

Impact Factor:

ISRA (India) = 6.317
ISI (Dubai, UAE) = 1.582
GIF (Australia) = 0.564
JIF = 1.500

SIS (USA) = 0.912
ПИИИ (Russia) = 3.939
ESJI (KZ) = 8.771
SJIF (Morocco) = 7.184

ICV (Poland) = 6.630
PIF (India) = 1.940
IBI (India) = 4.260
OAJI (USA) = 0.350

SOI: [1.1/TAS](#) DOI: [10.15863/TAS](#)

International Scientific Journal
Theoretical & Applied Science

p-ISSN: 2308-4944 (print) e-ISSN: 2409-0085 (online)

Year: 2022 Issue: 12 Volume: 116

Published: 14.12.2022 <http://T-Science.org>

Issue

Article



Gulsara Esenovna Berdimbetova

Karakalpak Scientific Research Institute of Natural Sciences
Senior scientist,
Candidate of chemical sciences
Branch of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Karakalpakstan

Azamat Solievich Boymirzaev

Namangan Institute of Engineering and Technology
Professor, Doctor of Chemical Sciences,
Uzbekistan

Bakhtigul Perdebaevna Karlibaeva

Karakalpak Scientific Research Institute of Natural Sciences
Basic doctoral student,
Branch of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Karakalpakstan

SYNTHESIS AND CHARACTERISTICS OF CARBOXYMETHYLCHITOSAN FROM THE ARTEMIA PARTHENOGENETICA CYST OF THE ARAL SEA

Abstract: The article discusses the conditions for obtaining chitin from substandard cysts of *Artemia parthenogenetica* of the Aral Sea, according to the traditional scheme of sequential deproteinization, demineralization and decolorization of raw materials, followed by deacetylation of chitin to chitosan and the synthesis of carboxymethylchitosan. When obtaining chitosan based on chitin from *Artemia* cysts, a harsh deacetylation method was used using a 50% concentrated alkali solution, high temperature conditions (120-1300C) and a long processing time (5-6 hours). Further, carboxymethylchitosan was synthesized from the obtained chitosan. The results of the chemical composition of the feedstock (quality, substandard and crushed cysts), as well as the main qualitative characteristics of chitin and chitosan, including color, average molecular weight, solubility, content of residual mineral substances, etc., are summarized. The structures of chitin/chitosan and carboxymethylchitosan were characterized by spectroscopic methods, the degree of chitosan deacetylation and the degree of substitution of carboxymethylchitosan were calculated. Size exclusion liquid chromatography was used to study the polyelectrolyte properties, molecular weight parameters and polydispersity of chitosan and carboxymethylchitosan. In addition, surface morphology and thermal properties were analyzed by scanning electron microscopy, thermogravimetric analysis, and differential scanning calorimetry, respectively.

Key words: *Artemia parthenogenetica*, cysts, chitin, chitosan, carboxymethylchitosan, infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance spectroscopy, size exclusion liquid chromatography.

Language: Russian

Citation: Berdimbetova, G. E., Boymirzaev, A. S., & Karlibaeva, B. P. (2022). Synthesis and characteristics of carboxymethylchitosan from the *Artemia parthenogenetica* cyst of the Aral sea. *ISJ Theoretical & Applied Science*, 12 (116), 480-492.

Soi: <http://s-o-i.org/1.1/TAS-12-116-37> **Doi:**  <https://dx.doi.org/10.15863/TAS.2022.12.116.37>

Scopus ASCC: 2500.

СИНТЕЗ И ХАРАКТЕРИСТИКА КАРБОКСИМЕТИЛХИТОЗАНА ИЗ ЦИСТЫ АРТЕМИА
PARTHENOGENETICA АРАЛЬСКОГО МОРЯ

Impact Factor:

ISRA (India) = 6.317	SIS (USA) = 0.912	ICV (Poland) = 6.630
ISI (Dubai, UAE) = 1.582	ПИИЦ (Russia) = 3.939	PIF (India) = 1.940
GIF (Australia) = 0.564	ESJI (KZ) = 8.771	IBI (India) = 4.260
JIF = 1.500	SJIF (Morocco) = 7.184	OAJI (USA) = 0.350

Аннотация: В статье рассматриваются условия получения хитина из некондиционных цист *Artemia parthenogenetica* Аральского моря по традиционной схеме последовательного депротеинирования, деминерализации и деколоризации сырья, с последующим деацетилизацией хитина до хитозана и синтеза карбоксиметилхитозана. При получении хитозана на основе хитина из цист Артемии использован жёсткий способ деацетилирования с применением 50% концентрированного раствора щелочи, высокого температурного режима (120-1300С) и продолжительного времени обработки (5-6ч.). Далее из полученного хитозана был синтезирован карбоксиметилхитозан. Обобщены результаты химического состава исходного сырья (качественных, некондиционных и измельченных цист), а также основные качественные характеристики хитина и хитозана, включающие цвет, среднюю молекулярную массу, растворимость, содержание остаточных минеральных веществ и т.д. Спектроскопическими методами охарактеризованы структуры хитин/хитозана и карбоксиметилхитозана, рассчитаны степень деацетилирования хитозана и степень замещения карбоксиметилхитозана. Эксклюзионной жидкостной хроматографией изучены полиэлектролитные свойства, молекулярно-массовые параметры и полидисперсность хитозана и карбоксиметилхитозана. Кроме того, морфология поверхности и тепловые свойства были проанализированы с помощью сканирующей электронной микроскопии, термогравиметрического анализа и дифференциальной сканирующей калориметрии соответственно.

Ключевые слова: *Artemia parthenogenetica*, цисты, хитин, хитозан, карбоксиметилхитозан, инфракрасная спектроскопия, эксклюзионная жидкостная хроматография, дифференциальная сканирующая калориметрия.

Введение

Хитин и хитозан представляют собой сополимеры 2-ацетиламино-2-дезоксид-Д-глюкозы (GlcNAc) и 2-амино-2-дезоксид-Д-глюкозы (GlcN) с β-D-(1→4) гликозидными связями. Хитин имеет высокую степень кристалличности и нерастворим в обычных растворителях. Он часто превращается в хитозан путем деацетилирования. Слово «хитозан» используется как для частично, так и для полностью N-деацетилированных хитинов. Из-за плохой растворимости хитозана (только в кислых водных растворах с pH ниже 6,5) его применение ограничено во многих областях, где растворимость является основным фактором. Растворимость хитозана можно улучшить путем деполимеризации и его химических модификаций [1]. Хитозан содержит реакционноспособные аминогруппы, первичные и вторичные спиртовые группы, которые могут быть объектом химической модификации в мягких условиях реакции для изменения его свойств [2]. Во многих научных исследованиях карбоксиметильные, карбоксиэтильные, карбоксибутильные группы синтезируют в качестве перспективных водорастворимых производных хитозана [1]. По сравнению с другими водорастворимыми производными хитозана, карбоксиметил-хитозан (КМХЗ) привлекает большое внимание и широко изучается благодаря простоте синтеза, растворимости в воде, амфолитному характеру и возможностям широкого спектра областей применения.

КМХЗ представляет собой привлекательный биосовместимый и биоразлагаемый полимер, который получают в результате реакции хитозана с монохлоруксусной кислотой в щелочных условиях. Благодаря своей антимикробной активности, пленко-образующей способности и способности взаимодействовать с различными

веществами, а также растворимости в широком диапазоне pH он используется в медицинской и фармацевтической областях, в основном для контролируемого высвобождения лекарств. Он также используется в тканевой инженерии и для повышения вязкости [3].

По сравнению с обычно используемым хитозаном, КМХЗ демонстрирует некоторые уникальные свойства, такие как способность к биоадгезии, растворимость и абсорбция, биоразлагаемость, нетоксичность конечных продуктов разложения и способность к замедленному высвобождению [4].

Целью данной работы является синтез хитозана и его производного КМХЗ на основе хитина из цист Артемии Аральского моря, определение их физико-химических и структурных характеристик. Для получения хитина из некондиционных цист артемии, собранных с побережья Аральского моря требовалось также провести очистку от минеральных примесей и подготовку исходного сырья для анализа его общего химического состава и выделения хитина.

Материалы и методы

Для выделения качественного хитина были использованы некондиционные цисты артемии Аральского моря предварительно очищенные от примесей, обессоленные и измельченные на шаровой мельнице.

Массовая доля влаги. Массовая доля гигроскопической влаги в сырье была определена путем высушивания образцов при 100-105°C в течение 3 ч. до постоянной массы (согласно требованиям ГОСТа 23637) [5].

Массовая доля белка в сырье – по методу Кьелдаля (ГОСТ 13496.4-93.) [6].

Impact Factor:

ISRA (India) = 6.317
ISI (Dubai, UAE) = 1.582
GIF (Australia) = 0.564
JIF = 1.500

SIS (USA) = 0.912
РИИЦ (Russia) = 3.939
ESJI (KZ) = 8.771
SJIF (Morocco) = 7.184

ICV (Poland) = 6.630
PIF (India) = 1.940
IBI (India) = 4.260
OAJI (USA) = 0.350

Массовая доля жира определена экстракционным методом в Соклете по обезжиренному остатку и ГОСТу 13496.15-97 (Методы определения содержания сырого жира) [7].

Массовая доля минеральных веществ была определена сжиганием органических веществ в муфельной печи при температуре 500-700⁰ С в течение 5-6 часов до постоянной массы и ГОСТу 26226-95[8].

Содержание азота в образцах хитозана определяли по методу Дюма путем сжигания навески в кварцевой трубке за счет кислорода твердых окислителей в атмосфере двуокиси углерода [9].

Методы получения хитина.

Для выделения хитина цисты необходимо предварительно очистить от песка согласно методам по определению остаточного количества песка в сырье Весниной и др. [10]. Далее промывая (обессоленная) и высушенная до влажности 9-10% циста была измельчена на шаровой мельнице. Полученная измельченная полидисперсная фракция цист была просеяна через сито с размером пор 125-130 мкм [11].

Хитин получали из цист Артемии Аральского моря путем модификации классического метода Б. В. Гайквата, Дж. М. Кохли и др. [12] по схеме ДПМК. На этапах депротеинизации (ДП), деминерализации (ДМ) и обесцвечивания внесены небольшие изменения в условия.

Для получения хитина из цисты Аральского Артемии сначала проводят ДП в 3,5% растворе NaOH, при соотношении 1:8, при температуре 100⁰С в течение 1 часа. Образовавшийся осадок отфильтровывают от щелочи и промывают дистиллированной водой до pH 7. Стадию ДМ проводили с 3,5% соляной кислотой, при соотношении 1:8, и комнатной температуре в течение 1 часа. Затем фильтруют и промывают до нейтральной реакции. В случае депигментации обработку 2-3% раствором H₂O₂ проводили при комнатной температуре в течение 10-15 минут. Полученный хитин несколько раз промывали водой, затем этиловым спиртом, соотношение 1:6, в течение 15 минут. Полученный образец хитина сушили при комнатной температуре в течение 24 ч.

Методы получения хитозана из хитина

Для получения хитозана на основе хитина из цист Артемии был выбран за основу метод В.В. Шикера и Е.С. Баташова с использованием «жесткого способа получения хитозана» [13-14], с некоторой модификацией условий, заключающейся в использовании 50% раствора гидроксида натрия, при соотношении 1:15 (вес/объем) и температуры 120-130⁰С, в течение 5ч. Выделенный хитозан, тщательно промыли водой до нейтральных значений pH. Для

обесцвечивания и удаления остатков липофильных примесей промывали ацетоном и экстрагировали 96% этиловым спиртом в течение 7-8 ч, при температуре 70-80⁰С. Полученный хитозан сушили при комнатной температуре в течение 24 ч.

Синтез КМХЗ проводили по методике, описанной в статье Н. Челикчи, С. Айхана Зибы и Мустафы Долаз [15]. Для получения КМХТ 1,5 г хитозана растворяли в 32,5 мл изопропилового спирта в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем к суспензии последовательно прибавляли 11 мл 40%-ного NaOH и 35 мл изопропилового спирта при комнатной температуре и постоянном перемешивании в течение 30 минут. Далее в суспензию добавляли 7,5 г монохлоруксусной кислоты, повышали температуру раствора до 45⁰С и перемешивали в течение 3 часов. После этого раствор охлаждали до комнатной температуры и отфильтровали. После фильтрации раствора промывали 200 мл метанолом. Осадок с фильтровальной бумаги переносили в стакан вместимостью 200 мл, добавляли 100 мл метанола и 10 капель уксусной кислоты, стакан накрывали пленкой и перемешивали на магнитной мешалке в течение 14 часов при комнатной температуре. Затем раствор после 10-минутного отстаивания фильтровали и остаток промывали этиловым спиртом 3-4 раза.

Инфракрасная спектроскопия (ИК)

ИК-спектроскопические исследования хитина, хитозана и КМХЗ проводили на ИК-спектрофотометре Perkin Elmer Spectrum 400 с ATR, в диапазоне частот от 4400 до 400 см⁻¹, идентификацию полос поглощения осуществляли, основываясь на результатах работ [16]. Степень деацетилирования (СДА) хитозана определяли с помощью метода ИК. СДА хитозана рассчитывали на основе уравнения (1) по методу [17-18], в котором связывают полосы поглощения N-ацетил-D-глюкозамина связывают (A_{амид(I)}), D-глюкозамина (A_{амид(II)}) и со степенью СДА уравнением:

$$\text{СДА (\%)} = 100 - \left[31,92 * \left(\frac{A_{\text{амид(I)}}}{A_{\text{амид(II)}}} \right) - 12,20 \right] \quad (1)$$

Степень замещения (СЗ) КМХЗ определили с помощью метода ИК-спектроскопии и рассчитывали на основе уравнения (2) по методу в [18-19], в котором связывают полосы поглощения аминогруппами (A_{амид(II)}) и карбоксиметильными группами (A_{карбоксиметил}).

$$\text{СЗ (\%)} = 1 - \left(\frac{A_{\text{амид(II)}}}{A_{\text{карбоксиметил}}} \div 1,33 \right) * 100\%; \quad (2)$$

Эксклюзионная жидкостная хроматографии (ЭЖХ)

ЭЖХ исследования полученных полисахаридов хитозана и КМХЗ проводили на высокоскоростном жидкостном хроматографе фирмы Agilent 1260 Infinity (США) с

Impact Factor:

ISRA (India) = 6.317
ISI (Dubai, UAE) = 1.582
GIF (Australia) = 0.564
JIF = 1.500

SIS (USA) = 0.912
РИИЦ (Russia) = 3.939
ESJI (KZ) = 8.771
SJIF (Morocco) = 7.184

ICV (Poland) = 6.630
PIF (India) = 1.940
IBI (India) = 4.260
OAJI (USA) = 0.350

рефрактометрическим детектором. В качестве сорбента использовали PL Aquagel OH Mixed с линейной калибровочной зависимостью в диапазоне разделения по ММ от $1 \cdot 10^2$ до $6 \cdot 10^6$. Скорость потока элюента составляла 0,8 мл/мин. Объем вводимой пробы 25 мкл. Обработку хроматографических данных осуществляли с помощью программы Windows Chemstation 7.

Молекулярную массу образцов хитозана и КМХЗ определяли с помощью принципа универсальной калибровки в ЭЖХ. Калибровку хроматографической колонки проводили с помощью узкодисперсных стандартов пуллуланов фирмы (PSS, Германия). Для расчета использовали следующие константы Марка-Куна-Хаувинка для: стандартов пуллуланов $K=1,91 \cdot 10^{-4}$, дл/г; $a=0,67$, хитозанов $K=1,38 \cdot 10^{-4}$, дл/г; $a=0,85$ [20]. Для КМХЗ $K=7,92 \cdot 10^{-4}$, дл/г; $a=1$ [21].

Дифференциальный термогравиметрический анализ (ДТА).

Термическую стабильность хитозана и КМХЗ определяли с помощью измерений ДТА, выполненных на оборудовании SEIKO II TG-DTA (Япония). Количество образца, используемого для каждого измерения, составляло примерно 2,5-3,5 мг в платиновой чашке. Все образцы прогоняли в атмосфере азота и нагревали от 50 °С до 850 °С со скоростью нагрева 10 °С/мин.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)

ДСК анализ был проведен с использованием DSC 3 Mettler Toledo с оборудованием, указанным в спецификации. Количество образцов примерно 2,0–3,5 мг помещали в платиновый поддон. Хитозан и КМХЗ прошли два цикла нагрева. Первый цикл нагрева был от 25 °С до 120 °С для удаления содержания влаги в образце, а второй

цикл нагрева был от 25 °С до 400 °С для определения свойств полимера. Хитозан и КМХЗ анализировали в непрерывном потоке газообразного азота при скорости нагрева 10 °С/мин.

Сканирующий электронный микроскоп (СЭМ-анализ).

Морфологию хитозана и карбоксиметилхитозана наблюдали с помощью сканирования используя электронный микроскоп (СЭМ) (Jeol/Neoscope Jsm-5000) при ЕНТ = 20кВ. Образцы хитозана и КМХЗ имели порошкообразные формы.

Результаты и обсуждение

Предварительная подготовка цисты Артемии к анализу.

Учитывая, что собранная с побережья биомасса цист содержит значительное количество тяжелых и легких примесей необходимо провести первичную очистку цист от этих примесей, поэтапным выдерживанием и промывкой биомассы в насыщенных солевых растворах (морской или соленой воде) и в пресной воде [22-23]. Во избежания завышенного содержания минеральных веществ при выделении хитина из некондиционных цист [24], также была проведена дополнительная очистка сырых цист от остаточного песка и обессоливание [25-27]. Далее высушенная до влажности 9-10% циста была измельчена на шаровой мельнице. Полученная измельченная полидисперсная фракция цист была просеяна через сито с размером пор 125-130 мкм

В таблице 1 представлены количественное содержание основных химических компонентов сырой и измельченной цисты рачка *Artemia parthenogenetica* Аральского моря.

Таблица 1

Сырьё	Влажность, %	Белки, %	Золы, %	Липид, %	Хитин, %
Цисты Артемии Аральского моря (качественный)	9-10	64,09	8,6-13,0	1,6-2,5	2,3-9,44
Цисты Артемии Аральского моря (некондиционные)	6-10	50,28	8,23-12,83	2,5	4,5-10,8
Измельченный цисты Артемии Аральского моря	9,56	59,77	3-4,27	10,0 -11,8	8,9

Химические компоненты цисты рачка *Artemia parthenogenetica* Аральского моря

Как видно из таблицы количественное содержание химических компонентов измельченной цисты существенно не отличаются от таковых для сырой цисты. Закономерное повышение содержания липидов для измельченной формы связано с разрушением

внешней оболочки цисты и доступа экстрагента к внутренним липидным слоям.

Выделения хитина из цисты Артемии

Для выделения хитина были использованы некондиционные цисты рачка *Artemia parthenogenetica* Аральского моря предварительно очищенные от минеральных примесей и измельченные. В ранних публикациях по оптимизации условий выделения хитина из цисты

Impact Factor:

ISRA (India) = 6.317
ISI (Dubai, UAE) = 1.582
GIF (Australia) = 0.564
JIF = 1.500

SIS (USA) = 0.912
РИИЦ (Russia) = 3.939
ESJI (KZ) = 8.771
SJIF (Morocco) = 7.184

ICV (Poland) = 6.630
PIF (India) = 1.940
IBI (India) = 4.260
OAJI (USA) = 0.350

мы отмечаем влияние концентрации реагентов, температуры, времени, а также последовательности процессов обработки на его выход и некоторые качественные показатели [24]. Полученные результаты не противоречили данным авторов Б. В. Гайквада, Дж. М. Кохли и др. [12], метод которых был взят за основу при выделении хитина из цисты артемии. Общая схема выделения хитина включает последовательность процессов ДП, ДМ и деколоризации (ДК) по схеме ДП–ДМ–ДК соответственно. С учетом собственных результатов исследований на этапах ДП, ДМ, ДК внесены небольшие изменения в условия проведения реакций.

Полученные качественные показатели хитина представлена в таблице 2 ниже. Как видно из данных таблицы, процессы ДП и ДМ более эффективно проходят при использовании измельченной цисты, т.к. даже однократная обработка сырья по схеме ДП–ДМ–ДК позволяет

получить хитин с высоким выходом и низким содержанием белковых и минеральных примесей.

Получение хитозана из хитина

Как правило, хитин рассматривается как сырьё для производства хитозана, хотя хитин широко используется во многих областях, на практике могут возникнуть некоторые проблемы из-за его плотной надмолекулярной структуры. По этой причине вместо хитина предпочтительно использовать хитозан, который получают в результате деацетилирования хитина.

С химической точки зрения для деацетилирования хитина можно использовать как кислоты, так и щелочи. Однако гликозидные связи очень чувствительны к кислоте; поэтому чаще применяют щелочное деацетилирование [28-29]. Но и здесь стандартного метода деацетилирования не существует, и самым распространенным способом является

Таблица 2. Качественные показатели хитина из измельченной цисты рачка Артемии

Показатель	Хитина
Внешний вид	Порошок
Цвет	Тёмно-жёлтый
Массовая доля воды, %	8,6
Выход хитина, %	8,9
Минеральных веществ, %	2,68
Азот, %	5,97

применение растворов едкого натра в диапазоне массовых долей 35...50% с гидромодулем 3:1...10:1 при температуре 20...140°C; время обработки составляет 0,5... 10 суток. Традиционный способ получения хитозана осуществляется обработкой хитина концентрированными растворами едкого натра (40...50%) с десятикратным мольным избытком при температуре 100...150°C, в течение 2...3ч., при котором достигается содержание свободных NH₂-групп не менее 75%. Для

повышения степени деацетилирования хитозана обычно применяют двукратную обработку раствором щелочи с массовой долей 50% в течение 1,5 часа и температурой 100°C с промывкой после каждой операции. При этом после второй стадии степень деацетилирования достигает более 90% [13].

На рисунке 1 показана схема получения хитозана из хитина.

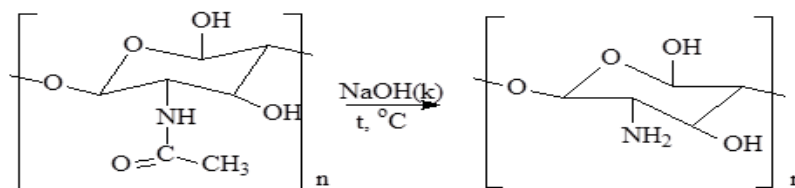


Рисунок 1. Получения хитозана из хитина

Исследованиями авторов [30] влияния природы растворителей на кинетику деполимеризации хитина и хитозана показано, что

при деацетилировании хитина в щелочных условиях происходит деструкция макромолекулы, хотя и не такая сильная, как при кислотной

Impact Factor:

ISRA (India) = 6.317
 ISI (Dubai, UAE) = 1.582
 GIF (Australia) = 0.564
 JIF = 1.500

SIS (USA) = 0.912
 ПИНЦ (Russia) = 3.939
 ESJI (KZ) = 8.771
 SJIF (Morocco) = 7.184

ICV (Poland) = 6.630
 PIF (India) = 1.940
 IBI (India) = 4.260
 OAJI (USA) = 0.350

обработке. Интересен вывод авторов об отсутствии влияния щелочи и солей на кинетику расщепления гликозидных связей, и что роль инициатора расщепления гликозидной связи выполняет вода, которая присутствует во всех рассмотренных системах в избытке. Меньшая деполимеризация в 50% растворах NaOH объясняется, по-видимому, меньшей концентрацией воды (50 %), по сравнению с чистой водой (100 %).

Учитывая эти данные, для получения хитозана на основе хитина из цист Артемии, был выбран за основу метод В.В. Шикера и Е.С. Баташова с использованием «жесткого способа получения хитозана» [13-14], с некоторой модификацией условий, заключающейся в

использовании 50% раствора гидроксида натрия, при соотношении 1:15 (вес/объем) и температуры 120-130⁰С, в течение 5ч. Выделенный хитозан, тщательно промывали водой до нейтральных значений рН промывных вод. Для обесцвечивания и удаления остатков липофильных примесей промывали ацетоном и экстрагировали 96% этиловым спиртом в течение 7-8ч, при температуре 70-80⁰С. Полученный хитозана сушили при комнатной температуре в течение 24 ч.

Качественные характеристики полученного хитозана представлены ниже в таблице 3.

Как видно из данных таблицы 3. хитозан, полученный из хитина цист Артемии Аральского моря, представляет собой белое

Таблица 3. Качественных характеристики хитозана на основе хитина из цист Артемии

Показатель	Хитозана
Внешний вид	Порошок
Цвет	Белый
Массовая доля воды, %	12,55
Выход хитозана, %	21,67
Растворимость хитозана в 2% АсОН	95
Молекулярная масса, кДа	16
Степени деацетилирования, %	84

порошкообразное вещество, хорошо растворимое в 2% уксусной кислоте, имеет высокую степень деацетилирования – 90%, и молекулярную массу 16 кДа. Качественные показатели хитозана согласуются с результатами исследований Баташова Е.С. и Шикера В.В. Как видим, в нашем варианте увеличение времени деацетилирования привело к уменьшению средней молекулярной массы, повышения степени деацетилирования и высокой растворимости хитозана.

Синтеза карбоксиметилхитозана из цисты Артемии.

Введение в структуру хитозана карбоксиметильной группы, может резко увеличить растворимость хитозана при нейтральных и щелочных значениях рН, не влияя на его характеристики, что существенно расширяет возможности его практического применения.

Водорастворимое производное N,O-КМХЗ может быть получено введением карбокси-

метильных групп в некоторые amino- и первичные гидроксильные участки глюкозамин-новых звеньев структуры хитозана. N,O-КМХЗ является гидрофильным и типичным амфотерным полиэлектролитом с противо-раковым и антибактериальным действием. Помимо растворимости в воде, он также обладает многими привлекательными физическими и биологическими свойствами, такими как удерживание влаги, гелеобразование и хорошая биосовместимость, что делает его многообещающим биоматериалом. N,O-КМХЗ можно получить с использованием хитозана, гидроксида натрия, изопропанола с хлоруксусной кислотой [31].

Синтез КМХЗ проводили по аналогии метода Н. Челикчи, С.А. Зибы и Мустафы Долаз [15] для карбоксиметилирования хитозана, полученного из панциря ракообразных креветок. На рис. 2 показана реакция получения КМХЗ.

Impact Factor:

ISRA (India) = 6.317	SIS (USA) = 0.912	ICV (Poland) = 6.630
ISI (Dubai, UAE) = 1.582	ПИИЦ (Russia) = 3.939	PIF (India) = 1.940
GIF (Australia) = 0.564	ESJI (KZ) = 8.771	IBI (India) = 4.260
JIF = 1.500	SJIF (Morocco) = 7.184	OAJI (USA) = 0.350

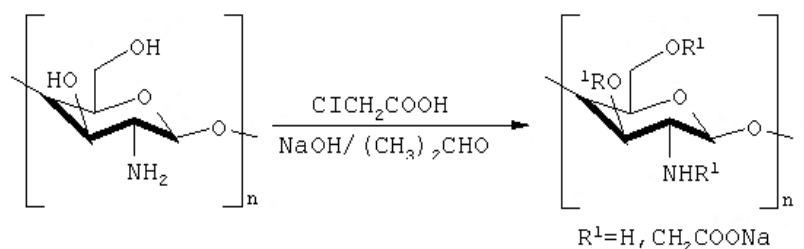


Рисунок 2. Реакция получения N,O-KMX3

Образование N,O-KMX3 согласуется с результатами анализа ИК-спектров.

ИК спектры хитина, хитозана и карбоксиметилхитозана

В природе существуют три кристаллические формы хитина; α , β , γ . α -хитин имеет антипараллельную алломорфную структуру, которая поддерживает водородные связи и создает очень компактную структуру, что приводит к высокой кристалличности и твердости. Природный хитин встречается в основном в α -форме [31]. β -хитин имеет параллельные цепи, менее кристаллические и менее упакованные, более гибкие и активные. α -хитин может превращаться в β -хитин, но не наоборот [29]. γ -хитин представляет собой смешанный состав α - и β -форм [32-34].

Три алломорфа можно наблюдать с помощью рентгеновской дифракции и ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Спектральный анализ ИК также позволяет нам понять кристаллическую форму хитинов.

В ИК-спектре хитина, полученного из цист *Artemia parthenogenetica* Аральского моря, наблюдались следующие полосы поглощения (рис. 3а): Широкая полоса поглощения при 3444 см^{-1} связана с валентными колебаниями спиртовых групп $\nu(\text{OH})$ при атоме С6 и гидроксильных групп при атоме С3 $2958\text{-}2854\text{ см}^{-1}$ — соответствуют асимметричным и

симметричным валентным колебаниям $\nu_{\text{as,s}}(\text{CH}_2$ и $\text{CH}_3)$ метиленовых и метиловых групп. 1744 см^{-1} — деформационным колебаниям N-H-связи в первичных ($-\text{NH}_2$) амидах. В случае β -хитина наблюдение большого одиночного пика при 1640 см^{-1} соответствует растяжению водородной связи СО-группы с амидной группой соседней листовой цепи [35]. 1552 см^{-1} — деформационным колебаниям ($-\text{NH}-$) связи в вторичных амидах; $1442\text{-}1413\text{ см}^{-1}$ — деформационным колебаниям свободной О-Н связи; 1381 см^{-1} — деформационным колебаниям С-Н связи в алкильных фрагментах, являющийся важным критерием подтверждения строения, так как оно отсутствует в спектрах соединений, не содержащих метильные группы; 1315 см^{-1} соответствует деформационным колебаниям CH_3 групп в алканах; 1243 и 1206 см^{-1} — деформационным колебаниям связанных с водородными связями ОН-групп; 1156 см^{-1} , 1115 и 1074 см^{-1} — валентным колебаниям С-О связи в первичных и вторичных спиртах; 1029 см^{-1} — валентным колебаниям мостиковых С-О-С связи; 953 см^{-1} — валентным колебаниям С-О и С-С связей и деформационным маятниковым колебаниям CH_2 .

Эти результаты ИК-спектра полностью согласуются с опубликованными в литературе и могут подтвердить образование хитина.

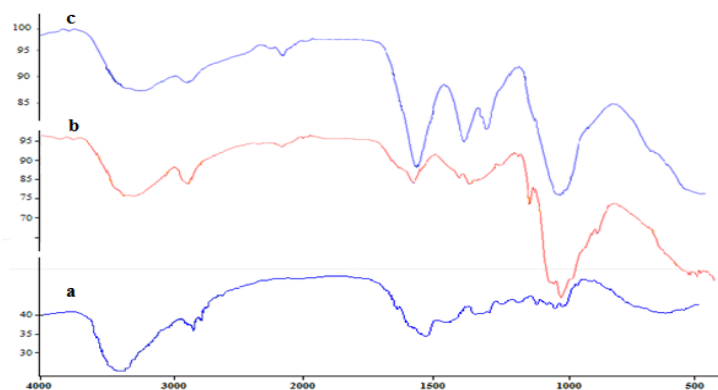


Рис. 3. ИК спектры хитина(а), хитозана (b) и КМХЗ (с)

В ИК спектре хитозана (рис. 3-б) широкая полоса поглощения при 3295 см^{-1} обусловлена

валентными колебаниями $\nu(\text{OH})$ спиртовых групп при атоме С-6 и гидроксильных групп при атоме

Impact Factor:

ISRA (India) = 6.317
ISI (Dubai, UAE) = 1.582
GIF (Australia) = 0.564
JIF = 1.500

SIS (USA) = 0.912
РИИЦ (Russia) = 3.939
ESJI (KZ) = 8.771
SJIF (Morocco) = 7.184

ICV (Poland) = 6.630
PIF (India) = 1.940
IBI (India) = 4.260
OAJI (USA) = 0.350

C-3. 2868 cm^{-1} – соответствуют асимметричным и симметричным валентным колебаниям ν as, s (CH_2 и CH_3) метиленовых и метиловых групп [16]. Характерные для хитозана полосы амида I ($\text{C}=\text{O}-\text{NHR}$) и аминогруппы ($-\text{NH}_2$) наблюдались при 1588 cm^{-1} и 1380 cm^{-1} [36] соответственно. Поглощения при 1146 cm^{-1} соответствуют валентным колебаниям C-O связи в первичных и вторичных спиртах; 1030 cm^{-1} – валентным колебаниям мостиковых C-O-C связи; 891 cm^{-1} – деформационные колебания C_1-H в β -сахарах. Эти результаты полностью согласуются с опубликованными в литературе и подтверждают образование хитозана по ИК-спектрам. Степень деацетилирования хитозана, рассчитанная по уравнениям (1) и (2) [17-18], составляет 84,5% [37].

В зависимости от расположения зона поглощения функциональных групп хитозана, N-ацетил-D-глюкозамина (A1,380), D-глюкозамина (A1,588) в предложенные методики [17-18], на основе уравнению (1) и (2) рассчитывали степень деацетилирования, которая составляет 84,5% [37].

Карбоксиметилирование вызывало структурные изменения, которые были идентифицированы при сравнении ИК-спектров хитин, хитозана (рис.3). ИК-спектре КМХЗ пики при 3252 cm^{-1} представляют собой растяжения O-H и N-H. Это появление широкой полосы свидетельствует о более гидрофильном характере КМХЗ по сравнению с исходным хитозаном.

Пик 2879 cm^{-1} может быть отнесен к $\nu(\text{C}-\text{H})$ из групп CH_2 . Введение карбоксиметильных групп подтверждается появлением интенсивной полосы при 1583 cm^{-1} и умеренной полосы при 1403 cm^{-1} . Полосы 1583-1403 cm^{-1} , соответствующие этой карбоксильной группе и группе $-\text{CH}_2\text{COOH}$, являются сильными в спектре ККМ, что указывает на карбоксиметилирование как amino-, так и гидроксильных групп хитозана.

Кроме того, образование КМХЗ также подтверждается усилением полосы при 1067 и 1323 cm^{-1} , соответствующей $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ и $\nu_s(\text{C}-\text{OH})$. Валентные колебания в диапазоне 1154–1029 cm^{-1} отнесены к гликозидным связям C-O-C и C-O. Полоса валентных колебаний C-O при 1028 cm^{-1} , соответствующая первичной гидроксильной группе, исчезает, что подтверждает высокое карбоксиметилирование OH-6 [38]. В хитозане и КМХЗ полосы при 989 и 943 cm^{-1} были приписаны валентному колебанию C-O пиранозного кольца и валентному колебанию C-O с вкладом деформации C-C-H и C-O-H.

Таким образом, произошло карбоксиметилирование некоторых amino- и первичных гидроксильных фрагментов глюкозаминовых звеньев структуры хитозана [21] и мы можем заключить, что структура представляет собой N,O-КМХЗ. Согласно по ИК спектру КМХЗ определено, что его степень замещения составляет 33,4%.

Определение молекулярной массы хитозана и КМХЗ методом эксклюзионной жидкостной хроматографии (ЭЖХ)

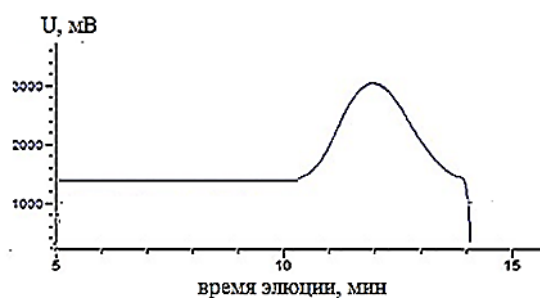


Рисунок 4. Гель-хроматограмма хитозана. Хроматографическая колонка TSK GM PW_{XL}.

На рис.4 представлена гель-хроматограмма хитозана, полученная в 0,2 М ацетатном буферном растворе (pH 4,4). Расчет молекулярной массы хитозана проводили с использованием принципа универсальной калибровки в ЭЖХ. Рассчитанное значение ММ для хитозана составляло 10 кДа.

На рис.5 представлена гель-хроматограмма КМХЗ, полученная с использованием элюента, содержащим 0,1 М NaNO_3 в воде. КМХЗ в воде проявляет полиэлектролитное свойство из-за наличия в цепях карбоксильных групп и поэтому

для подавления полиэлектролитных эффектов и реализации молекулярно-ситового механизма разделения в качестве элюента использовали водно-солевой раствор. Из рис.5 видно, что образец состоит из двух хроматографических пиков, что соответствует двум фракциям разной ММ. Для расчета ММ КМХЗ также применили принцип универсальной калибровочной зависимости.

Impact Factor:

ISRA (India) = 6.317	SIS (USA) = 0.912	ICV (Poland) = 6.630
ISI (Dubai, UAE) = 1.582	ПИИЦ (Russia) = 3.939	PIF (India) = 1.940
GIF (Australia) = 0.564	ESJI (KZ) = 8.771	IBI (India) = 4.260
JIF = 1.500	SJIF (Morocco) = 7.184	OAJI (USA) = 0.350

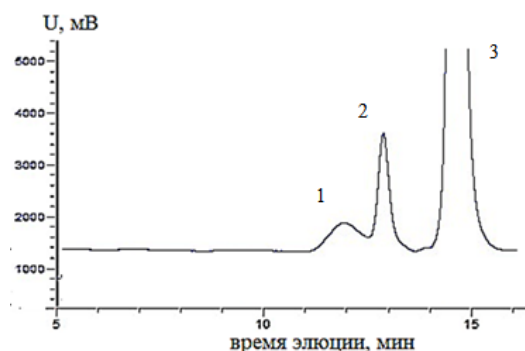


Рисунок 5. Гель-хроматограмма КМХЗ. Элюент: 0,1 М NaNO₃ в воде.

Рассчитанные значения ММ составляют: для 1-фракции 3 кДа, а 2-фракции 800 Да. Уменьшение ММ КМХЗ можно объяснить гидролизом молекул хитозана в процессе карбоксиметилирования.

Дифференциальная термогравиметрическая (ДТГ) и дифференциально-сканирующая калориметрический (ДСК) анализы хитозана и КМХЗ.

Проведен термический анализ (ДТГ/ДСК) хитозана и КМХЗ, полученных из цисты Артемии Аральского моря, и изучено влияние степени

деацетилирования этих полисахаридов на процесс их термического разложения.

Известно, что вид кривых ДТГ и ДСК зависит от гетерогенного характера термического разложения, протекания различных химических реакций, разрушения водородных связей, конформационных и фазовых переходов [39]. При термическом разложении, видимо, будет протекать процесс термоокислительной деструкции хитозана и КМХЗ, сопровождающийся разрушением гликозидных, ацетамидных и карбоксиметильных связей (рис. 6).

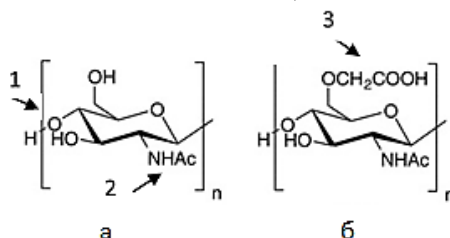


Рисунок 6. Структурная формула хитозана (а) и О-карбоксиметилхитозана (б); 1– гликозидные связи; 2 – ацетамидные связи; 3- карбоксиметильные связи.

ДТГ и ДСК анализы хитозана

ДТГ-анализ хитозана изучали в температурном диапазоне 50-850°C (рис. 7), а ДСК-анализ изучали в диапазоне температур 25-400°C (рис. 8).

Как видно из ДТГ-анализа хитозана на рисунке 1, процесс термической дегградации наблюдался с начальной потерей массы хитозана

5,7% за счет испарения воды при 100°C. Пик разложения хитозана составляет около 187-404°C.

При температуре 303 С на кривых ДСК хитозана (рис.8) имеется эндотермический пик, соответствующий удалению из образцов адсорбционной воды. Потеря массы хитозана, составляет 51,8 %, скорость потери массы равна 3,12 мг/ в минуту.

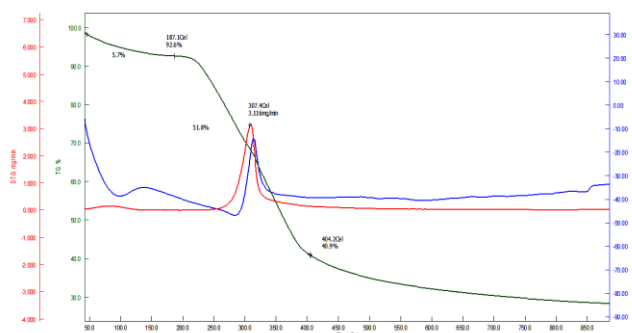


Рисунок 7. Дифференциальная термогравиметрическая анализ хитозана

Impact Factor:

ISRA (India) = 6.317	SIS (USA) = 0.912	ICV (Poland) = 6.630
ISI (Dubai, UAE) = 1.582	ПИИЦ (Russia) = 3.939	PIF (India) = 1.940
GIF (Australia) = 0.564	ESJI (KZ) = 8.771	IBI (India) = 4.260
JIF = 1.500	SJIF (Morocco) = 7.184	OAJI (USA) = 0.350

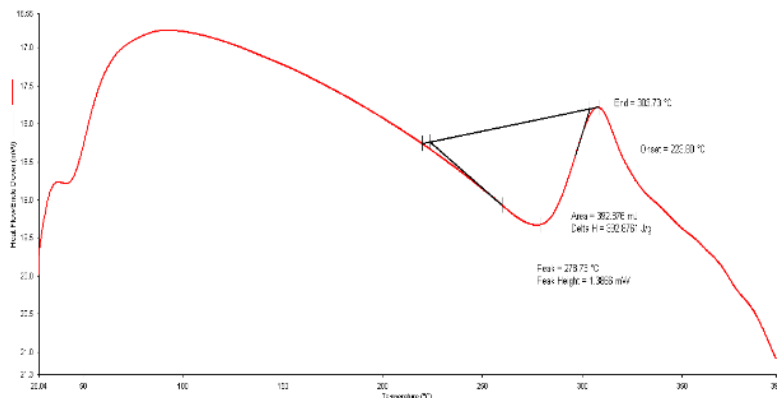


Рисунок 8. Дифференциальная сканирующая калориметрия хитозана

Полученные экспериментальные данные согласуются с литературными сведениями. Так, в работе [40-41] установлено, что изменение массы при деструкции хитозана (со степенью деацетилирования 84 %) составляет 52 %.

ДТГ и ДСК анализы карбоксиметилхитозана
ДТГ-анализа КМХЗ изучали в температурном диапазоне 50-850 °С (рис. 9), а ДСК-анализ изучали в диапазоне температур 25-400°С (рис.10).

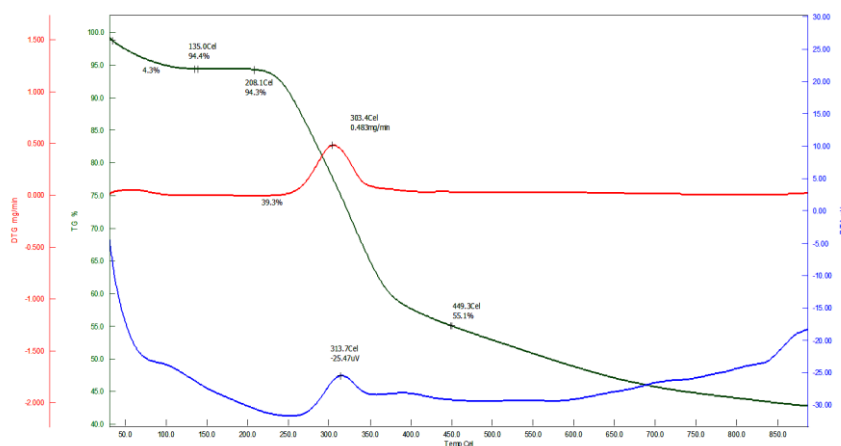


Рисунок 9. Термогравиметрический анализ КМХЗ

Как видно из рисунка 10, процесс термической дегградации наблюдается при температуре 25–85°С, начальная потеря веса КМХЗ на 4,3 % связано с испарением воды.

Второе тепловое событие начинается примерно при 135°С и продолжается до 450°С для

КМХЗ и сопровождается потерей массы на 39,3% соответственно. Это термическое событие соответствует разложению основной цепи хитозана и отщеплению замещающих групп в карбоксиметилированных производных [42].

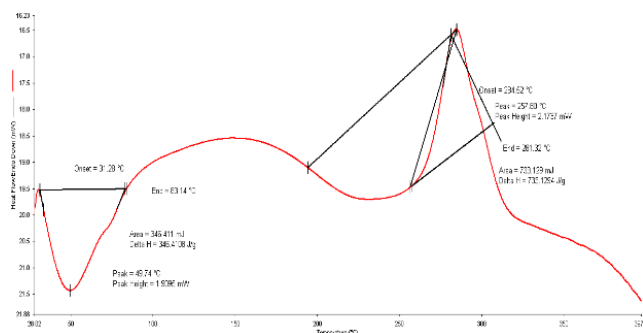


Рисунок 10. Дифференциальная сканирующая калориметрия карбоксиметилхитозана

Impact Factor:

ISRA (India) = 6.317
ISI (Dubai, UAE) = 1.582
GIF (Australia) = 0.564
JIF = 1.500

SIS (USA) = 0.912
РИИЦ (Russia) = 3.939
ESJI (KZ) = 8.771
SJIF (Morocco) = 7.184

ICV (Poland) = 6.630
PIF (India) = 1.940
IBI (India) = 4.260
OAJI (USA) = 0.350

Как видно из рис. 10, КМХЗ демонстрирует два термических явления: первый эндотермический и второй экзотермический пики. Первый эндотермический пик, наблюдаемый при 49,7 °С, формируется за счет испарения влаги в течение первого периода нагрева. Экзотермический пик (Td1) появляется при 257,8 °С, что соответствует термическому разложению полимерной цепи [21, 42]. Согласно результатам, представленным рис. 7,8,9,10 производные хитозана демонстрируют большую потерю массы на этой стадии, поскольку карбоксиметилирование повышает их гидрофильность.

Установлено, что хитозан терял в весе больше, чем КМХЗ, при температуре выше 400°С. Это можно объяснить деградацией деацетилизованной части молекулы [15].

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) анализы хитозана и КМХЗ.

Морфологию порошков хитозана с разными размерами частиц анализировали с помощью СЭМ. Как показано на рисунке 11, порошкообразная форма хитозана относительно непрозрачны, имеют слегка шероховатую поверхность и частицы неправильной формы.

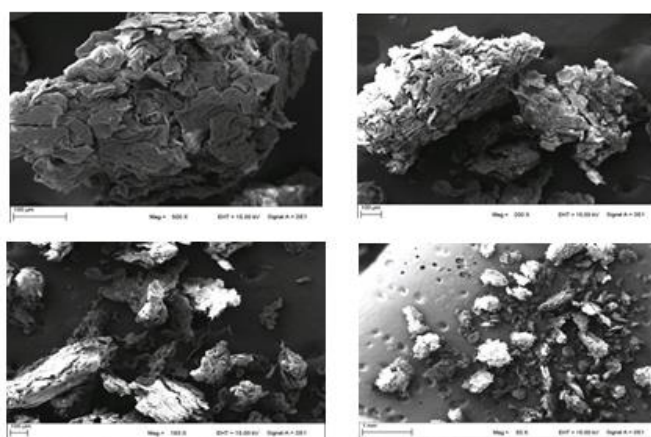


Рисунок 11. СЭМ анализ хитозана

На основании данного СЭМ-анализа видно, что поверхность хитозана была неровной и имела слоистую поверхность и микроструктуру. Увеличение от 50 до 500 раз выявило ямчатую и пористую поверхность хитозана [15].

СЭМ анализы КМХЗ

Как показано на рис. 12, частицы КМХЗ относительно прозрачны, чем в хитозане. КМХЗ имеет слегка шероховатую поверхность и частицы неправильной формы.

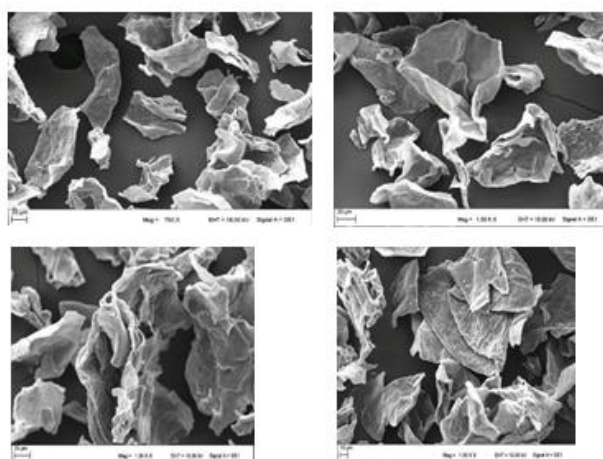


Рис. 12. СЭМ анализ карбоксиметилхитозана

Ширина частиц КМХЗ больше, чем у частиц хитозана, что связано с эффектами образования на их поверхности объемных групп (-CH₂COOH).

Напротив, длина частиц КМХЗ была меньше, чем у частиц хитозана из-за эффектов химической

Impact Factor:

ISRA (India) = 6.317
ISI (Dubai, UAE) = 1.582
GIF (Australia) = 0.564
JIF = 1.500

SIS (USA) = 0.912
РИИЦ (Russia) = 3.939
ESJI (KZ) = 8.771
SJIF (Morocco) = 7.184

ICV (Poland) = 6.630
PIF (India) = 1.940
IBI (India) = 4.260
OAJI (USA) = 0.350

реакции при модификации поверхности, которая привела к разрыву цепи

На основании СЭМ-анализа поверхность КМХЗ была неровной и имела слоистую поверхность и микроструктуру. Тот факт, что КМХЗ имеет неровную поверхность, указывает на наличие нового слоя, прикрепленного к поверхности хитозана [15, 43].

Заключение

Успешно синтезированы хитозан и его карбоксиметильное производное, полученные на основе хитина из некондиционных цист рачка Артемии Аральского моря. Введение карбоксиметильных групп в хитозан подтверждено методом ИК-спектроскопии. ИК, ДТГ и ДСК-анализы подтверждают, что термическая стабильность карбоксиметилированного образца выше, чем у хитозана. Результаты СЭМ-анализа показали, что образцы хитозана и КМХЗ имеют неравномерную морфологию поверхности и пористую структуру.

Методом ЭЖХ установлено, что водный раствор КМХЗ проявляет полиэлектролитное свойство, а при использовании в качестве элюента водного раствора NaNO_3 с концентрацией 0,1 моль/л происходит подавление эффекта полиэлектролитного набухания. Рассчитанное значение ММ для хитозана составляло 10 кДа. Образец КМХЗ состоит из двух фракций разной ММ. Определенные значения ММ составляют: для 1-фракции 3 кДа, а 2-фракции 800 Да. Уменьшение ММ КМХЗ можно объяснить гидролизом молекул хитозана в процессе карбоксиметилирования.

Полученные результаты показывают, что цисты Артемии Аральского моря являются хорошими источниками для получения хитозана, а синтезированный КМХЗ может быть использован во многих областях, таких как пищевая промышленность, медицина, фармацевтика, сельское хозяйство и др. [15].

References:

1. Tzaneva, D., et al. (2017). Synthesis of Carboxymethyl Chitosan and its Rheological Behaviour in Pharmaceutical and Cosmetic Emulsions. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 7 (10), pp. 070-078.
2. Mourya, V.K., et al. (2010). Carboxy-methyl chitosan and its applications. *Adv. Mat. Lett.* V.1. (1), 11-33.
3. Mohamed, N.A., et al. (2012). Preparation and antimicrobial activity of some carboxymethylchitosan acyl thiourea derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*, V. 50, pp. 1280- 1285.
4. Vaghani, S.S., et al. (2012). Synthesis and characterization of carboxymethyl chitosan hydrogel: Application as site-specific delivery for lercanidipine hydrochloride. *Bull. Mater. Sci.*, Vol. 35, No. 7, pp. 1133-1142.
5. (n.d.). GOST 23637. *Metodi opredeleniya sodержaniya vlagi.*
6. (n.d.). GOST 13496.4-93. *Metodi opredeleniya sodержaniya azota I sirogo proteina.*
7. (n.d.). GOST 13496.15-97. *Metodi opredeleniya sodержaniya sirogo jira.*
8. (n.d.). GOST 26226-95. *Metodi opredeleniya siroy zoli.*
9. Kalinina, L.S., et al. (1984). *Analiz kondensatsionnix polimerov.* (p.296). Moscow: Himiya.
10. Vesnina I.V., & Ronjina, T.O. (2014). *Metodika kontrolnogo vzveshivaniya tsist rachka Artemia leach i korrektivka kvoti ix vilova s uchytom fakticheskoy vlazhnosti i chistoti biosiry.* Novosibirsk.
11. Berdimbetova, G.E., et al. (2021). Qualitative characteristics of non-conditioned cysts Artemia parthenogenetica of the Aral Sea. *The Way of Science. International scientific journal*, № 8 (90), pp.8-17.
12. Gaikwad, B.V., Koli, J.M., & Desai, A.S. (2015). Isolation and characterization of chitosan from crab (Scylla serrata) shell waste. *IJSAR*, V.2(8), pp.78-84.
13. Shikera, V.V. (2004). *Issledovanie biologicheskoy aktivnosti xitozanovix preparatov iz tsist Artemia Salina.* Dissertatsiya. Barnaul.
14. Batashov, E.V. (2006). *Poluchenie xitinsoderzhashix preparatov iz nekonditsionnix tsist Artemia sp. i izucheniya ix vliyaniya na rasteniya.* Barnaul.
15. Celikci, N., et al. (2020). Synthesis and characterization of carboxymethyl shrimp chitosan (CMSC) from waste shrimp shell. *MANAS Journal of Engineering*, ISSN 1694-7398 | e-ISSN 1694-7398. Volume 8 (2), pp. 77-83.
16. Nakanishi, K. (1965). *Infrakrasnie spektri I stroenie organicheskix soedineniy.* Moscow.

Impact Factor:

ISRA (India) = 6.317
ISI (Dubai, UAE) = 1.582
GIF (Australia) = 0.564
JIF = 1.500

SIS (USA) = 0.912
PIIHQ (Russia) = 3.939
ESJI (KZ) = 8.771
SJIF (Morocco) = 7.184

ICV (Poland) = 6.630
PIF (India) = 1.940
IBI (India) = 4.260
OAJI (USA) = 0.350

17. Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J., et al. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer (Guildford)*, 42(8), 3569-3580. DOI 10.1016/S0032-3861(00)00713-8.
18. Lima Júnior, R. N., et al. (2020). Chitosan and Carboxymethylchitosan as High Turbidity Water Biocoagulants. *Journal of Renewable Materials (JRM)*, 2020, vol.8, no.11.
19. Borsagli, F. G. L. M., Mansur, A. A. P., Chagas, P., Oliveira, L. C. A., & Mansur, H. S. (2015). O-carboxymethyl functionalization of chitosan: complexation and adsorption of Cd (II) and Cr (VI) as heavy metal pollutants. *Reactive and Functional Polymers*, 97, 37-47. DOI 10.1016/j.reactfunctpolym.2015.10.005.
20. Bartenev, G.M., et al. (1990). *Fizika polimerov*. (p.432). L.: Ximiya.
21. Mourya, V.K., Inamdar, N. N., & Tiwari, A. (2010). Carboxymethyl chitosan and its applications. *Adv. Mat. Lett.*, 1(1), 11-33.
22. Voronov, P.M. (1981). Kontsentratsiya yaits Artemia salina. *Gidrobiologicheskii jurnal*, 17, №6, pp.52-56.
23. (2014). *Biotest-sistemy dlya zadach ekologicheskogo kontrolya. Metodicheskie rekomendacii po prakticheskomu ispol'zovaniyu standartizovannyh test-kul'tur*. Moskova.
24. Berdimbetova, G.E., Karlybaeva, B.P., Nurieva, M.U., Daukeva, G.U., & Bojmirzaev, A.S. (2021). *Optimizatsiya uslovij demineralizatsii pri poluchenii hitina/hitozana iz cisty «Artemia Parthenogenetica» Aral'skogo morya Respubliki Karakalpakstan*. Mezhdunarodnoj nauchno-tekhnicheskoy konferencii. 24-25 sentyabrya 2021. (p.333). Tashkent.
25. Rudneva, I.I. (1991). *Artemiya. Perspektivy ispol'zovaniya v narodnom hozyajstve*. (p.144, 67-69). Kiev: Izd-vo «Naukova dumka».
26. Fedoseeva, E.V., Sapunkova, N.Yu., & Terekhova, V.A. (2016). *Prakticheskaya ekotoksikologiya: oценка chuvstvitel'nosti biotest-kul'tur*. Uchebnoe posobie. Moskova GEOS.
27. Morozova, E.A., Vereshchagin, A.L., & Hmelev M.V. (2008). "Obessolivanie horionov cist Artemia species", *Polzunovskij vestnik*, №1-2.
28. Berdimbetova, G.E., Karlybaeva, B.P., & Boymirzaev, A.S. (2021). "Influence of the chemical sequence of processing of Artemia parthe-nogenetica cysts of the Aral sea on the yield and physicochemical characteristics of chitin. Abstracts. of the 14th Int. Symp. "Actual Problems of Chemistry, Biology and Technology of Natural Compounds". (p.237). Tashkent.
29. Hajji, S., Younes, I., Ghorbel-Bellaaj, O., Hajji, R., Rinaudo, M., Nasri, M., & Jellouli, K. (2014). Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.65, pp. 298-306.
30. Chebotok, E.N., Novikov, V.Yu., & Konovalova, I.N. (2006). Vliyanie prirody rastvoritelej na kinetiku depolimerizatsii hitina i hitozana. *Vestnik MGTU*, tom 9, №4, p.717.
31. Jayakumara, R., Prabakaran, M., Naira, S.V., Tokurac, S., Tamurac, H., & Selvamurugand, N. (2010). Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. *Progress in Materials Science*, 55 (2010), pp.675-709.
32. Minke, R., & Blackwell, J. (1978). the structure of alpha-chitin. *J. Mol. Biol.*, 120: 167-181.
33. Khoushab, F., & Yamabhai, M. (2010). Chitin Research Revisited. *Marine Drugs*, 8: 1988-2012.
34. Sajomsang, W., & Gonil, P. (2010). Preparation and characterization of α-chitin from cicadasloughs. *Mater. Sci. Eng. C* 30: 357-363.
35. Arbia, L., Adour, L., & Amrane, A. (2013). Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods - A Review. *Food Technol Biotechnol*, 51: 12-25.
36. Kaya, M., Baran, T., et al. (2015). Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan with Antimicrobial and Antioxidant Activities from Cosmopolitan Orthoptera Species (Insecta) *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20: 168-179.
37. Gorbacheva, I.N., Skorikova, E.E., Vihoreva, G.A., Gal'braj, L.S., & Babievskij, K.K. (1991). *Vysokomolek. soed*, t.A.33, №9, pp.1899-1904.
38. Bellami, L. (1976). *IK-spektroskopiya polimerov*. (p.472). Moscow: Himiya.
39. Shestak, Kuchina, Yu.A., et al. (2015). "Termicheskoe razlozhenie prirodnyh polisaharidov: hitina i hitozana". *Vestnik MGTU*, tom 18, № 1, pp. 94-99.
40. Rogovina, S. Z. (2010). Sozdanie biorazlagaemoj kompozitsii poligidrosibutirat - hitozan- rifampicin dlya kontroliruemogo transporta biologicheskii aktivnyh veshchestv. *Doklady akademii nauk*, T.431, №4, pp.500-502.
41. Kuchina Yu.A., et al. (2015). "Termicheskoe razlozhenie prirodnyh polisaharidov: hitina i hitozana". *Vestnik MGTU*, tom 18, №1, pp.94-99.
42. Suryavanshi, V., et al. (2019). Physico-Chemical Studies of Chitosan Derivatives and Optimization of Reaction Conditions using RSM Design. *Asian Journal of Chemistry*, Vol. 31, No. 9 (2019), 2029-2036.
43. Bulut, M.O., & Elibüyük, U. (2017). "Production of Chitosan the Crab Chitin". *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 10, 213-219.