‘riq qoldiruvchi, qon to‘xtatuvchi va boshqalar) ga egaligi uchun biotibbiyot, farmatsevtika, kosmetologiya va oziq-ovqat sanoatida qo‘llash maqsadida xitin va xitozan poliaminosaxaridlariga bo‘lgan qiziqishlar tobora ortib bormoqda [2,3]. Tabiatda xitin turli xildagi organizmlar infuzoriya, amyoba, xrizofitlar, ayrim algae suvo‘tlari, zamburug‘lar, qisqichbaqasimonlar, chuvalchanglar, hasharotlar va molluskalar tarkibida, zamburug‘ va mikroorganizmlar (bakteriya) ning hujayra devorlarida uchraydi [4,5]. Xitozan tabiatda zigomitset va mukoral, *Absidia coerulae* ga o‘xshash ayrim zamburug‘lar tarkibida uchraydi [6]. Dunyo miqyosida xitin va xitozan asosan qisqichbaqasimonlar tarkibidan ajratib olinadi, so‘nggi vaqtlarda hasharotlar kutikulasidan olishga doir ko‘plab tadqiqotlar amalga oshirilmoqda [7]. Bu xildagi homashyo manbaalaridan sanoat miqyosida foydalanish ayrim noqulayliklarga ega bo‘lsada, hasharotlarning ayrim xillaridan katta miqdorda xitin olishda foydalanish mumkin. Bular sun‘iy ravishda ko‘paytirish mumkin bo‘lgan hasharotlardir (asalari, ipak qurti va pashsha). Hasharotlar kutikulasida uchraydigan xitin moddasi melanin va sklerotinga o‘xshash proteinlar bilan kovalent bog‘langan bo‘ladi [8], bu esa xitinni ajratib olish jarayonida ayrim muammolarni keltirib chiqarishi mumkin. Shuningdek, hasharotlarning xitin qobig‘ida turli xil pigmentlar uchraganligi uchun rangsizlantirish jarayonini ham amalga oshirish lozim. Respublikamizda asalarichilik birmuncha rivojlanganligi, asalari (*Apis mellifera*) lardan xitin manbaasi sifatidan foydalanishimizga imkoniyat beradi. Shu maqsadda *Apis mellifera* dan dastlab xitinni ekstraksiya qilib, so‘ngra xitinni deatsetillash orqali xitozan oldik va tuzilishini o‘rganish maqsadida fizikaviy-tadqiqot usullari (IQ, TGA/DSC) dan foydalandik. Spektroskopiya usullari yordamida tarkibi va termogravimetrik usul orqali termik xossalarini tahlil qildik.

Materiallar va metodlar

Apis mellifera dan xitozanni ekstraksiya qilish

Ma‘lum miqdordagi quritib maydalangan *Apis mellifera* tortib olindi va distillangan suv quyib, 70-80°C da 1 soat davomida qizdirildi. Keyin filtrlandi va quritgichda 60°C da 24 soat davomida quritildi. So‘ng suvli 0.1 N HCl eritmasida 70-80°C da 1 soat davomida

qizdirildi, filtrlab suv bilan neytral muhitgacha yuvildi. Keyin quritgichda 60°C da 24 soat davomida quritildi. Deproteinlash maqsadida olingan modda 0.1N NaOH eritmasida 70-80°C da 1 soat davomida qizdirildi va filtrlab, neytral muhitgacha yuvildi va quritgichda 60°C da 24 soat davomida quritildi. Olingan moddani rangsizlantirish (depigmentatsiyalash) maqsadida 30% H₂O₂ eritmasida 24 soat davomida saqlandi. Olingan oqish tusdagi xitin plastinkalari quritgichda 60°C da 24 soat davomida quritildi. Ekstraksiya qilingan xitin, 40% li NaOH eritmasida 70-80°C da 4 soat davomida qizdirildi. Olingan xitozan (deatsetillangan xitin) filtrlandi, neytral muhitgacha yuvildi va quritgichda 60°C da 24 soat davomida quritildi.

IQ-spektroskopiya

Apis mellifera asosida olingan xitin va xitozan tuzilishi chastotasi diapazoni 4000-650 cm⁻¹ bo‘lgan Perkin-Elmer FTIR spektrofotometer yordamida tahlil qilindi.

Termogravimetrik analiz (TGA)

Namunalarning termik barqarorligini aniqlashda TGA – Q500 (TA Instruments, USA) dan foydalanildi. Analiz jarayonida 5 mg og‘irlikdagi namunalar 10 °C/min tezlik, N₂ atmosferasi (60 ml·min⁻¹) da, 30–900 °C harorat intervalida, platinali tigel yordamida amalga oshirildi.

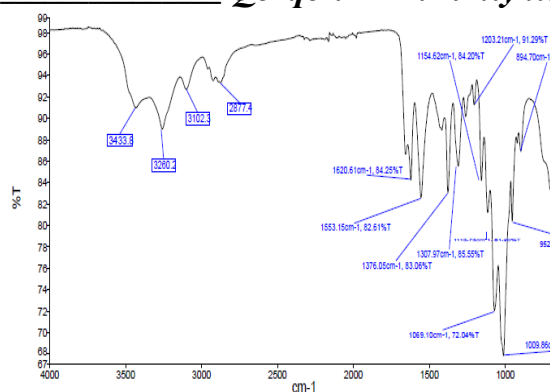
Differensial skanerlovchi kalorimetriya (DSC)

Namunalarning termik xossalarini tasniflashda DSC Mettler Toledo (DSC822e, USA) dan foydalanildi. 2-5 mg og‘irlikdagi namunalar N₂ atmosferasi (60 ml·min⁻¹) da, 0–400 °C harorat intervalida, alyuminiyli tigel yordamida amalga oshirildi.

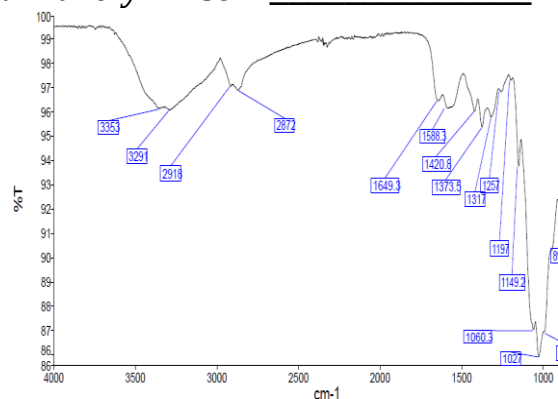
Skanerlovchi electron mikroskop (SEM)

Xitin va xitozan namunalarining morfologiyasi SEM - EVO MA 10 (Zeiss, Germaniy) yordamida o‘rganildi. Elektron skanerlash mikroskopida tajribalar quyidagi tarzda amalga oshirildi. Namuna tayyorlash jarayonini amalga oshirish uchun metall qotishmasidan yasalgan dumaloq ushlagichga sinov namunasining kukuni surtili, uning ustiga ikki tomonlama yopishqoq yuzasi bo‘lgan aluminiy folga yoki alohida namunadagi parcha (5x5 mm o‘lchamda) yopishtirildi. Keyin ushbu ushlagich mikroskopning ob‘ektiga o‘rnatildi. O‘lchov paytida 15.00 kV kuchlanishli tezashtiruvchi kuchlanish (EHT - Extra High Tension) qo‘llanildi, ish masofasi (WD - working distance) 8,5 mm. Tasvirlar Smart SEM dasturi yordamida 20 mikrondan - 1 mm gacha bo‘lgan turli xil o‘lchamlarda amalga oshirildi.

Tahlil va natijalar. Tadqiqotimiz davomida *Apis mellifera* asosida dastlab xitin, so‘ng xitozan moddasi ajratib olindi va olingan moddalar tuzilishi FTIR spektroskopiya usuli yordamida tahlil qilindi. Quyida olingan natijalar keltirilgan.



Rasm-1. *Apis mellifera* asosida olingan xitin IQ spektri



Rasm-2. *Apis mellifera* asosida olingan xitozan IQ spektri

Apis mellifera asosida olingan xitinning IQ spektri 1-rasmda keltirilgan bo'lib bunda α -xitinning amid I band ikkita cho'qqidan iborat bo'ladi [8]. Ajratib olingan xitinning amid I band 1652 va 1620.61 cm^{-1} da 2 ta cho'qqidan iboratligi ekstraksiya qilingan xitin α shaklida ekanligini ko'rsatadi. Xitinning IQ spektri o'rganilganda shuningdek, quyidagi signallar ham kuzatildi: 3433 cm^{-1} (O-H valent), 3102.3-3260.2 cm^{-1} (N-H valent), 2877.4 cm^{-1} (piranoza xalqasidagi metilen guruhlar); 1553.15 cm^{-1} (amid II), 1430 cm^{-1} (CH_2 bending and CH_3 deformatsion), 1307.97 cm^{-1} (CH_2 wagging), 1154.62 cm^{-1} (asymmetric bridge oxygen stretching), 1115 cm^{-1} (asymmetric in phase ring stretching mode), 1069.10 cm^{-1} (saccharide rings), 1009.86 cm^{-1} (C-O asym. stretch in phase ring), 952.20 cm^{-1} (along chain) and 894.70 cm^{-1} (saccharide rings). Signallarda yuz beruvchi o'zgarishlar polimer zanjirining uzunligi va molekulyar massaning kamayishidan dalolat beradi [9,10].

Deatsetillash jarayoni yordamida olingan xitozanning IQ spektridagi asosiy o'zgarishlar 1650 va 1590 cm^{-1} sohalarda yuz beradi. 1590 cm^{-1} band paydo bo'lishi va kengayganligi, 1650 cm^{-1} banddagi intensivlik kamayishi deatsetillanish jarayoni ancha yaxshi ketganligi va xitozan hosil bo'lganligidan darak beradi [9,11]. Tadqiqotimiz davomida ekstraksiya qilingan xitozanning IQ spektrida 1649.3 va 1588.3 cm^{-1} sohalarda signallar hosil bo'lib bu o'zgarishlar adabiyotlarda keltirilgan ma'lumotlar bilan mos keladi. Shuningdek 900-1100 cm^{-1} sohadagi yutilish signallari intensivliklarining o'zgarishi deatsetillanish jarayonida polimer zanjiri uzunligi va molekulyar massasining kamayganligidan darak beradi [9]. *Apis mellifera* dan ekstraksiya qilib olingan xitozan FTIR spektrida quyidagi sohalarda ham signallar kuzatildi: 3353, 3291, 2918, 2872, 1649.3, 1588.3, 1420.8, 1373.5, 1317, 1257, 1197, 1149.2, 1060.3, 1027, 992.44, 893.8, 672.71, 661.56 va 656.24 cm^{-1} .

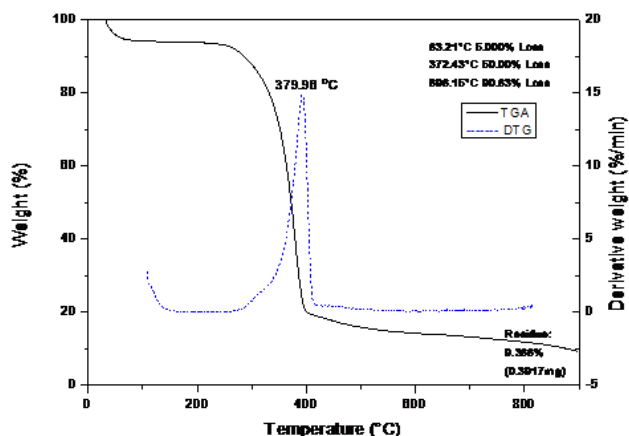
Tadqiqotimiz davomida olingan *Apis mellifera* dan olingan xitin termogrammasi (3-rasm) dan ko'rishimiz mumkinki, uch xil temperatura intervalida massa yo'qotilishi kuzatilgan. Dastlab 40-100 $^{\circ}\text{C}$ da 5% massa yo'qotilishi xitinga adsorbsiyalangan va vodorod bog'lar orqali bog'langan suvning bug'lanishi hisobiga kuzatilgan. Keyingi massa yo'qotilishi 245-400 $^{\circ}\text{C}$ da 50% massa yo'qotilishi glikozid bog'lar uzilishi hisobiga polimer zanjirining depolimerlanishi va molekula saxarid strukturasining parchalanishi, ya'ni saxarid xalqalarning degidratlanishi, atsil guruhlarining ajralishi hisobiga yuz bergan. Adabiyotlardan

olingan ma'lumotlarga ko'ra, 250-450⁰C oralig'idagi massa yo'qotilishida quyidagilar hosil bo'ladi: H₂O, NH₃, CO, CO₂, CH₄ va CH₃COOH. Bu vaqtda xitin tarkibidagi amino guruhlar ikki xil yo'l bilan ajralib chiqishi mumkin: ammiak ajralishi va geteroatomli xalqalar hosil bo'lishi bilan sodir bo'lishi, bu jarayonlar glikozid bog'larning tasodifiy uzilishi orqali biopolymer parchalanishini tasdiqlaydi. Oxirgi bosqichdagi massa yo'qotilishi 896⁰C da 90% bo'lgan umumiy massa yo'qotilishi piranoza xalqasining termik parchalanishi va qoldiq uglerodning ajralib chiqishiga to'g'ri keladi [10,11]. 900⁰C gacha qizdirilgandan keyin qoldiq massa ulushi 9.36% ni tashkil etdi va bu ma'lum miqdorda minerallar borligini ko'rsatadi.

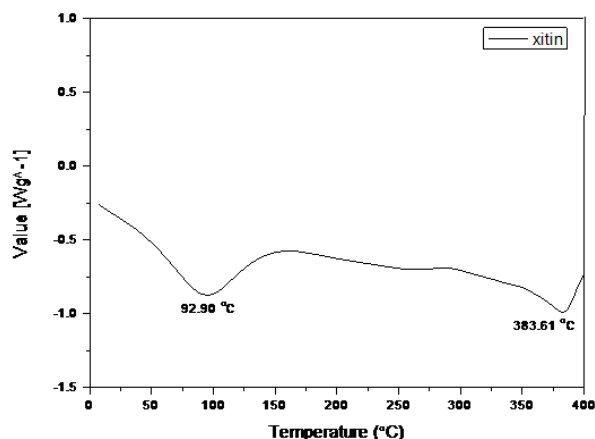
Differensial termogramma (DTG) dan xitinning maksimal parchalanish harorati (DTG_{max}) 379.96⁰C ni tashkil etdi.

DSC moddalarning issiqlik ta'sirida fazaviy o'zgarishlarini kuzatish orqali termik xossalarini o'rganish imkonini beruvchi usul hisoblanadi. Yutilgan va chiqarilgan energiya miqdori vaqt va haroratga nisbatan o'lchanadi. Bu usul moddalarning tozaligi, termik barqarorligi, parchalanishi va kimyoviy reaksiyalarni aniqlashda muhim ahamiyatga ega [12].

Xitinning DSC termogrammasi (4-rasm) da 33-143⁰C oralig'ida 92.90⁰C da hosil bo'lgan endotermik cho'qqi polimer zanjiriga bog'langan va yutilgan suvning bug'lanishi hisobiga kuzatilgan. Maksimal parchalanish harorati 383.61⁰C da yuz bergan, chunki xitin polimer strukturasi atsetil guruhlar miqdori yuqori. Termik parchalanishga kristallik darajasi, o'lcham va polimerning kimyoviy strukturasi ta'sir ko'rsatadi. Kristallik darajasining ortishi parchalanish haroratining oshishiga sabab bo'ladi [13].



Rasm-3. Apis mellifera asosida olingan xitinning TGA/DTG termogrammasi

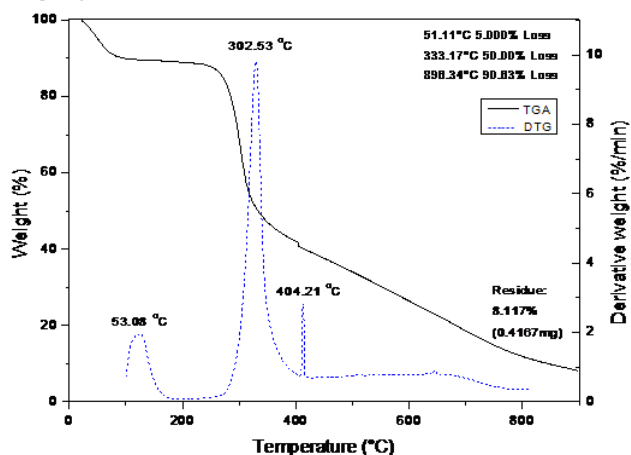


Rasm-4. Apis mellifera asosida olingan xitin (DSC) termogrammasi

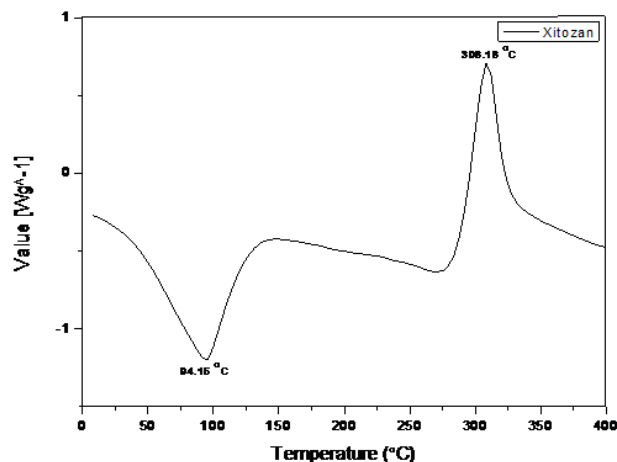
Tadqiqotimiz davomida olingan xitozan termogramma (TGA) sida (5-rasm) uchta parchalanish bosqichlari kuzatilgan. Dastlab 40-100⁰C oralig'ida 51.11⁰C da eng yuqori 5% massa yo'qotilishi suvning bug'lanishi hisobiga, keyingi massa yo'qotilishi 230-400⁰C oralig'ida 337.17⁰C da eng yuqori 50% massa yo'qotilishi xitozanning termik va oksidlanib parchalanishi, bug'lanish va uchuvchan mahsulotlarning ajralishi hisobiga kuzatilgan. Adabiyotlardan olingan ma'lumotlarga ko'ra, polisaxaridlarning pirolizi glikozid

bog'larning tasodifiy bo'linishi bilan boshlanadi, keyin sirka, moy va bir qator quyi yog' kislotalari ajralib chiqadi. Bunda C2, C3 va C6 uglerod atomlari ustunlik qiladi [14].

Oxirgi bosqichdagi massa yo'qotilishi 896.34°C da 90% bo'lgan. Differensial termogramma (DTG) dan ko'rishimiz mumkinki xitozanning maksimal parchalanish harorati (DTG_{max}) 302.53°C ga teng va bu xitinning xitozanga nisbatan termik barqarorligini ko'rsatadi. Bu sohadagi parchalanish molekulaning deatsetillangan qismi parchalanishi hisobiga yuz beradi [11].



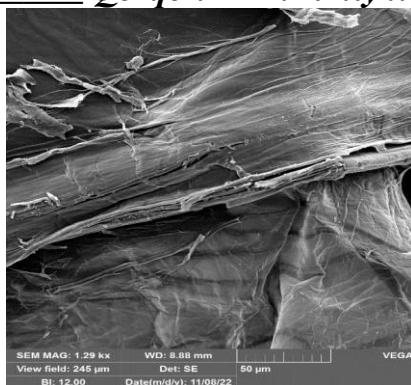
Rasm-5. Apis mellifera asosida olingan xitozan (TGA/DTG) termogrammasi



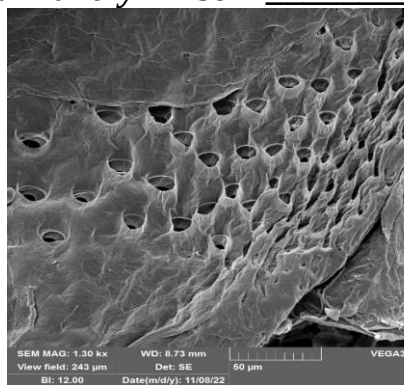
Rasm-6. Apis mellifera asosida olingan xitozan (DSC) termogrammasi

Xitozanning DSC termogrammasi (6-rasm) da $35-125^{\circ}\text{C}$ oralig'ida 94.15°C da hosil bo'lgan endotermik cho'qqi suvning bug'lanishi hisobiga kuzatilgan. Xitin (4-rasm) va xitozan endotermik cho'qqilarida farqlar kuzatilishi makromolekulalarning suvni saqlash qobiliyati va suv-polimer ta'sirlashuvdagi farqlar sabab kuzatiladi. Xitindan farqli ravishda xitozanda maksimal parchalanish harorati 308.18°C ga to'g'ri kelgan ekzotermik cho'qqi kuzatilishi amino guruhlarining ajralib chiqishini harakterlaydi. Olingan natijalardan ko'rishimiz mumkinki, xitozan tarkibida atsetil guruhlar miqdori kamligi sababli xitinga nisbatan termik barqarorligi kam [12, 13].

Tadqiqotimiz davomida olingan xitin va xitozan topografik xususoyatlarini tahlil qilish maqsadida olingan SEM tasvirlaridan (7-rasm) ko'rishimiz mumkinki, xitin deatsetillanishi natijasida olingan xitozanning sirt yuzalarida modifiaksiyalanish yoki sorbsion xossalarini oshirishi mumkin bo'lgan g'ovaklar hosil bo'lgan. Bundan ko'rishimiz mumkinki, xitin deatsetillanishi natijasida atsetil guruhlar chiqib ketishi bilan bir qatorda uning sirt yuzalarida ham o'zgarishlar sodir bo'lar ekan.



a)



b)

Rasm-7. *Apis mellifera* asosida olingan xitin (a) va xitozan (b) SEM tasvirlari

Xulosalar

1) *Apis mellifera* asosida ekstraksiya qilib olingan xitin va xitozanning strukturalari FTIR spektroskopiya asosida tahlil qilindi va olingan natijalar adabiyotlarda keltirilgan ma'lumotlar bilan deyarli o'xshash ekanligi aniqlandi.

2) Olingan xitin va xitozanning termik barqarorliklari termogravimetrik usul yordamida tahlil qilinganda xitinning termik barqarorligi xitozan barqarorligiga nisbatan yuqoriligi aniqlandi.

3) Xitin va xitozanning sirt yuzalari skanerlovchi elektron mikroskop yordamida tahlil qilinganda, xitin deatsetillanishi natijasida uning sirt yuzalarida ham o'zgarishlar sodir bo'lishi aniqlandi.

Foydalanilgan adabiyotlar

[1] Rinaudo, M. *Macromolecular Symposia* **2006**, 245/246, (World Polymer Congress--MACRO 2006), 549-557.

[2] Morin, A., Dufresne, A., Nanocomposites of chitin whiskers from *Riftia* tubes and poly(caprolactone). *Macromolec.*, 35, 2190, 2002.

[3] Khabibullaeva Nozima, Khaitbaev Alisher; Synthesis of Schiff Bases from Glucosamine on the basis of *Apis Mellifera*; *The American Journal of Applied Sciences* Vol.02. Issue 09. USA 2020. p. 263-272

[4] Wu, T. Physicochemical Properties and Bioactivity of Fungal Chitin and Chitosan / T. Wu, S. Zivanovic, F. A. Draughon [и др.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. - 2005. – C. 3888-3894.

[5] Sandford, P.A., 2004. Advances in chitin science. vol (5) Proceeding from the international conference. of the European Chitin Society. *Carbohyd. Polym.*, 56(1): 59-95.

[6] Muzzarelli, R.A.A., P. Ilari, R. Tarsi, B. Dubini and W. Xia, 1994. Chitosan from *Absidia coerulea*. *Carbohyd. Polym.*, 25: 45-50.

[7] Khabibullaeva N.F., Makhkamova N.O., Khaitbaev A.Kh.; Extraction method of aminopolysacharides from *Apis Mellifera*; XVI International scientific and practical

[8] S. V. Nemtsev, O. Yu. Zueva, M. R. Khismatullin, A. I. Albulov, and V. P. Varlamov; Isolation of Chitin and Chitosan from Honeybees; *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 40, No. 1, 2004, pp. 39–43.

[9] Kaya Mand Baran T 2015 Description of a new surface morphology for chitin extracted from wings of cockroach (*Periplaneta americana*) *Int. J. Biol. Macromol.* 75 7–12

[10] H. Moussout, H. Ahlafi, M. Aazza, M. Bourakhouadar. Kinetics and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis. *Polymer Degradation and Stability*. (2016). 130:1-9.

[11] Alexandre T. Paulino, Julliana I. Simionato, Juliana C. Garcia, Jorge Nozaki Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. *Carbohydrate Polymers*. (2006). 64:98–103.

[12] S.W. Ali, S. Rajendran, M. Joshi. Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester. *Carbohydrate Polymers*. (2011). 83:438–446

[13] E.Y. Wardhono, M. P. Pinem, I. Kustiningsih, M. Effendy, D. Clausse, K. Saleh, E. Gu‘enin. Heterogeneous deacetylation reaction of chitin under low-frequency ultrasonic irradiation. *Carbohydrate Polymers*. (2021). 267:1-9.

[14] C.G.T. Neto, J.A. Giacometti, A.E. Jobb, F.C. Ferreirab, J.L.C. Fonseca, M.R. Pereira. Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. *Carbohydrate Polymers*. (2005). 62:97–103