

## ВЫДЕЛЕНИЕ ХИТОЗАНА ИЗ ОТХОДОВ РЕЧНОГО РАКА *ACTACUS LEPTODACTYLUS* И ПОЛУЧЕНИЕ ЕГО ГИДРОФОБНО МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

Е.А. Степнова, В.Е. Тихонов, З.С. Клеменкова, И.А. Ямсков

Институт элементоорганических соединений РАН им. А.Н. Несмеянова, Москва, Российская Федерация

### Введение

Целью работы являлась разработка выделения хитозана из хитинсодержащих отходов речного рака (*Actacus leptodactylus*), получение на его основе гидрофобно модифицированных производных и изучение их физико-химических свойств в сравнении с немодифицированным хитозаном для определения возможности их применения в качестве пенообразователей и загустителей.

Узкопалый речной рак (*Actacus leptodactylus*) является объектом местного промысла в нашей стране и искусственного разведения во многих странах Европы. В России в настоящее время этот промысел по ряду причин стоит далеко не на том уровне, на котором он мог бы быть. В нашей работе речной рак выбран для того, чтобы показать перспективность данного источника для выделения хитозана и дальнейшего получения из него производных.

Немодифицированный хитозан не обладает поверхностно-активными свойствами. Химическая модификация хитозана, позволяет придать молекуле этого полимера поверхностно-активные свойства [1]. В свою очередь, поверхностно-активные свойства взаимосвязаны с пенообразующей способностью. Образование стабильной пены очень важно для промышленных процессов производства косметических продуктов и продуктов питания, многие из которых представляют собой эмульсии или пены. Между тем, наличие длинного гидрофобного заместителя приводит к снижению растворимости молекулы хитозана в воде [2]. Присутствие карбоксильных групп частично компенсирует потерю растворимости, связанную с введением в молекулу хитозана гидрофобных алкильных или сукцинильных групп [3].

Взаимодействие хитозана с (2-додецен-1-ил)янтарным ангидридом (ДДЯА) предоставляет возможность получения амфифильных производных хитозана одновременным введением в молекулу хитозана длинных гидрофобных алкильных цепей и заряженных гидрофильных карбоксильных групп.

### Методы исследования

#### 1. Выделение хитина и получение хитозана из речного рака (*Actacus leptodactylus*).

Хитозан был получен из отходов речного рака (*Actacus leptodactylus*). Основными стадиями получения хитозана являлись: измельчение отходов, депротеинирование, деминерализация, деацетилирование, промывка водой, высушивание. Отходы были предварительно измельчены до размера частиц от 1 до 3 мм, а затем были подвергнуты щелочному депротеинированию. По окончании процесса щелочного депротеинирования супернатант отделяли и промывали частицы депротеинированного хитина. Для деминерализации хитина использовали соляную кислоту, которую вводили порциями в перемешиваемую водно-хитиновую смесь до полного прекращения выделения углекислого газа при 20<sup>0</sup>С, а затем оставляли на 2 часа. Для снижения пенообразования добавляли незначительные количества бутилового спирта. Для удаления пигментов перед деацетилированием деминерализованный хитин обрабатывали раствором гипохлорита натрия. Деацетилирование хитина проводили концентрированным раствором NaOH.

#### 2. Получение N-[2(3)-(додец-2'-ен-1'-ил) сукциноил] хитозана.

Хитозан (5г; 24 ммоль NH<sub>2</sub> групп) при перемешивании растворяли в 1% (об./об.) водном растворе уксусной кислоты (150 мл) при 50 °С, затем к раствору добавляли 150 мл метанола и раствор ДДЯА (2,4÷28,8 ммоль) в метаноле (50 мл). Полученную смесь перемешивали при 50°С в течение 8 часов и оставляли на ночь при комнатной температуре. Затем в реакционную массу вливали в 2% раствор гидрокарбоната натрия (500 мл) и перемешивали в течение 1 часа. Получившийся гель отделяли и промывали избытком воды. Затем гель растворяли в 1% уксусной кислоте (150 мл) и осаждали 5% раствором гидрокарбоната натрия (100 мл). Полученный гель тщательно промывали избытком воды, лиофилизовали и помещали на хранение.

### 3. Спектрофотометрические измерения

ИК спектры лиофилизованных образцов были сняты в таблетках KBr с использованием прибора Perkin-Elmer 1420.

### 4. Определение пенообразующей способности растворов

Пенообразующую способность и стабильность пены измеряли по следующей методике: 10 мл раствора образца (концентрация 0,25г/дл) в 0,15 М ацетатном буфере (рН 4,5) помещали в мерный цилиндр объемом 25 см<sup>3</sup> с притертой пробкой. Цилиндр интенсивно встряхивали 2 мин и ставили на стол. Отмечали объем пены и включали секундомер. Следили за изменением объема пены во времени, производя соответствующие записи в таблице. Измерения прекращали после полного разрушения всей образовавшейся пены. Повторным встряхиванием снова получали пену и измерения повторяли. По полученным данным строили график изменения объема пены во времени, откладывая по оси абсцисс время, а по оси ординат - объем пены.

Пенообразующую способность (Fa) рассчитывали по формуле:

$Fa(\%) = 100V_0/V_s$ , где  $V_0$  – первоначальный объем пены, а  $V_s$ - объем раствора (мл).

### 5. Измерение вязкости растворов

Вискозиметр вращения Brookfield LVDV-I+(шпиндель 0) был использован для определения динамической вязкости растворов полимеров высокой концентрации в зависимости от степени замещения и для изучения влияния концентрации на течение модифицированных полимеров. Для определения вязкости использовали раствор полимера в 1% (об./об.) уксусной кислоте. Все вискозиметрические измерения проводили при 25±0,5 °С. Все растворы полимеров необходимых концентраций были приготовлены путем взвешивания лиофилизованного полимера и растворения навески.

## Результаты и обсуждение

### 1. Выделение хитозана

Условия выделения, массовый выход на каждой стадии выделения хитозана и физико-химические свойства полученного хитозана (молекулярный вес, степень ацетилирования, динамическая вязкость) представлены в таблицах 1 и 2. Конечный выход хитозана средней молекулярной массы из отходов нашей работе составил 1,4 %, что показывает перспективность применения речного рака (*Actacus leptodactylus*) в качестве источника для выделения хитина и последующего получения из него хитозана.

Как правило, для получения гидрофобно модифицированных производных хитозана используют реакцию ацилирования ангидридами или хлоридангидридами карбоновых кислот [3], или используют метод восстановления оснований Шиффа хитозана боргидридом или цианоборгидридом натрия [1]. Однако введение длинного алкильного заместителя в молекулу хитозана приводит к уменьшению его растворимости [2]. Увеличить растворимость гидрофобно-модифицированного хитозана можно его N,O-карбоксиметилированием или N-сукциинированием [4-6]. Присутствие карбоксильных

групп частично компенсирует потерю растворимости, связанную с введением в молекулу хитозана гидрофобных алкильных или сукциноильных групп [3].

Таблица 1 – Экспериментальные условия выделения хитозана из речного рака (*Actacus leptodactylus*)

Вес замороженного сырья, (г)	Депротеинирование	Деминерализация	Обесцвечивание	Деацетилирование	Выход хитозана, (сухой вес, г / %)
4000 (1900г после отделения мяса)	1) промывка 2) 1М NaOH, 80 <sup>0</sup> С, 2ч	1М HCl, 20 <sup>0</sup> С, 2ч	0,25 % NaOCl, 5 мин	100 % (вес/об) NaOH, 120 <sup>0</sup> С, 3ч	54 / 1,4

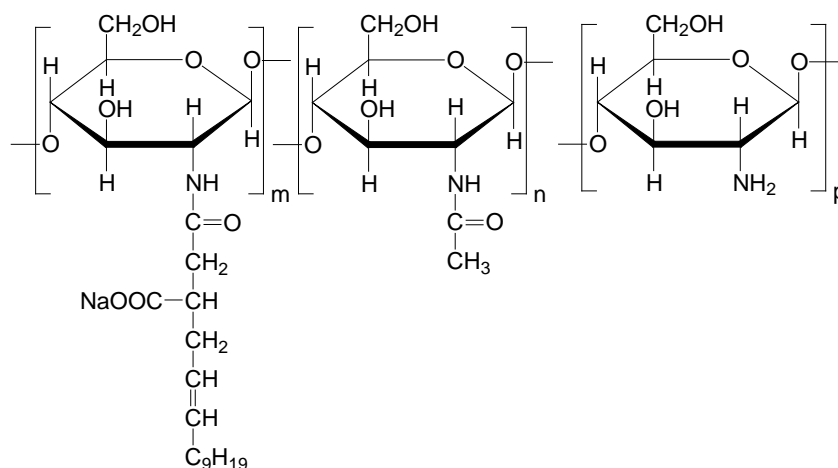
Таблица 2 – Характеристика полученного образца хитозана

Динамическая вязкость 0,25% раствора, сПа	Динамическая вязкость 1,0% раствора, сПа	Молекулярный вес, (Mv), кДа	Степень деацетилирования, мол.%
19	44	70±20	92±5

## 2. Получение N-[(додец-2-енил)сукциноил]хитозана

Одним из путей повышения растворимости является одновременное введение в молекулу хитозана вместе с гидрофобными группами фрагментов, увеличивающих растворимость хитозана, например карбоксильных групп. По нашему мнению, взаимодействие хитозана с (2-додеценил)янтарным ангидридом (ДДЯА) предоставляет возможность получения амфифильных производных хитозана путем одновременного введения в молекулу хитозана длинных гидрофобных алкильных цепей и заряженных гидрофильных карбоксильных групп. Реакцию взаимодействия хитозана (Mv 70±20 кДа), полученного из отходов речного рака, с ДДЯА проводили в слабокислой водной среде содержащей метанол при 50<sup>0</sup>С. В этих условиях хитозан и ДДЯА полностью растворимы в реакционной среде. После завершения реакции продукт реакции легко высаживается из реакционной смеси насыщенным раствором гидрокарбоната натрия. При этом образовавшийся N-[2(3)-додец-2-ен-1-ил/сукциноил]хитозан (ДДС-хитозан) имеет вид сильно набухшего геля. Продукты гидролиза ДДЯА полностью растворимы в слабощелочном водном растворе и легко отделяются от ДДС-хитозана, который выделяют в виде гидрохлорида или ацетата.

Следует отметить, что (2-додеценил)янтарный ангидрид имеет несимметричную структуру и обе его карбонильные группы могут реагировать с аминогруппами хитозана, образуя 2-изомер или 3-изомер. Вероятно преимущественно образуется 3-изомер, т.к. образованию 2-изомера препятствуют пространственные затруднения, вызываемые длинными алифатическими цепями (2-додеценил)янтарного ангидрида. К сожалению, определение соотношения этих изомеров с использованием методов ИК и ПМР спектроскопии невозможно, т.к. в данных методах сигналы –СН, –СН<sub>2</sub>, -и СН<sub>3</sub> протонов 2- и 3-изомеров лежат очень близко друг к другу. К тому же, при использовании метода ПМР спектроскопии мы наблюдали сильное уширение сигналов в спектре вследствие наличия ассоциативных процессов в водных растворах ДДС-хитозана.

Рисунок 1 – Структура ДДС-хитозана ( $n=0,08$ ;  $m= 0,05-0,30$ ;  $p=0,92-m$ )

Для подтверждения структуры ДДС-хитозана использовали ИК-спектроскопию. Среди полос поглощения, характерных для хитозана, в ИК спектре ДДС-хитозана присутствуют полосы 3200-3500 (ОН и NH колебания), 2870-2930 (С-Н колебания), 1664 (С=О амид I), 1578 и 1410 ( $\text{CO}_2^-$ ), 1154(С-О-С мостиковые колебания) и  $1075 \text{ см}^{-1}$  (С-О колебания). Отсутствие сигнала О-ацил связи при  $1720-1760 \text{ см}^{-1}$  показывает, что имеет место исключительно N-замещение даже при использовании избытка (2-додеценил)янтарного ангидрида.

Определение степени замещения и содержания ДДС-групп было проведено методами титрования и рассчитано по результатам микроанализа по соотношению С/Н. Результаты, полученные этими методами, совпадали в пределах ошибки экспериментов. Необходимо отметить, что результаты титрования и микроанализа, согласовывались и с данными ПМР спектроскопии.

На рисунке 2 показана зависимость динамической вязкости раствора ДДС-хитозана от содержания ДДС-групп. Видно, что динамическая вязкость возрастает с увеличением степени замещения и это особенно заметно в случае более концентрированного раствора (рис.2, кривая 2). Этот эффект становится более значительным при степени замещения  $\sim \geq 10$  мол.%, что указывает на наличие сильных межмолекулярных взаимодействий в водных растворах макромолекул ДДС-хитозана, особенно при увеличении его концентрации. Динамическая вязкость резко возрастает с увеличением степени замещения, и это наиболее заметно на более концентрированных растворах (кривая 2). Таким образом, для создания на основе додеценил-хитозанов загустителей степень замещения должна быть выше 10%.

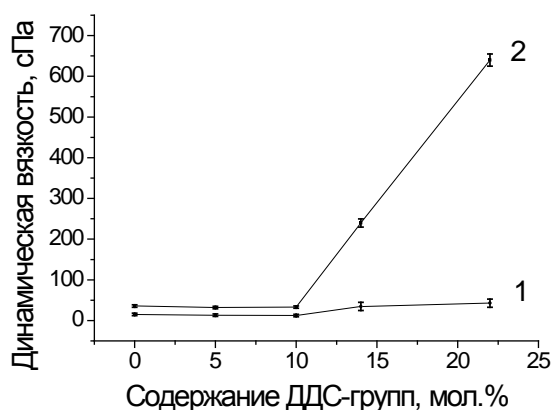


Рисунок 2 – Зависимость динамической вязкости раствора ДДС-хитозана от содержания ДДС-групп

Способность ДДС-хитозанов к пенообразованию была охарактеризована изменением объема пены и зависела от степени замещения. На рисунках 3 и 4 показана зависимость объема и стабильности пены от степени содержания ДДС групп и времени измерения соответственно.

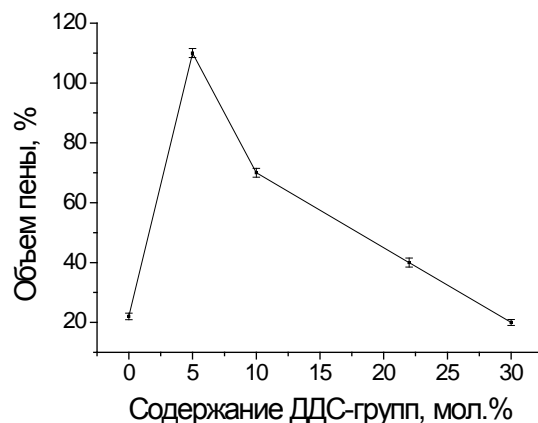


Рисунок 3 – Влияние содержания ДДС-групп в хитозане на объем пены в ацетатном буфере рН 4,5.

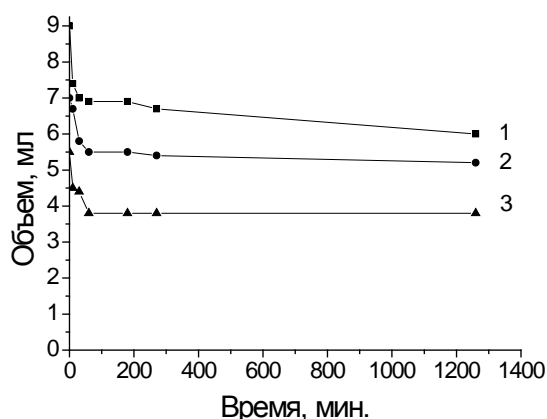


Рисунок 4 – Изменение объема пены во времени для ДДС-хитозана (ДДС 16 мол.%) во времени для концентраций: 1-0,25 г/мл, 2-0,125 г/мл и 3-0,05 г/мл.

В то время как сам хитозан демонстрирует низкую пенообразующую способность, молекулы хитозана, содержащие небольшое количество длинных алкильных групп, обладают высокой поверхностной активностью и могут стабилизировать пену благодаря необратимой адсорбции на поверхности раздела фаз воздух-вода. Факторы, которые уменьшают эту адсорбцию, это - ассоциация гидрофобно модифицированных макромолекул хитозана, межмолекулярная агрегация и ионные взаимодействия. По-видимому, одновременное взаимодействие гидрофобных додеценильных групп и ионные взаимодействия между заряженными амино-группами полисахарида и ионизированными карбоксильными группами ДДС-фрагмента (при высоком содержании ДДС-компонента) могут приводить к указанным эффектам и, как следствие, к уменьшению поверхностной активности и даже полной потере молекулами ДДС-хитозана поверхностно-активных и пенообразующих свойств.

Наибольшую пенообразующую способность показали ДДС-хитозаны со степенью замещения 5-7 мол.%. Дальнейшее увеличение степени замещения сопровождается уменьшением пенообразующей способности, что также вызвано межмолекулярными

взаимодействиями. В результате пенообразующая способность высокозамещенных ДДС-хитозанов (степень замещения >25%) была даже ниже, чем у исходного хитозана.

Ряд факторов определяют пенообразующую способность, включая такие, как поверхностная активность и вязкость раствора. Так как более концентрированные растворы полимера имеют более высокую вязкость, то и пенообразующая способность раствора ДДС хитозана увеличивалась при увеличении концентрации полимера. При этом устойчивость пены, образованной растворами ДДС-хитозана оказалась достаточно высокой, хотя и не зависела от концентрации ДДС-хитозана в указанных пределах (рис.4).

### **Выводы**

1. Показано, что речной рак (*Actacus leptodactylus*) является перспективным источником для выделения из него хитозана;

2. Полученные результаты показывают, что модификация хитозана (2-додецен-1-ил)янтарным ангидридом позволяет получить его растворимые в кислых и нейтральных водных средах гидрофобно модифицированные производные, склонные к образованию сильно вязких растворов, которые могут найти применение в качестве загустителей и пенообразователей.

### **Список литературы**

1. Нудьга Л.А.. Производные хитина и хитозана и их свойства // приведено в «Хитин и хитозан. Получения, свойства и применение» Под ред. Скрябина К.Г., Вихоревой Г.А., Варламова В.П..-М: Наука.- 2002.-С. 141-177.
2. Sakairi N.. Synthesis of a novel polymeric surfactant by reductive N-alkylation of chitosan with 3-O-dodecyl-D-glucose // Polymer. - 2004.- V. 45.- P. 837.
3. Hu Y., Jiang X., Ding Y., Ge H., Yuan Y., Yang C.. Synthesis and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles // Biomaterials.- 2002.-V. 23.- P. 3193.
4. Saito K., Tanioka A.. Polyamphoteric membrane study: potentiometric behaviour of succinyl chitosan aqueous solution // Polymer.- 1996.- V. 37.- P. 5117.
5. Kato Y., Onishi H., Machida Y.. Depolymerization of N-succinyl-chitosan by hydrochloric acid // Carbohydr. Res.- 2002.- V. 337.- P. 561.
6. Holme K.R., Perlin A.S.. Chitosan N-sulfate: a water-soluble polyelectrolyte // Carbohydr. Res.- 1997.- V. 302.- P. 7.