



Хитин и Хитозан

Получение,
свойства
и применение



«НАУКА»

Chitin and Chitosan

Production,
Properties
and Usage

EDITED BY

Academician of the Russian Academy
of Agricultural Sciences *K. G. SKRYABIN*,
G. A. VIKHOREVA, Dr. Sc. (Chem.),
V. P. VARLAMOV, Dr. Sc. (Chem.)

MOSCOW
NAUKA
2002

Хитин и Хитозан

Получение,
свойства
и применение

ПОД РЕДАКЦИЕЙ:

академика РАСХН К. Г. СКРЯБИНА,
доктора химических наук Г. А. ВИХОРЕВОЙ,
доктора химических наук В. П. ВАРЛАМОВА

МОСКВА
НАУКА
2002

ПРЕДИСЛОВИЕ

Настоящая монография является первой книгой, посвященной уникальным природным полимерам - хитину и хитозану, написанной на русском языке российскими исследователями. Эти биополимеры обратили на себя внимание ученых почти 200 лет назад. Хитин был открыт в 1811 г. (H. Braconnot, A. Odier), хитозан - в 1859 г. (C. Rouget), хотя свое нынешнее название получил в 1894 г. (F. Hoppe-Seyler). В первой половине XX в. к хитину и его производным был проявлен заслуженный интерес, в частности к нему имели непосредственное отношение три Нобелевских лауреата: E. Fisher (1903) синтезировал глюкозамин, P. Karrer (1929) провел деградацию хитина с помощью хитиназы и, наконец, W.N. Haworth (1939) установил абсолютную конфигурацию глюкозамина.

В России первые работы по хитину относятся к 1933-1934 гг. (П.П. Шорыгин), хотя широкомасштабные исследования были начаты около 30 лет назад. Сегодня интерес к этим биополимерам небывало возрос. Чем больше ученые узнают о свойствах хитина и хитозана, тем шире сфера их практического использования. И с каждым годом возникают совершенно новые и неожиданные направления. К числу основных направлений использования хитозана можно отнести медицину, сельское хозяйство, косметологию и пищевую промышленность.

Проведенные в России в (1983-2001) шесть конференций убедительно свидетельствуют о том, что наша страна, безусловно, играла и играет существенную роль в мировой "хитинологии". Наши ученые ежегодно участвуют в конференциях и симпозиумах, проводимых в Европе и Азии, съездах Европейского хитинового общества. В марте 2000 г. была зарегистрирована Общероссийская общественная организация - Российское хитиновое общество (РХО), что позволило скоординировать исследования ученых из многих регионов России (подробнее смотри: www.chitin.ru).

В написании настоящей коллективной монографии принимали участие ведущие ученые России из Москвы, Санкт-Петербурга, Нижнего Новгорода, Екатеринбурга, Красноярска, Владивостока. В ней рассмотрены практически все аспекты проблемы, включая сырьевую базу и технологии получения хитина, хитозана и их производных, исследования их строения и свойств, также многочисленные направления применения этих биополимеров, в которых наиболее плодотворно работают отечественные исследователи.

В соответствии с тематикой статьи, которые являются обзорами работ отечественных и иностранных исследователей по данной теме, объединены в семь глав. Обзорный характер статей и цитирование разных авторов обусловили тот факт, что в монографии реакцию превращения хитина в хитозан называют деацетилизацией, что соответствует англ. deacetylation, и деацетилизацией, как принято в русскоязычной литературе. По той же причине

степень превращения хитина в хитозан выражают и в процентных и в мольных долях. Встречаются и другие примеры использования разных единиц измерения и терминов, для разъяснения которых, особенно в статьях медицинского профиля, следует обращаться к специальной справочной литературе. Необходимость подобного замечания обусловлена еще и тем, что книга ориентирована на широкий круг исследователей. Она будет полезна студентам старших курсов, аспирантам и научным сотрудникам различных областей, а также практическим работникам медицины, косметики, сельского хозяйства и пищевой промышленности.

Академик *М.П. Кирпичников*

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ

Глава 1

ПОЛУЧЕНИЕ ХИТИНА И ХИТОЗАНА

В.М. Быкова, С.В. Немцев

Сырьевые источники и способы получения хитина и хитозана

Г.В. Маслова

Теория и практика получения хитина электрохимическим способом

Е.Э. Куприна, С.В. Водолажская

Способы получения и активации хитина и хитозана

С.З. Роговина

Твердофазная модификация хитина и хитозана в условиях механического воздействия

Глава 2

СИНТЕЗ И БИОДЕГРАДАЦИЯ. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ХИТИНЕ ГРИБОВ

А.В. Ильина, В.П. Варламов

Энзимология синтеза и деградации хитина и хитозана

Е.П. Феофилова

Ключевая роль хитина в образовании клеточной стенки грибов

Е.П. Феофилова

Хитин грибов: распространение, биосинтез, физико-химические свойства и перспективы использования

Глава 3

СТРУКТУРА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХИТИНА И ХИТОЗАНА

А.И. Гамзазаде

Структурная неоднородность как фактор изменчивости свойств хитина и хитозана

В.Ф. Урьяш

Термодинамика хитина и хитозана

А.П. Сафронов

Термохимия водных растворов солей хитозана: суперпозиция межмолекулярных взаимодействий и структурных особенностей полимера

Глава 4

ПРОИЗВОДНЫЕ ХИТИНА И ХИТОЗАНА

Л.А. Нудьга

Производные хитина и хитозана и их свойства

Ю.М. Евдокимов

Нуклеиновые кислоты и хитозан

В.Г. Бабак

Коллоидные свойства производных хитина и хитозана. Теория и практическое применение

Глава 5

СОРБЕНТЫ, ПЛЕНКИ, ВОЛОКНА

Л.Ф. Горовой, В.Н. Косяков

Сорбционные свойства хитина и его производных

С.А. Лопатин

Хитозан в хроматографии

Г.А. Вихорева, Л.С. Гальбрайт

Пленки и волокна на основе хитина и его производных

Глава 6

ХИТИН И ХИТОЗАН В МЕДИЦИНЕ

И.Н. Большаков, С.М. Насибов, Е.Ю. Куклин, А.А. Приходько

Использование хитозана и его продуктов при воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта

Н.Н. Дрозд, В.А. Макаров

Антикоагулянтная активность сульфатированных производных хитозана

Е.А. Марквичева

Хитозан и его производные в биоинкапсулировании

Глава 7

ХИТОЗАН В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ, ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И КОСМЕТИКЕ

С.И. Чирков

Противовирусные свойства хитозана

О.Л. Озерецковская, И.И. Васюкова, С.В. Зиновьева

Хитозан как элиситор индуцированной устойчивости растений

Т.М. Сафронова

Применение хитозана в производстве пищевых продуктов

А.И. Албулов, А.Я. Самуйленко, М.А. Фролова

Хитозан в косметике

СЫРЬЕВЫЕ ИСТОЧНИКИ И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ХИТИНА И ХИТОЗАНА

В.М. Быкова

ВНИРО, Москва

СВ. Немцев

Центр "Биоинженерия", Москва svnemtsev@rbcmail.ru

Одним из важнейших достижений мирового научно-технического прогресса в области изыскания новых перспективных материалов за последние тридцать лет стало изучение, создание и внедрение в практику технологии хитина, хитозана и их производных.

СЫРЬЕВЫЕ ИСТОЧНИКИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ХИТИНА И ХИТОЗАНА

В организмах насекомых и ракообразных, клетках грибов и диатомовых водорослей хитин в комплексе с минеральными веществами, белками и меланинами образует внешний скелет и внутренние опорные структуры [1]. Потенциальные источники хитина многообразны и широко распространены в природе. Общая репродукция хитина в мировом океане оценивается в 2,3 млрд т в год, что может обеспечить мировой потенциал производства 150-200 тыс. т хитина в год.

Наиболее доступным для промышленного освоения и масштабным источником получения хитина являются панцири промысловых ракообразных. Возможно также использование гладиуса (скелетной пластинки) кальмаров, сепиона каракатицы [2], биомассы мицелиарных и высших грибов [3]. Одомашненные и поддающиеся разведению насекомые вследствие их быстрого воспроизводства могут обеспечить значительную биомассу, содержащую хитин. К таким насекомым относятся тутовый шелкопряд, медоносные пчелы [4] и комнатные мухи [5]. В России массовым источником хитинсодержащего сырья является камчатский краб и краб-стригун, годовой вылов которых на Дальнем Востоке составляет до 80 тыс. т, а также углохвостая креветка в Баренцевом море. Однако самым перспективным сырьем считается антарктический криль (*Euphausia superba* Dana), массовые скопления которого находятся в Атлантическом, Тихоокеанском и Индоокеанском секторах Антарктики. Общая биомасса криля в Южной Атлантике составляет около 35 млн т, а возможные объемы ежегодного вылова могут составлять от 1,5 до 4,0 млн т [6].

Таблица 1. Качественные характеристики муки и крупки из панциря крабов

Показатель	Характеристика и норма	
	Мука из крабов по ГОСТ 2116-82	Крупка крабовая по ТУ 15-01 1574-91
Внешний вид	Рассыпная без плотных (не разрушаемых при надавливании) комков, допускается мелковолокнистость	Частицы сухого крабового панциря неправильной формы размером не более 15 мм. Допускаются: частицы размером более 30 мм - не более 15%; крабовая крошка размером менее 2 мм не более 10%
Крупность помола	Рассыпная мука должна полностью просеиваться через сито с размером сторон отверстий 3,2 мм, допускается остаток частиц муки на сите не более 5%	Не нормируется
Массовая доля, % влаги, не более	12	12
жира, то же	10	Не нормируется
сырого протеина, не менее	36	Тоже
хлористого натрия, не более	5	"
кальция, не более	13	"
песка, не более	1	"
Содержание металломагнитной примеси размером не более 2 мм, мг/кг, не более	100	"

Значительный резерв сырья представляют запасы рачка-бокоплава гаммаруса в озерах Южного Урала и Западной Сибири, ежегодный объем вылова которого может достигать 100 тыс. т. Рачки-бокоплавы семейства *Talitroidea*, обитающие в прибрежной зоне Южных и Дальневосточных морей и поддающиеся разведению в марикультуре, также могут рассматриваться в качестве потенциального источника хитина и хитозана.

За счет широкого развития пчеловодства, в нашей стране существует возможность получать сырье для производства хитина при подморе пчел. По состоянию на 1.01.2000 г. в Российской Федерации во всех категориях хозяйств имелось 3,5 тыс. пчелиных семей. Сила пчелиной семьи (масса находящихся в пчелиной семье рабочих пчел, измеряемая в кг) равна, в среднем, 3,5-4 кг. Летом в период активного медосбора и весной после зимовки пчелиная семья обновляется почти на 60-80%. Таким образом, ежегодная сырьевая база пчел составляет от 6 до 10 тыс. т. Это дает возможность рассматривать подмор пчел как новый перспективный источник хитина и хитозана наряду с традиционными видами сырья [4].

В России возможна организация достаточно крупного производства хитина и хитозана из панциря ракообразных, преимущественно панциря дальневосточных промысловых крабов.

Таблица 2. Средний выход хитина и хитозана из разных видов крабовых полуфабрикатов

Вид сырья	Выход, %	
	хитин	хитозан
Панцирь ходильных конечностей сухой	33	28
Панцирь карапакса сухой	20	16
Крабовая крупка	25	20
Крабовая мука	16	12
Крабовый панцирь, консервированный в естественных условиях	20	16

Таблица 3. Химический состав различных видов хитинсодержащего сырья, % на сухое вещество

Вид сырья	Белок	Липиды	Минеральные вещества	Хитин
Панцирь криля сушеный, полученный при производстве изолята белка	25-30	1-3	20-22	25-30
Панцирь баренцевоморской углохвостой креветки сухой	43-55	10,5-13,5	26-29	17-20
Рачок гаммарус сушеный	50-54	6-8,5	15-18	22-25
Панцирь крабовый сушеный (крупка)	25-30	2-4	35-40	24-30
Гладиус кальмара (скелетная пластинка) сухой	—	2-5	0,5-2	28-35
Сухой подмор пчел	50-80	-	2-3	10-12
Мука из личинок комнатных мух	40-50	21	-	11-15

Крабодобывающие предприятия Дальнего Востока в качестве сырья для производства хитина и хитозана могут заготавливать панцирь головогруды и конечностей следующих видов крабов: камчатского (*Paralithodes camtschaticus*), синего (*Paralithodes platypus*), равношипного (*Lithodes aequispina*) крабов, а также крабов-стригунов опилию (*Chionoecetes opilio*) и бэр-ди (*Chionoecetes bairdi*). Сыромороженный или варено-мороженный панцирь подвергается сушке и дроблению на рыбомучных установках или специализированном оборудовании. Панцирь краба для промышленной переработки заготавливают преимущественно в виде муки или крупки (сечки), качественные характеристики которых приведены в табл. 1.

Выход хитина и хитозана из различных полуфабрикатов крабового панциря представлен в табл. 2. Лучшим видом сырья для получения хитина и хитозана из панциря крабов считается крупка, полученная из трубчатого панциря ходильных конечностей. Из такого сырья получается хитозан самого высокого качества с высоким выходом готового продукта.

Кроме крабового панцирьсодержащего сырья (ПСС) для промышленной переработки используют и другие виды сырья, химический состав которых приведен в табл. 3.

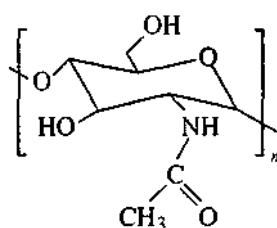
Массовые источники ПСС имеются во многих странах, но промышленное производство хитина и хитозана освоено преимущественно в Японии, где суммарно по данным на 1998 г. выпускается до 2500 т хитина и хитозана в год. В США выпускается около 1000 т хитозана и других модификаций хитина в год. Европейские страны (Италия, Норвегия, Польша) выпускают до 100 т хитозана в год. В последние годы развитие промышленного производства хитина и его производных развивается в Индии, Китае и Таиланде. В качестве сырья для получения полимеров, в Японии и Китае используются ПСС от переработки крабов и креветок, а в США - ПСС крабов и омаров [7].

Отечественная промышленность начала осваивать производство хитина и хитозана в 1970-1980 гг. и к настоящему времени общий объем их выпуска достигает 80 т в год.

ХИТИН, ЕГО СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА

Биополимеры хитин и хитозан обратили на себя внимание ученых почти 200 лет назад. Хитин был открыт в 1811 г. (Н. Braconnot, А. Odier), а хитозан в 1859 году (С. Rouget), хотя свое нынешнее название получил в 1894 г. (F. Hoppe-Seyler). В первой половине XX века к хитину и его производным был проявлен заслуженный интерес, в частности, к нему имели непосредственное отношение три Нобелевских лауреата: F. Fischer (1903) синтезировал глюкозамин, Р. Karrer (1929) провел деградацию хитина с помощью хитиназ, а W.H. Haworth (1939) установил абсолютную конфигурацию глюкозамина.

Хитин - линейный аминополисахарид, состоящий из К-ацетил-2-амино-2-дезоксиглюкопиранозных звеньев.



По химической структуре он близок к целлюлозе и только ей уступает по распространенности в природе. Хитин нерастворим в воде, разбавленных кислотах, щелочах, спиртах и других органических растворителях. Он растворим в концентрированных растворах соляной, серной и муравьиной кислот, а также в некоторых солевых растворах при нагревании, но при растворении он заметно деполимеризуется. В смеси диметилацетамида, N-метил-2-пирролидона и хлористого лития хитин растворяется без разрушения полимерной структуры.

Хитин как неразветвленный полисахарид с β -(1-4)-гликозидными связями, образует фибриллярные структуры, для которых характерна линейная конформация молекул, закрепленная водородными связями.

Подобные молекулы, располагаясь приблизительно параллельными пучками, образуют структуры, регулярные в трех измерениях, что характерно для кристаллов. Так, посредством рентгеноструктурного анализа показано, что молекулярные звенья хитина имеют конформацию 4C_1 .

В зависимости от расположения полимерных молекул различают три формы структуры хитина - α , β и γ . α -хитин представляет собой плотно упакованный, наиболее кристаллический полимер, в котором цепочки располагаются антипараллельно, он характеризуется самым стабильным состоянием. В β -хитине цепочки располагаются параллельно относительно друг друга, а в γ -хитине две цепочки полимера "направлены" "вверх" относительно одной, направленной "вниз", β - и γ -хитины могут превращаться в α -хитин [1].

Панцирь ракообразных и кутикула насекомых играют роль внешнего скелета и выполняют защитные функции. Хитин, входящий в состав панциря ракообразных, образует волокнистую структуру, он связан с белками посредством пептидной связи деацетилированной аминогруппы с диаминомонокарбоновыми аминокислотами неароматического строения, имея вид хитин-белкового комплекса (ХБК).

Особым образом изменяется хитин под действием ферментов в организме ракообразных. В процессе линьки хитин панциря подвергается значительному разрушению и последующему восстановлению. Участие в этом процессе специфических ферментов способствует протеканию синтеза и деградации хитина с исключительно большой скоростью. Хитинолитические ферменты имеют неодинаковый уровень активности в зависимости от физиологического состояния ракообразных. У крабов например, хитиназа синтезируется постоянно, а синтез хитоби-азы усиливается перед линькой и немедленно уменьшается после ее окончания [8]. У ракообразных сразу после линьки панцирь мягкий, эластичный, состоящий только из ХБК, но с течением времени происходит его упрочнение за счет минерализации структуры ХБК в основном карбонатом кальция. Эта минерализация проходит в большей или меньшей степени в зависимости от вида животного.

Таким образом, панцирь ракообразных построен из трех основных элементов - хитина, играющего роль каркаса, минеральной части, придающей панцирю необходимую прочность и белков, делающих его живой тканью. В состав панциря входят также липиды, меланины и другие пигменты. Пигменты панциря ракообразных представлены, в частности, каротиноидами типа астаксантина, астацина и криптоксантина. В кутикуле взрослых насекомых хитин также ковалентно связан с белками типа артраподина и склеротина, а также большим количеством меланиновых соединений, которые могут составлять до 40% массы кутикулы. Кутикула насекомых отличается большой прочностью и в то же время гибкостью благодаря хитину, содержащие которого от 30 до 50%. В клеточной стенке некоторых фикомицетов, например в итридиевых, хитин обнаруживается вместе с целлюлозой. Хитин у грибов, как правило, ассоциируется с другими полисахаридами, например β -1-3-глюканом, у членистоногих он связан с белками типа склеротина и меланинами.

Структурный компонент хитина N-ацетил-О-глюкозамин у бактерий, наряду с N-ацетилмуравовой кислотой, является компонентом клеточной стенки. В животном мире N-ацетилглюкозамин входит в состав мукополисахаридов (гликозаминогликаны) соединительной ткани (гиалуроновой кислоты, хондроитин-сульфатов, гепарина), групповых веществ крови и других гликопротеинов. Остаток N-ацетил-Б-глюкозамина обычно находится на восстановленном конце углеводных цепей животных гликопротеинов, образуя связь углевод-белок. Этим объясняется совместимость хитина и хитозана с живыми тканями. Наиболее распространенным типом связи в животных гликопротеинах является N-гликозидная связь, образуемая остатком N-ацетилглюкозамина и б-амидной группой аспарагина [9].

Заготовка панцирьсодержащего сырья. Панцирь крабов заготавливают в мороженом, сушеном или химически консервированном виде в зависимости от вида и качества панциря. Так, панцирь ходильных конечностей, получаемый при глубокой переработке крабов, предпочтительно заготавливать в мороженом виде. В этом случае отходы при производстве консервов (панцирь ходильных конечностей) промывают в морской воде, отделяют избыточную влагу и дробят на кусочки размером не более 4 см в специальных дробилках. Дробленый панцирь замораживают блоками массой в 10 кг при температуре -18 °С. Продолжительность хранения мороженого панциря краба не более 2 лет. Хитозан из панциря ходильных конечностей крабов считается высшего качества и имеет спрос как на внутреннем, так и на внешнем рынке.

Практикуется заготовка ПСС краба в сушеном виде. Современное состояние промысла крабов диктует необходимость использования для производства хитина и хитозана целого панциря головогруды (карапакса), который до настоящего времени целенаправленно для этой цели не использовался. Заготовленный на судах-краболовах сыромороженный и вареномороженный панцирь карапакса и

абдомена, а также нестандартный целый краб и прилов перерабатывают на борту транспортного судна путем сушки и дробления на рыбомучной установке. Полученная крабовая "крупка" имеет размер частиц от 0,6 до 6 мм.

Использование химического консервирования крабового панциря позволяет заготавливать ПСС при небольших объемах промысла и обеспечивает быструю остановку автолитических процессов в сырье. Из известных способов химического консервирования предпочтительно использовать щелочное, так как при этом способе наряду с консервированием сырья протекает его щелочное депротеинирование, что облегчает дальнейшую переработку. Консервирование панциря крабов гидроокисью натрия позволяет получить в условиях промысла ПСС, содержащее 5-8% белка и пригодное для получения качественного хитозана. Сходные способы заготовки ПСС используют и при обработке панциря креветок.

Панцирьсодержащие отходы криля, получаемые в процессе производства пищевой продукции, после отделения избыточной влаги должны быть подвергнуты сушке или замораживанию. Мороженный панцирь блоками по 10 кг хранят при температуре не выше -18 °С, а сушеный - при температуре окружающего воздуха не более 12 месяцев. Вместе с тем, в условиях промысла не всегда есть возможность для замораживания или сушки всего количества ПСС. В этом случае возможно химическое консервирование панцирьсодержащих отходов.

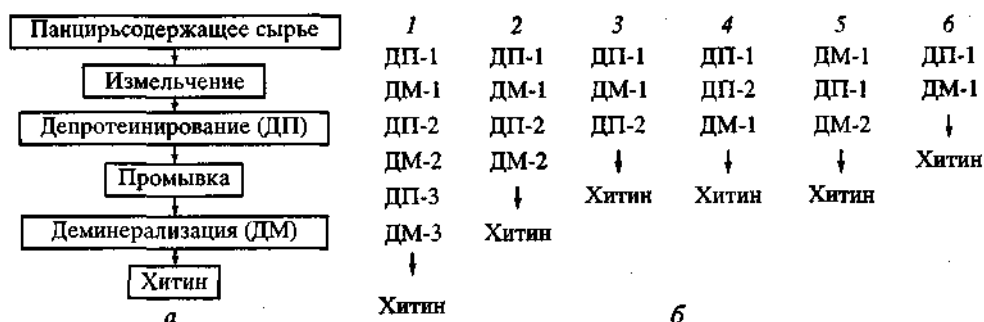
В качестве консервантов используются препараты, обеспечивающие сохранность консервируемого материала в условиях положительных температур и не оказывающие отрицательного влияния на качество и выход хитина и хитозана. Этим требованиям удовлетворяют соляная, муравьиная и уксусная кислоты, едкий натр или кали, формальдегид, метабисульфит натрия, нитрат натрия и др.

В связи с тем, что соляная кислота и едкий натр применяются в технологии производства хитина и хитозана, эти реактивы наиболее предпочтительны для консервирования панцирьсодержащих отходов криля. Добавление соляной кислоты или едкого натра в количестве 2,5% к массе панцирьсодержащих отходов обеспечивает их сохранность в течение 12 месяцев. Панцирь криля заготавливают в судовых условиях (мороженный и варено-мороженный) и хранят при -18 °С до 12 месяцев. Гаммарус для получения хитина также заготавливают в мороженном и сушеном виде. Целый гаммарус замораживают блоками по 10 кг до температуры -18 °С, а сушат в сушилках с принудительной циркуляцией горячего воздуха. Продолжительность хранения мороженого и сушеного гаммаруса 12 месяцев. Такие же способы заготовки применяют и для талитрида.

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ХИТИНА

Хитин как нерастворимый полимер не поддается выделению из панциря напрямую. Для его получения необходимо последовательно отделить белковую и минеральную составляющие панциря, т.е. перевести их в растворимое состояние и удалить.

Рис. 1. Обобщенная схема (а) и другие варианты получения хитина (б)



Для получения хитина и его модификаций с воспроизводимыми характеристиками необходимо исчерпывающее удаление белковой и минеральной составляющих панциря. Все известные способы извлечения хитина из ПСС можно разделить на две основные группы: 1) химическая обработка кислотами, щелочами, комплексоном и др.; 2) методы биотехнологии, применение ферментных препаратов и протеолитических бактерий.

Химическая обработка ПСС. Большинство способов этой группы основаны на одно-, двухстадийной очистке хитина от белка и минеральных соединений -депротеинировании (ДП) и деминерализации (ДМ). Некоторые способы предусматривают отделение липидов и пигментов.

Получению хитина из различных видов ПСС с помощью химических реагентов сопутствуют следующие этапы (рис. 1, а):

В зависимости от вида ПСС и требуемого качества хитина, а также получаемого из него хитозана количество операций ДП, ДМ и их последовательность бывают различными (рис. 1, б). Эти схемы не исчерпывают всего разнообразия используемых вариантов [10], так как способы выделения хитина из ПСС должны выбираться в зависимости от поставленных требований к конечному продукту, которые в

свою очередь диктуются сферой его применения. Например, однократная обработка щелочью применима для мягкого тонкого панциря (крыль, гаммарус, насекомые). Двукратная обработка щелочью применяется в случае необходимости получения хитина, полностью лишенного остатков белка. Остаточное содержание минеральных веществ при однократной обработке панциря кислотой не превышает обычно 1-3%. Вместе с тем, повторная ДМ дает возможность получения хитина без примесей золы, что важно также в случае обработки толстого панциря крабов.

Некоторые преимущества в качественных характеристиках имеют хитины, полученные в условиях чередования стадий ДМ и ДП. Порядок их осуществления существенно влияет на качество получаемого хитина и в последующем хитозана. При обработке ПСС по схеме ДМ-ДП кинематическая вязкость полученного крабового хитозана значительно выше, чем у хитозана, полученного по схеме ДП-ДМ.

Эффективность процессов ДМ и ДП существенно зависит от степени измельчения панциря, т.е. от увеличения площади соприкосновения полимера с реагентом, но при этом снижается выход готового продукта за счет увеличения технологических потерь продукта при обработке.

Режимы проведения стадий ДП и ДМ различных видов ПСС весьма разнообразны. По способу Hackman [1] панцирь краба обрабатывают 2N соляной кислотой в течение пяти часов при комнатной температуре, полученную суспензию измельчают и депротеинируют 1 N раствором гидроксида натрия при 100 °C в течение 12 ч. Для наиболее полного ДП процесс повторяется четырехкратно. Способ Whistler & BeMiller [1] предусматривает ДП измельченного панциря в 10%-ном растворе гидроксида натрия в течение трех суток, депигментирование 95%-ным этанолом, отмывку растворителями. ДМ проводят 37%-ной соляной кислотой в течение четырех часов. ДМ по способу Horowitz, Rosoman & Blumental [1] проводят перед ДП. Затем панцирь обрабатывают 90%-ной муравьиной кислотой в течение 18 ч при комнатной температуре и далее депротеинируют 10%-ным раствором гидроксида натрия в течение 2,5 ч на паровой бане. Упомянутые авторы не придавали значения порядку проведения стадий ДП и ДМ. Однако позднее было показано, что порядок проведения стадий ДП и ДМ и их кратность существенно влияют на качество получаемого хитозана.

Очевидным недостатком указанных способов получения хитина являются достаточно жесткие условия обработки хитинсодержащего сырья, включающие длительное время нахождения полимера в растворе щелочи и кислоты при высокой температуре (для ДП). Это приводит к деградации и частичному деацетилированию (ДА) хитина.

В 1970-1980-х гг. во Владивостоке, в Мурманске, а затем на экспериментальной базе ВНИРО в Москве была внедрена промышленная технология производства хитина и хитозана из панциря крыля и панциря баренцевоморской креветки. Процесс получения хитина включает ДП 1 N раствором едкого натра в течение 30 минут при температуре 70-75 °C, деминерализацию 1 N раствором соляной кислоты в течение 30 мин при комнатной температуре.

Для более эффективного отделения белка в условиях проведения щелочного гидролиза белковой части панциря при более низкой концентрации щелочи применяются поверхностно-активные вещества (ПАВ). Способ получения хитина из панциря крыля, разработанный А.И. Гамзадзе с сотрудниками [11], основан на кислотно-щелочной обработке отходов от производства изолятов белка крыля. Эти отходы без измельчения подвергают ДП в 2-5%-ном растворе гидроксида натрия при комнатной температуре в течение 6-8 ч. На стадии ДП используют добавку ПАВ анионного типа (додецилсульфат натрия, натриевая соль лауриновой кислоты), которая позволяет снизить концентрацию щелочи и наряду с эффективным удалением белка экстрагировать красящие вещества и липиды.

Способ обработки панциря крыля, применяемый в Польше [12], основан на получении хитина из замороженных отходов производства мяса крыля. Отходы размораживают и измельчают, затем их промывают водой и деминерализуют 3,5%-ной соляной кислотой в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Далее проводят удаление жира и пигментов экстракцией уксусноэтиловым эфиром. Депротеинирование осуществляют с помощью 3,5%-ного раствора гидроксида натрия при температуре 25 °C более 2 ч. Относительная простота такой технологии и доступность основных реагентов позволили применить аналогичные технологии в промышленных масштабах в разных странах [3]. В Индии в промышленных условиях получают хитин из отходов пальчатой креветки *Matapenaeus dobsoni*. При этом ДП проводят кипячением свежих отходов в 0,5%-ном растворе гидроксида натрия в течение 30 мин. Жидкую часть отделяют и получают из нее белок. Окончательное ДП панциря проводят дважды при нагревании его в 3%-ном растворе гидроксида натрия. Далее панцирь обесцвечивают раствором гипохлорида, содержащего 0,3-0,5% растворенного хлора, промывают водой и подвергают деминерализации 1,25N раствором соляной кислоты при комнатной температуре в течение часа. Полученный хитин готов к производству хитозана.

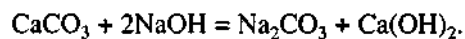
В США используют технологию, предложенную Пенистоном К.П. и Джонсоном Э.Л. [14]. Панцирь различных ракообразных подвергают мокрому размолу до размера частиц 1,3-3,8 мм и депротеинируют при температуре 65-71 °C в течение 1-2 ч при непрерывной подаче сырья и 0,05-0,2 N раствора гидроксида натрия методом противотока. В гидроксид натрия перед депротеинированием добавляют 0,1% бисульфита натрия, что приводит к интенсификации процесса. Отделенную жидкую фракцию направляют на получение белка, а твердую - подвергают деминерализации соляной кислотой до полного удаления золы.

Все перечисленные способы получения хитина относятся к разновидностям традиционного кислотно-щелочного способа получения хитина и отличаются только последовательностью проведения стадий ДМ и ДП, а также режимами обработки.

Деминерализация - важная стадия при производстве хитина. Степень ДМ определяет вязкостные и другие физико-химические характеристики как хитина, так и получаемого из него хитозана. Удаление минеральных веществ (в основном карбоната и фосфата кальция) из панциря при производстве хитина обычно осуществляется соляной, муравьиной, азотной или сернистой кислотами. Однако обработка хитинсодержащего сырья кислотой может приводить к частичной деструкции и ДА хитина, снижать вязкость раствора хитозана.

Известны и другие, нестандартные методы получения хитина. Так, метод Foster & Hackman [1] предполагает мягкие условия, не приводящие к деструкции и ДА хитина. В его основе лежит воздействие на ПСС этилендиаминтетрауксус-ной кислоты (ЭДТА). С этой целью панцирь краба подвергали длительному воздействию ЭДТА в течение 2-3 недель при pH 9,0. Измельченный панцирь (размер частиц 1-10 мм) обрабатывали в некоторых случаях за 15 минут. После такой обработки хитин содержал до 1% золы и 5% белка.

Те же Пеннестой и Джонсон [15] панцирьсодержащее сырье подвергали грубому размолу до размера частиц 3-6 мм. Далее массу загружали в реактор и в противотоке экстрагировали белок 0,5-2%-ным гидроксидом натрия в течение 1-4 ч при температуре 50-70 °С. При дальнейшей обработке они совместили стадии ДМ и ДА путем обработки депротеинированного панциря 30-50%-ным раствором гидроксида натрия при температуре 120-150 °С. При этом происходит одновременное ДА хитина и превращение карбоната кальция в гидроксид кальция по уравнению



Сточный раствор после этой операции содержит избыток гидроксида натрия, ацетата натрия и карбоната натрия. Раствор NaOH регенерировали и использовали повторно. Это явление хорошо известно в производстве каустической соды.

Общий недостаток этих способов состоит в необходимости обработки исходного материала в агрессивных средах кислот и щелочей, что требует специального, стойкого к коррозии оборудования, и приводит к повышению стоимости производства и готового продукта. Кроме того, при производстве нужны специальные участки хранения и приготовления растворов кислот и щелочей, что ужесточает требования техники безопасности.

К перечисленным недостаткам химических способов получения хитина можно добавить и то, что все они плохо вписываются в схему безотходной технологии. Многие из них не учитывают использование побочных продуктов производства, например белка. Белок, выделенный из щелочных и кислотных гидролизатов, содержит значительное количество соли, что ограничивает область его применения.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПОЛУЧЕНИЯ ХИТИНА

Применение ферментов для ДГТ панциря позволяет создать более мягкие условия обработки ПСС, а также совместить несколько операций, а значит и упростить процесс. При этом снижаются агрессивность реакционной среды, затраты на оборудование и увеличивается срок его службы.

К наиболее простым способам получения хитина из панцирьсодержащего сырья в этой группе относится способ применения активного ферментного комплекса самого сырья (автопротеолиз). Такой способ применительно к отходам крыла описан в [16], а панцирь краба - в [17]. ДП ПСС осуществляли смешиванием целого крыла с ПСС в соотношении 1:2 при температуре 50 °С. Полученную массу перемешивали в течение пяти часов. Степень перехода белка в жидкую фазу составляла 68%. В результате такой обработки получили хитин, содержащий 34% минеральных веществ и 12% белка. Следовательно, данный способ не обеспечивает полного ДП хитина и требует дополнительной обработки по извлечению из него белка. Кроме того, имеются данные о присутствии в ферментном комплексе крыла активных хитиназ, воздействие которых на хитин снижает его молекулярную массу.

С точки зрения полноты ДП панциря ракообразных более эффективно использование активного штамма протеолитических бактерий *Pseudomonas maltophilia* [18]. Панцирь предварительно декальцинировали 2N соляной кислотой в течение двух суток при комнатной температуре, измельчали до размера частиц 0,5 см. Культуральную среду готовили прибавлением 0,8 г панциря к 80 мл 0,2%-ного раствора K_2HPO_4 , раствор доводили соляной кислотой до pH 7,0. *P. maltophilia* засевали в колбу, инкубировали при 30 °С и взбалтывали. По окончании времени инкубации хитин промывали водой. Содержание белка в хитине снижалось до 1%.

Известен способ ДП хитина крыла свежесделенной культурой *Bacillus Subtilis*, позволяющий достичь степени гидролиза белка 98% за 36 ч, причем полученный хитин содержал менее 1% белка [19].

Разработаны способы получения хитина из панциря краба с применением ферментов. Так, способ получения хитина [1] предполагает декальцинирование соляной кислотой, содержащей 50 г HCl на литр (1,4N) при комнатной температуре в течение 24 ч с последующим ДП хитина папаином, пепсином или

трипсином.

Способ Рогожина и др. [20] предусматривает совмещение стадий ДМ и ДП хитина с применением проторизина и протаваморина - кислых протеиназ микробиологического происхождения. Процесс протекает при pH 3,0 и 35-40 °С в течение 24 ч. В качестве кислых протеиназ используются комплексы протеолитических ферментов, выделенные из грибов *Aspergillus niger*, *A. fetidus*, *A. orizai*. Полученный таким образом хитин не содержит золы, остаточное содержание белка 5-10%. Возможно полное удаление остатков белка в хитине путем его промывки на конечном этапе раствором щелочи.

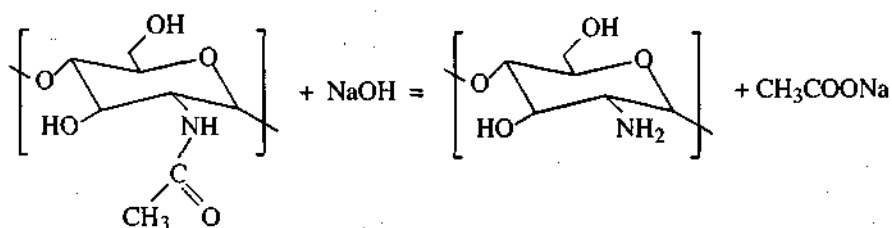
Промышленное использование получили способы получения хитина из панциря криля с применением щелочных протеиназ протосубтилина Г20Х [21] и панкреатина [22].

Биотехнологические способы получения хитина обладают одним общим недостатком, заключающимся в неполном удалении белка панциря (до 95%), что может отрицательно сказаться в дальнейшем как на качестве хитина, так и на характеристиках его модификаций. Кроме того, при выборе ферментного препарата для ДП ПСС необходим строгий контроль на содержание в нем хитиназ, поскольку в процессе обработки ПСС слишком большая активность ферментов этой группы может привести к чрезмерной деструкции полученного хитина.

ПОЛУЧЕНИЕ ХИТОЗАНА

Деацетилирование хитина. Первой из модификаций хитина было получено его деацетилированное производное - хитозан, представляющий собой высокомолекулярный полимер глюкозамина, растворимый в разбавленных органических и неорганических кислотах (кроме серной). В отличие от практически нерастворимого хитина, хитозан, растворимый в кислых растворах, имеет широкие возможности для применения в различных отраслях промышленности, сельском хозяйстве и медицине.

В основе получения хитозана лежит реакция отщепления от структурной единицы хитина-N-ацетил-D-глюкозамина ацетильной группировки или реакция деацетилирования.



Реакция ДА сопровождается одновременным разрывом гликозидных связей полимера. Таким образом, хитозан представляет собой полидисперсный по молекулярной массе полимер D-глюкозамина, содержащий 5-15% ацетамидных групп, а также до 1 % групп, соединенных с аминокислотами и пептидами.

По внешнему виду хитозан представляет собой чешуйки размером менее 10 мм или порошки различной тонины помола, от белого до кремового цвета, часто с желтоватым, сероватым или розоватым оттенком, без запаха. Другими свойствами сухого хитозана являются электризуемость и вяжущий вкус. По токсичности хитозан относится к 4-му классу и считается безопасным.

Процесс ДА проводят обычно с помощью концентрированных щелочей при повышенных температурах. Первым опытом получения хитозана было сплавление хитина с твердой щелочью при 180 °С. Этим способом получали продукт со степенью деацетилирования (СД) 95%, но значительно деструктированный (до 20 единиц).

Наиболее распространено ДА растворами щелочей 30-50%-ной концентраций, поскольку оно является более мягким. Существуют различные модификации этого способа. ДА в водных растворах щелочей может обеспечить 100%-ную степень деацетилирования при использовании ступенчатого процесса и значительно менее деструктирует хитозан. При получении хитозана в указанных условиях одновременно с реакцией ДА идет деструкция хитина, т.е. разрыв его цепей по гликозидным связям, что приводит к уменьшению молекулярной массы хитозана и снижению его вязкости.

Применение растворов щелочей высокой концентрации при высоких температурах делает необходимым использование оборудования, изготовленного из никелевых сплавов или с никелевым покрытием. Чаще всего для проведения ДА применяют реакторы, изготовленные из легированных жаропрочных марок сталей, снабженные перемешивающим устройством и паровой рубашкой.

Определенную сложность в процессе получения хитозана представляет регенерация или утилизация сточных вод, представляющих собой щелочные растворы высокой концентрации. В большинстве случаев щелочное ДА проводится 30-50%-ным раствором щелочи, и хотя в процессе реакции концентрация щелочи снижается, слив такого реагента в систему канализации напрямую недопустим. В этой связи при проектировании хитозанового производства необходимо предусматривать утилизацию щелочных растворов на смежном производстве или нейтрализацию щелочных стоков с последующей их очисткой от белковых загрязнений.

Существует ряд методов частичной или полной замены воды в деацетилирующем агенте другим

растворителем или теплоносителем. Например в [23] в качестве теплоносителя используют жидкий парафин, гексан, изопропиловый спирт. При значительном снижении расхода воды и щелочи на ДА, снижении степени деструкции полимера достигается СД до 92%.

Способ Brossignac [1] полностью исключает воду, заменяя ее смесью этанола с моноэтиленгликолем. При ДА гидроксидом калия при 120 °С достигается СД 83%.

Takeda [24] разработал способ, при котором хитин обрабатывают в инертной атмосфере гидроксидом натрия при pH 13 и температуре 100 °С в течение 10-20 ч. Основные недостатки этого способа - низкая СД (70%), длительность обработки, а также наличие деструкции основной цепи полимера.

Способ ДА хитина гидразингидратом [25] предусматривает двух-четырёхчасовую обработку хитина при 120-150 °С. При минимальной деструкции хитина достигается СД 90-97%. Кроме того, ДА хитина можно провести с помощью ферментов - деацетилаз микробиологического происхождения.

Процесс щелочного ДА изучен значительно лучше других, перечисленных выше. Высокая устойчивость хитина к ДА объясняется наличием водородной связи между карбонильной группой и азотом амидной группы смежных цепочек хитина в мицелярной структуре. Для разрушения этой, весьма прочной связи, процесс ведут при высокой температуре (100-160 °С). С увеличением температуры даже при невысокой концентрации щелочи (30%) степень ДА достигает почти предельного значения (98%), однако при этом снижается молекулярная масса, а следовательно, и вязкость растворов полученного хитозана. Для сохранения молекулярной массы полимера предпочтительно снижать температуру обработки хитина. Реакция ДА наиболее быстро проходит в течение первого часа щелочной обработки. За это время хитин деацетилируется примерно на 70% при условии обработки его 50%-ной щелочью при 100 °С. Далее скорость реакции значительно замедляется и к 5 часам СД достигает 80%. Таким образом, длительная обработка не приводит к резкому повышению СД, в то время как деструкция происходит на всем протяжении процесса.

Как уже отмечалось, структура хитина представляет собой кристаллическую решетку, в связи с чем степени растворимости и набухания хитина в различных средах довольно низки. Степень измельчения хитина перед ДА важна для получения однородного продукта. Измельчение хитина облегчает доступ деацетилирующего агента внутрь структуры, благодаря чему достигается равномерное протекание процесса ДА и сопровождающей его деструкции. При использовании слишком крупных частиц хитина процесс ДА проходит не в полной мере, поверхностные слои таких частиц деацетилированы в большей степени, чем внутренние. При растворении в уксусной кислоте эти поверхностные слои образуют раствор, а внутренние слои частиц не полностью деацетилированы, только набухают. Такой неоднородный по СД хитозан может иметь ограниченное применение. В случае достаточно тонкого измельчения хитина все слои частиц деацетилируются в одинаковой степени, что приводит к получению более однородного продукта.

Важную роль в снижении степени деструкции хитина играет среда, в которой проводят реакцию ДА, т.е. присутствие в ней кислорода. Разработан ряд способов удаления кислорода из сферы реакции. Самый простой из них - плотная укладка и подпрессовка смоченного щелочью хитина с последующим вытеснением из тары остатков воздуха азотом и ее герметизацией. Применяется также барботирование реакционной смеси азотом, пропускание азота над поверхностью суспензии и др. Во всех случаях при ДА хитина в инертной среде отмечается повышение молекулярной массы и вязкости хитозанов без снижения СД в противовес данным, полученным при деацетилировании хитина на воздухе.

Важным фактором при ДА хитозана является перемешивание реакционной массы. Известны способы получения хитозана и в реакторах с перемешиванием и в емкостях из различных материалов (включая полимерные) без перемешивания. В случае применения перемешивания необходимо учитывать консистенцию реакционной массы, которая определяется соотношением жидкой и твердой фаз. Оптимальным можно считать массовое соотношение хитин:раствор щелочи 1:5-1:12 в зависимости от качества хитина, взятого для обработки. Такая суспензия хорошо перемешивается в реакторе и не требует лишнего объема щелочи.

Хитин, как уже отмечалось, по своему строению и химическому составу близок к целлюлозе, что предопределяет и близость их свойств. Известно свойство целлюлозы набухать в разбавленных растворах щелочей. Сходные свойства обнаружены и у хитина. Так, при 12-кратном проведении замораживания-размораживания хитина, суспендированного в растворах щелочи 15-20%-ной концентрации происходит сильное набухание хитина и его растворение. Такое набухание и растворение хитина в растворах щелочей при пониженных температурах обусловлено разрыхлением его структуры, что создает лучшие условия для модификации и получения однородного по качеству полимера. Разработан способ получения щелочного раствора хитина за один цикл замораживания-размораживания и проведения затем реакции ДА в гомогенной среде [26].

Все известные промышленные способы ДА хитина преимущественно связаны с применением высоких температур и концентрированных растворов щелочей. Однако предложен способ получения хитозана методом "холодного" ДА хитина [27]. Реакция проходит при комнатной температуре (не ниже 20-22 °С) с использованием емкостей из нержавеющей стали или полимерных материалов. Концентрация применяемого раствора гидроксида натрия снижена до 35-40% при массовом соотношении хитин:раствор щелочи, равном 1:10-1:15. Такие мягкие условия реакции обеспечивают получение

хитозана с высокой вязкостью и степенью ДА.

Сушка хитозана. Измельчение и хранение.

После ДА и отмывки до нейтрального значения pH хитозан представляет собой сильно гидратированный, набухший продукт с содержанием воды более 70%. Для предотвращения ороговения хитозан сушат при 50-55 °С. При сушке в условиях более высоких температур хитозан уплотняется, темнеет и теряет растворимость, что снижает возможность его использования. Наилучшим образом показывает себя сушка хитозана в псевдокипящем слое при 50 °С. Низкомолекулярный водорастворимый хитозан и олигосахариды сушат на распылительных и лиофильных сушилках. Воздушно-сухой хитозан содержит 8-10% воды.

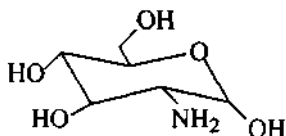
Для использования хитозана, например, в фармации и парафармации в качестве субстрата для таблетирования и капсулирования необходимо измельчить его до размера частиц 100-200 мкм. Хитозан, сохраняя кристаллическую структуру хитина, плохо поддается измельчению, и поэтому для получения порошкообразного продукта его измельчают последовательно резанием, истиранием и ударно-сдвиговой деформацией, применяя для этого соответственно дезинтеграторы, мельницы и шаровые мельницы. Наибольшую трудность при измельчении представляет плохо высушенный или ороговевший хитозан, так как в этом случае он обладает пластичностью и плохо поддается измельчению.

В процессе хранения хитозана на свету наблюдается его потемнение до коричневого цвета, снижение растворимости. Особенно это относится к тонко измельченному, а также распылительно высушенному хитозану. Хитозан представляет собой гигроскопичный материал, порошковый хитозан может слеживаться при хранении в помещениях с повышенной влажностью или при перепадах температур. Поэтому хитозан хранят герметично укупоренным в светонепроницаемой упаковке (банки, пакеты, мешки) в сухих закрытых помещениях при комнатной температуре.

МОДИФИКАЦИИ ХИТИНА И ХИТОЗАНА

Межмолекулярные взаимодействия и комплексообразование высокомолекулярных соединений - важнейшие проблемы химии и физики полимеров. Всевозрастающий интерес к химии полиэлектролитов обусловлен непрерывным расширением области их практического применения в качестве специфических сорбентов, биологически активных соединений и др. Реакции взаимодействия между противоположно заряженными группами молекул полиэлектролитов, приводящие к образованию растворимых интерполимерных комплексов, открывают новые возможности для варьирования физико-химических и биологических свойств полиэлектролитов.

Глюкозамин, или 2-амино-2-дезоксид-D-глюкоза - весьма распространенная модификация хитина, относящаяся к группе аминосахаров. В молекуле глюкозамина одна или две гидроксильные группы замещены аминогруппой. Структурная формула D-глюкозамина представлена ниже



Глюкозамин обладает свойствами аминов, является сильным основанием и легко образует устойчивые соли. Для медицинского использования хитин гид-ролизуют концентрированной соляной кислотой при температуре 80 °С в течение 2 ч. Обесцвечивают гидролизат активированным углем, а кристаллизацию проводят при температуре 10 °С в присутствии этилового спирта в течение 16 ч с последующим отделением кристаллов глюкозамина, которые затем промывают и сушат. Полученный глюкозамин гидрохлорид для медицинского применения должен содержать не менее 99% основного вещества.

Низкомолекулярный хитозан и олигомеры. Для расширения сферы применения хитозана в медицине большое значение имеет его растворимость при нейтральных значениях pH, что может быть обеспечено снижением его молекулярной массы. Как показывает практика, молекулярная масса хитозанов, получаемых из панциря ракообразных химическими и ферментативными способами, высока и составляет до 10³ кДа. Такие хитозаны растворимы в водных растворах органических и минеральных кислот, что не всегда удобно. Для получения хитозана, растворимого при нейтральных pH, исходный хитозан подвергают гидролизу с помощью химических реагентов или ферментов.

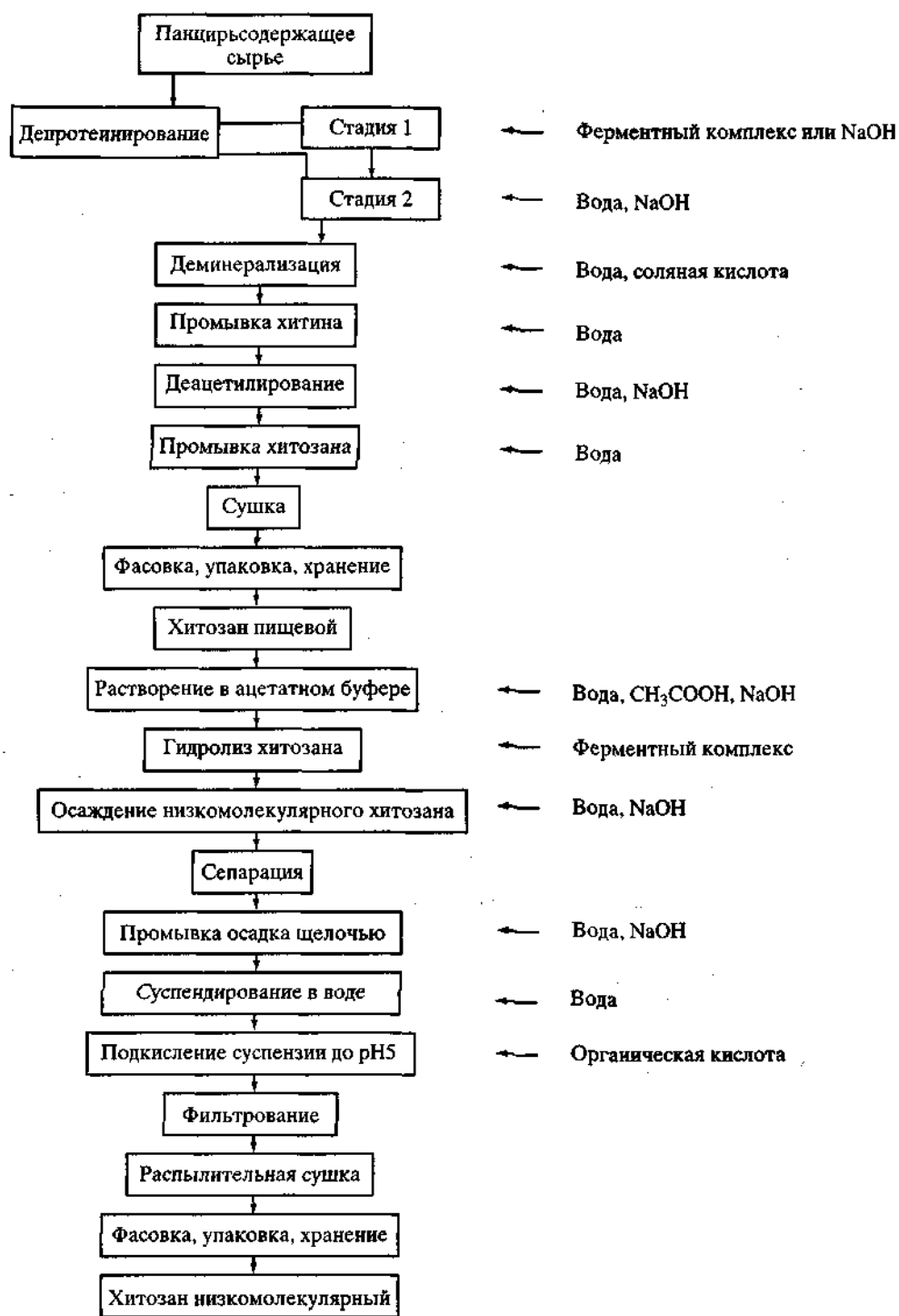


Рис. 2. Этапы производства хитина и хитозана из ПСС ракообразных

В качестве гидролизующего реагента чаще всего применяется пергидроль в виде 3-10%-ного водного раствора при умеренном нагревании до 30-50 °С [28]. Гидролиз снижает молекулярную массу хитозана и улучшает его растворимость в слабокислых водных растворах. При этом получается полидисперсный по молекулярной массе продукт, растворимый в разбавленных растворах кислот при pH > 5.

В качестве ферментных препаратов для деградации хитина и хитозана применяют комплексы ферментов различного происхождения. Это могут быть ферментные комплексы гепатопанкреаса краба или криля, а также панкреатин из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Но чаще для этой цели применяют ферментные комплексы с хитинолитической активностью микробиологического происхождения. Продуцентами хитинолитических ферментных комплексов являются *Streptomyces kurssanovii* [29], *Trichoderma reesei* [30], *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* [31] и другие микроорганизмы.

Применение ферментных препаратов для деградации хитозана позволяет получать низкомолекулярные хитозаны и олигомеры, растворимые в воде и обладающие при этом на порядок более высокой биологической активностью по сравнению с высокомолекулярными хитозанами. Такие свойства низкомолекулярных хитозанов существенно расширяют сферу их применения в качестве медицинских полимеров. Например, на основе низкомолекулярных хитозанов разработаны эффективные радиопротекторы, хиральные селекторы различных субстанций медицинского назначения, антикоагулянты с высокой гепариновой активностью.

На рис. 2 приведена технологическая схема производства хитина и хитозана из панцирьсодержащего сырья (ПСС) ракообразных

ЛИТЕРАТУРА

1. Muzzarelli R.A.A. Chitin. Oxford: Pergamon Press, 1977. 309 p.
2. Немцев СВ., Али Салем Омер // Материалы Междунар. конф. "Технология переработки гидробионтов". М.: ВНИРО, 1994. С. 125-127.
3. Феофилова Е.П., Терешина В.М., Менорская С.А. // Микробиология, 1995. Т. 64. № 1. С. 26-30.
4. Немцев СВ., Зуева О.Ю., Хисматуллин Р.Г. и др. // Пчеловодство, 2001. № 5. С. 50-51.
5. Эрнст Л.К., Злочевский Ф.И., Ерохин В.А., Клецко Н.Г. // Аграрная Россия, 2000. № 5. С. 51-57.
6. Быков В.П. //Тез. докл. IV Всеросс. конф. "Производство и применение хитина и хитозана". М., 1995. С. 3-5.
7. Немцев СВ. // Материалы III Всесоюз. конф. "Совершенствование производства хитина и хитозана из панцирьсодержащих отходов криля и пути их использования". М.: ВНИРО, 1992. С. 7-15.
8. Hood M.A. // Abstr. First Intern. Conf. Chitin/Chitosan. Boston: 1977. P. 44-45.
9. Girard-Guille M.M., Bouligand Y. // Chitin in Nature and Technology. Ed. by Muzzarelli R.A.A., C Jenniaux, Gooday G.W. N.-Y. and L.: Plenum Press, 1986. P. 29-35.
10. Сафронова Т.М., Выговская Г.П., Щиголева Т.Д. Биохимические свойства хитинсодержащего сырья. Э.И. ЦНИИТЭИРХ. М., 1974, в. 11. С. 3-7.
11. А.с. 665683 СССР. С 08В 37/08.
12. Бржески М.М. // Материалы II Междунар. конф. по хитину и хитозану. Саппоро, Япония, 1982. Пер. с англ. KE-57232 Киев: Всесоюзный центр переводов, 1983. 15 с.
13. Волкова Н.И., Орлова Т.А. //Тез I Всесоюз. науч.-техн. конф. по производству и использованию хитина и хитозана из панциря криля и других ракообразных. Владивосток: Даль-рыбвтуз, 1983. С. 19-22.
14. Пат. 4199496 США. Пер. с англ. KE-49589. Киев: Всесоюзный центр переводов, 1984. 20 с.
15. Пат. 3862122 США. Пер. с англ. KE-49584. Киев: Всесоюзный центр переводов, 1984. 25 с.
16. Роль Л.Н., Ярочкин А.П., Ерошкина М.Я. и др. //Тез. докл. I Всесоюз. науч.-техн. конф. по производству и использованию хитина и хитозана из панциря криля и других ракообразных. Владивосток: Даль-рыбвтуз, 1983. С. 40-42.
17. Леваньков СВ., Купина Н.М., Блинов Ю.Г. // Материалы V конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. С. 44-45.
18. Симахара К., Окоути К., Икеда М. Новый метод выделения хитина ракообразных с использованием протеолитической бактерии *Pseudomonas maltophilia* / Пер. с англ. KE-57231. Киев: Всесоюзный центр переводов, 1984. 15 с.
19. Розенталь А.Д. Биотехнологические основы переработки панциря антарктического криля // Автореф. дис. канд. тех. наук. Л.: Ленинградский технологический институт им. Ленсовета, 1988. 20 с.
20. А.с. 1022463 СССР. А 23 J 1/04.
21. Пат. 2000066 РФ. А 23 L 1/33.
22. А.с. 1587678 СССР. А 23 J 1/04.
23. Пат. 45-13599. Япония. Пер. с англ. KE-57017. Киев: Всесоюзный центр переводов, 1984. 15 с.
24. Takeda M., Tamida T. // Suisan Daigaku Kenkyu Hokoku, 1969. P. 143-150.
25. А.с. 592678 СССР. С 08 В 37/08.
26. А.с. 1363831 СССР. С 08 В 37/08.
27. Быкова В.М., Кривошеина Л.И., Глазунов О.И. и др. // Материалы V конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. С. 215-217.
28. Немцев СВ., Ильина А.В., Шинкарев С.М. и др. // Биотехнология, 2001. № 6. С. 37-42.
29. Пат. 2073016 РФ. С 08 В 37/08.
30. Ильина А.В., Ткачева Ю.В., Варламов В.П. // Прикл. биохим. и микробиол., 2002. Т. 38. №2. С. 132-135.
31. Ильина А.В., Варламов В.П., Мелентьев А.П. // Там же, 2001. Т. 37. № 2. С. 160-163.

ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА ПОЛУЧЕНИЯ ХИТИНА ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМ СПОСОБОМ

Г.В. Маслова

Гипрорыбфлот, Санкт-Петербург,
maslova36@grf.spb.ru

Уникальные свойства биополимеров - хитина и его производных (высокая сорбционная способность, биосовместимость, биodeградируемость, нетоксичность, бактерицидность и др.), - и неисчерпаемые запасы сырья (панцири морских и пресноводных ракообразных, грибы, покровы насекомых) обуславливают все возрастающий интерес к их производству и практическому применению.

Известно, что в хитинсодержащем сырье (ХСС) хитин связан с белками и минеральными веществами и получение его основано на последовательном выделении белковых и минеральных компонентов, переводе их в растворимое состояние с последующим удалением растворов. Для получения хитина, отвечающего требованию Международного стандарта, необходима достаточно полная его очистка от белковых и минеральных составляющих.

Наиболее распространенными способами получения хитина являются химический, основанный на использовании кислот и щелочей, и ферментативный - с использованием протеолитических бактерий. Однако оба эти способа имеют ряд недостатков. Так, обработка ХСС в агрессивных средах (кислотах и щелочах при высоких температурах и продолжительном их воздействии) в совокупности приводит к ухудшению качества готового продукта - деградации хитина, снижению вязкости его растворов. Кроме того, технология требует повышенных мер предосторожности при хранении и работе с концентрированными кислотами и щелочами. Выделившийся при этом белок подвергается чрезмерному гидролизу, расщеплению аминокислот, приводит к образованию токсичных веществ, что ограничивает его применение для пищевых и кормовых целей.

Ферментативный способ более мягкий (режим обработки) позволяет в большей степени сохранить функциональные свойства хитина и белка по сравнению с кислотно-щелочным. Однако методы с применением ферментов и протеолитических бактерий требуют больших затрат времени, дорогостоящих препаратов, тщательной работы по культивированию штаммов бактерий.

Масштабное производство хитина сдерживает отсутствие безотходных, простых, экономически эффективных и экологически безопасных технологий, а также серийность выпускаемого оборудования. Однако расширение направлений практического использования хитина и его производных в последние годы предопределяет поиск нетрадиционных способов получения этих биополимеров. Актуальной проблемой становится разработка технологий переработки хитинсодержащих объектов, обеспечивающих максимальное использование всех полезных компонентов обрабатываемого сырья, более мягкие условия осуществления технологических процессов, получение конечных продуктов с заданными физико-химическими характеристиками и функциональными свойствами, снижение экологической нагрузки на окружающую среду.

В этом отношении заслуживает внимания использование для получения хитина электрохимически активированных водных сред. Явление электрохимиче-

ской активации воды и водных растворов было открыто В.М. Бахиром в конце 1970-х годов и, несмотря на отсутствие до настоящего времени глубоких теоретических представлений о сущности происходящих процессов, нашло широкое применение в различных технологиях многих отраслей народного хозяйства. Благодаря изменению кислотно-основных, окислительно-восстановительных, каталитических свойств воды и разбавленных водных растворов минеральных солей в результате электрохимической активации создается возможность использования их вместо традиционных химических реагентов - кислот, щелочей, антиоксидантов, консервантов и т.п. с целью упрощения производства, экономии времени, сырья, вспомогательных материалов, повышения качества целевых продуктов.

Электрохимическая активация выгодно отличается от других методов активации (магнитное поле, ультразвук, электрогидравлический удар, облучение) более широким диапазоном изменений физико-химических параметров воды и водных растворов, относительно устойчивой воспроизводимостью результатов и сравнительно длительным временем существования метастабильного состояния активированной среды.

Феномен электрохимической активации в 1985 г. был признан ВАК СССР в качестве нового класса физико-химических явлений и как новое научно-техническое направление поддерживается правительством РФ, одобрено Миннауки, Минздрава, Минэкономики, Минтруда. Оно рекомендовано к использованию при разработке отраслевых и региональных программ при решении вопросов переработки сельскохозяйственного сырья, экологической безопасности, охраны здоровья населения.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ

В основе электрохимической активации лежит использование электрического тока при обработке водных сред в диафрагменных электролизерах, в которых происходит прямое превращение электрической энергии в энергию химических реакций.

Электролиз воды, изучаемый в науке на протяжении более двух столетий, подробно описан в специальной литературе и хорошо изучен с точки зрения получения конечных продуктов - водорода и кислорода. Образующаяся же при этом электролизная жидкость, являясь побочным продуктом реакций, до недавнего времени мало интересовала исследователей. И только в последние десятилетия было обнаружено, что электрохимические процессы при электролизе приводят к активации воды, изменяя ее характеристики и биологические свойства [3, 4].

Для электролиза необходима система, состоящая из следующих элементов: раствора электролита - проводника второго рода, в котором вещества диссоциированы на ионы; электродов - проводников первого рода, погруженных в раствор электролита; разделительной перегородки (диафрагмы или мембраны), образующей анодную и катодную камеры; внешнего источника тока; токопроводов - металлических проводников первого рода, соединяющих электроды с источником тока. В качестве раствора электролита используются вода или слабоминерализованные водные растворы, которые в результате воздействия электрического тока переходят в метастабильное состояние, характеризующееся аномальными самопроизвольно изменяющимися (релаксирующими) физико-химическими параметрами и свойствами.

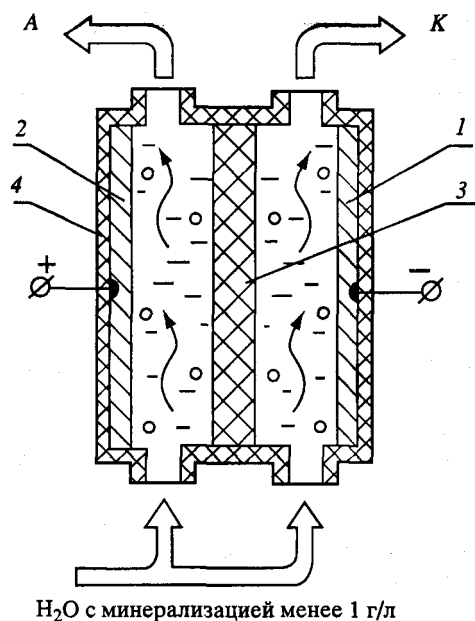


Рис. 1. Обработка питьевой воды в диафрагменном электрохимическом реакторе [6]

1 – катод; 2 – анод; 3 – диафрагма; 4 – корпус;
K – католит; A – анолит

Растворы, полученные в результате воздействия на них постоянного электрического тока, названы активированными, а технология их получения – электрохимической активацией [4, 5].

Параметры и свойства водных растворов, подвергнутых воздействию электрического тока, определяются составом и содержанием минеральных солей, видом и режимом электрохимического воздействия и зависят от конструктивных особенностей электролизеров. Степень предсказуемости результатов возрастает с увеличением минерализации водных сред. Полностью прогнозируемые и воспроизводимые результаты могут быть получены при содержании минеральных солей в количестве 1,5-5,0 г/л. На рис. 1 представлена схема процесса на примере обработки питьевой воды в диафрагменном электролизере.

При пропускании постоянного электрического тока через растворы электролита в результате присоединения электронов у катода и отдачи их у

анода происходит ряд электрохимических реакций, в результате которых образуются новые вещества, изменяются структура воды как растворителя и вся система межмолекулярных взаимодействий.

Основные процессы, происходящие в электролизерах, в упрощенной форме могут быть представлены следующим образом: окисление воды на аноде: $2\text{H}_2\text{O} - 4e \rightarrow 4\text{H}^+ + \text{O}_2$; восстановление воды на катоде: $2\text{H}_2\text{O} + 2e \rightarrow \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$; образование в анодной камере таких высокоактивных окислителей, как Cl_2 , O , ClO_2 , ClO^\cdot , HClO , Cl , O_3 , H_2O_2 , OH^\cdot ; образование в катодной камере таких высокоактивных восстановителей, как OH^- , H_2O_2 , HO_2^\cdot , O_2^\cdot , H_2 .

При катодной электрохимической обработке раствор электролита приобретает щелочную реакцию за счет превращения в нем солей в гидроксиды, окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) резко снижается, уменьшаются поверхностное натяжение и электропроводность, возрастают концентрации водорода и свободных гидроксильных групп, изменяется структура не только гидратных оболочек ионов, но и всего свободного объема растворителя (воды).

При анодной электрохимической обработке кислотность раствора электролита увеличивается, а ОВП возрастает за счет образования серной, соляной, хлорноватистой кислот, а также пероксида водорода, кислородсодержащих соединений хлора, пероксосульфатов, пероксокарбонатов и других подобных соединений; уменьшается поверхностное натяжение, увеличивается электропроводность, снижается концентрация водорода, повышается содержание растворенных хлора и кислорода, изменяется также структура воды.

Метод электрохимической обработки водных сред позволяет получить относительно долгоживущие метастабильные состояния воды. Это относится в

первую очередь к величинам водородного показателя, ОВП, поверхностного натяжения, электропроводности, диэлектрической проницаемости и других параметров. Причем водородный показатель pH, являющийся количественным выражением кислотности и щелочности, и ОВП, отражающий активность электронов в растворе, являются доминантными характеристиками электрохимической активации. Изменение кислотно-щелочного и окислительно-восстановительного равновесия воды и водных растворов существенно влияет на их биологическую активность.

При электролизе воды с применением разделительной диафрагмы в межэлектродных пространствах образуются две фракции - катодная (католит) и анодная (анолит), обладающие противоположными свойствами. В анодной фракции преобладают окисленные формы, катодная проявляет себя как восстановитель. Появление восстановительных свойств католитной воды происходит за счет образования гидратированных электронов и атомарного водорода в прикатодном слое жидкости при протекании основного электродного процесса - разряда молекул воды на катоде. При анодных процессах в результате электролиза воды на аноде происходит выделение кислорода. Католит и анолит при электрохимическом воздействии претерпевают структурные изменения, проявляя электронодонорные (католит) и электроноакцепторные (анолит) свойства. Усиление окислительной способности анодной фракции, сопровождаемое понижением активности электронов в растворе и увеличением ОВП объясняет применяемые на практике бактериостатические и бактерицидные эффекты анолита, тем более выраженные, чем выше значение ОВП. Увеличение активности электронов в катодной фракции определяет снижение ОВП до отрицательных величин и указывает на преобладание восстановительных функций. Эти свойства католит приобретает благодаря присутствию атомарного водорода и сольватированных электронов - активных радикалов-восстановителей, что делает катодную фракцию неспецифической антиоксидантной системой, являющейся универсальным ингибитором свободнорадикальных окислительных реакций.

Важную роль в процессе активации играет образование свободных радикалов - особо активных реакционноспособных частиц, легко вступающих в разнообразные химические реакции.

Образующиеся анолит и католит близки по физико-химическим характеристикам (pH и ОВП) крепким неактивированным растворам кислот и щелочей. Однако диапазон колебаний pH и особенно ОВП электрохимически активированных сред значительно шире, чем в растворах, не подвергшихся электрохимическому воздействию. Например, для химических реагентов показатели pH и ОВП имеют следующие значения: концентрированная серная кислота pH0,3 и ОВП = 680 мВ; насыщенный раствор KOH pH12,3 и ОВП = -60 мВ; насыщенный раствор хлорной извести $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ pH11,5 и ОВП = 570 мВ.

В электрохимически активированных растворах различной степени минерализации pH и ОВП имеют следующие значения: для анолита pH0-1,0 и ОВП = 1000-1280 мВ; для католита pH 11,5-12,5 ОВП в диапазоне - 750-950 мВ.

В анолите pH снижен, а ОВП увеличен до крайних положительных (окислительных) значений, а в католите pH увеличен, а ОВП уменьшен до крайних отрицательных (восстановительных) значений. Получить такие соединения растворением химических реагентов в воде невозможно, а такие сочетания pH и ОВП не могут быть смоделированы в обычных химических растворах. Они образуются только в условиях электрохимического синтеза. Следует отметить,

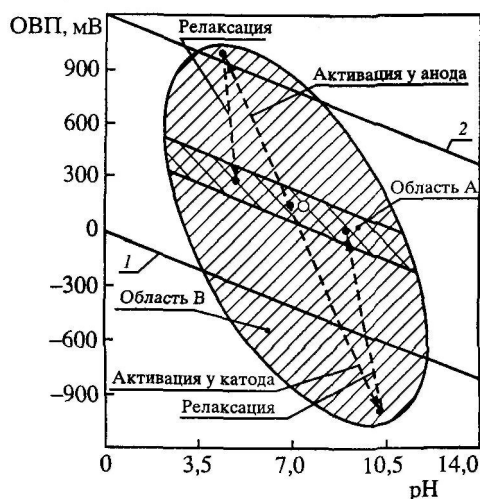


Рис. 2. Соотношение рН и ОВП питьевой воды при химическом (область А) и электрохимическом (область В) регулировании ее кислотно-основных и окислительно-восстановительных свойств [6]

Нижняя (1) и верхняя (2) границы термодинамической устойчивости воды

что анолит и католит с характеристиками рН, тождественными таковым для крепких кислот и щелочей, не проявляют агрессивности к тканям человека - не вызывают раздражения и ожогов.

Как видно из рис. 2, где показано изменение параметров рН и ОВП в процессе электрохимической активации воды, значения рН и ОВП католита и анолита выходят как за пределы химического регулирования (область А), так и за пределы термодинамической устойчивости воды (область В). В период релаксации происходит постепенный переход системы из неравновесного состояния, вызванного внешним воздействием (в данном случае постоянным электрическим током) в состояние термодинамического равновесия. Отклонение новых значений рН и ОВП от исходной точки "О" определяются наличием в воде электрохимически синтезированных устойчивых соединений.

Вода, водные растворы минеральных солей являются активированными только в период существования аномальных свойств или в период их релаксации, по завершению которой аномальные признаки исчезают, и в водной среде устанавливается термодинамическое равновесие параметров рН и ОВП, характерное для обычных неактивированных растворов. Причем скорость релаксации тем больше, чем меньше минерализация раствора и чем больше начальное отклонение параметров от состояния равновесия. Термины "активированная", "активированный" используются для обозначения термодинамически и химически неравновесного состояния воды (раствора) и действуют только в период релаксации их параметров.

Суммируя изложенное, можно выделить основные факторы, ответственные за свойства электрохимически активированных сред, благодаря которым они эффективно используются в различных технологических процессах [3-6]. Такими факторами прежде всего являются: электрохимически синтезированные щелочи в катодной и кислоты в анодной камерах, длительное время сохраняющие высокие значения рН католита до 12,5 и низкие анолита до 1,0; суперактивные метастабильные соединения с высокой окислительной (в анолите) и восстановительной (в католите) способностью, значительно усиливающие проявление кислотных и окислительных свойств анолита, щелочных и восстановительных свойств католита и благодаря этому выполняющие роль катализаторов, инициаторов и реагентов в разнообразных химических реакциях; образующиеся в процессе электролиза микропузырьки электролизных газов, представляющих электрически и химически активный компонент электрохимически активированных растворов; метастабильные изменения структуры воды и водных растворов, возникающие в двойном электрическом слое у поверхности электродов и проявляющие в процессе электрохимического катодного воздействия

электронодонорные, а в процессе анодного воздействия электроноакцепторные свойства. Последний фактор оказывает значительное влияние на физико-химические и биологические процессы, обуславливая за счет разорванных под влиянием электрического поля водородных связей повышенную способность активированных растворов проникать в межмолекулярные пространства веществ, в том числе и через биологические мембраны, увеличивать гидратные оболочки вокруг ионов и молекул, повышать растворимость труднорастворимых соединений, усиливать экстракционную активность растворов.

Анализ теоретических и экспериментальных исследований процесса активации, накопленного опыта практического применения активированных сред предопределил проведение работ по использованию электрохимического способа для выделения хитина из ХСС.

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ХИТИНА ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМ СПОСОБОМ

Направленное изменение физико-химических параметров биологических свойств водных низкоконцентрированных растворов минеральных солей посредством электрохимической активации, приводящее к появлению кислой и щелочной сред, бактерицидного и антиоксидантного эффекта, изменению окислительно-восстановительных и каталитических свойств, обеспечивающих возможность регулирования (стимуляции или замедления) биоэнергетических процессов, было использовано для получения хитина.

Альтернативно кислотно-щелочному способу в институте Гипрорыбфлот (г. Санкт-Петербург) была разработана новая технология выделения хитина из ХСС, в основе которой лежит замена традиционно используемых для этих целей химических реагентов (кислот и щелочей) на электрохимически активированные растворы [7-10]. При таком способе получения хитина стадию депротенинирования проводили в катодной камере, а стадию деминерализации - в анодной камере электролизера.

Технологический процесс получения хитина (рис. 3) включает в себя следующие основные операции: подготовку сырья (мойку, размораживание, замачивание, измельчение и т.п.), вспомогательных материалов, приготовление раствора электролита; получение суспензии при смешении измельченного сырья с раствором электролита; обработку суспензии в катодных и анодных камерах диафрагменного электролизера; выдерживание смеси в баках-накопителях или нагрев и термостатирование в реакторах, разделение смесей центрифугированием или фильтрованием.

Сырьем, на котором была апробирована новая технология получения хитина, служили панцири краба, креветки, криля, пресноводный рачок гаммарус, карапакс и хитиновый покров abdomena речного рака. В качестве электролита использованы низкоконцентрированные растворы неорганических солей NaCl или Na₂SO₄. Свойства полученного хитина оценивали общепринятыми методами, определяя содержание общего азота, минерального остатка после обеззоливания, степень деацетилирования, степень поляризации, растворимость, молекулярную массу. Проведены исследования по определению влияния pH, ОВП параметров электрического тока, технологических параметров (гидромодуль, кратность операций и т.п.) на экстрагирующую и гидролизующую способности растворов электролита. Установлены оптимальные значения параметров, обеспечивающих максимальную степень извлечения белка и минеральных веществ при минимальном уровне деструкции получаемых продуктов.

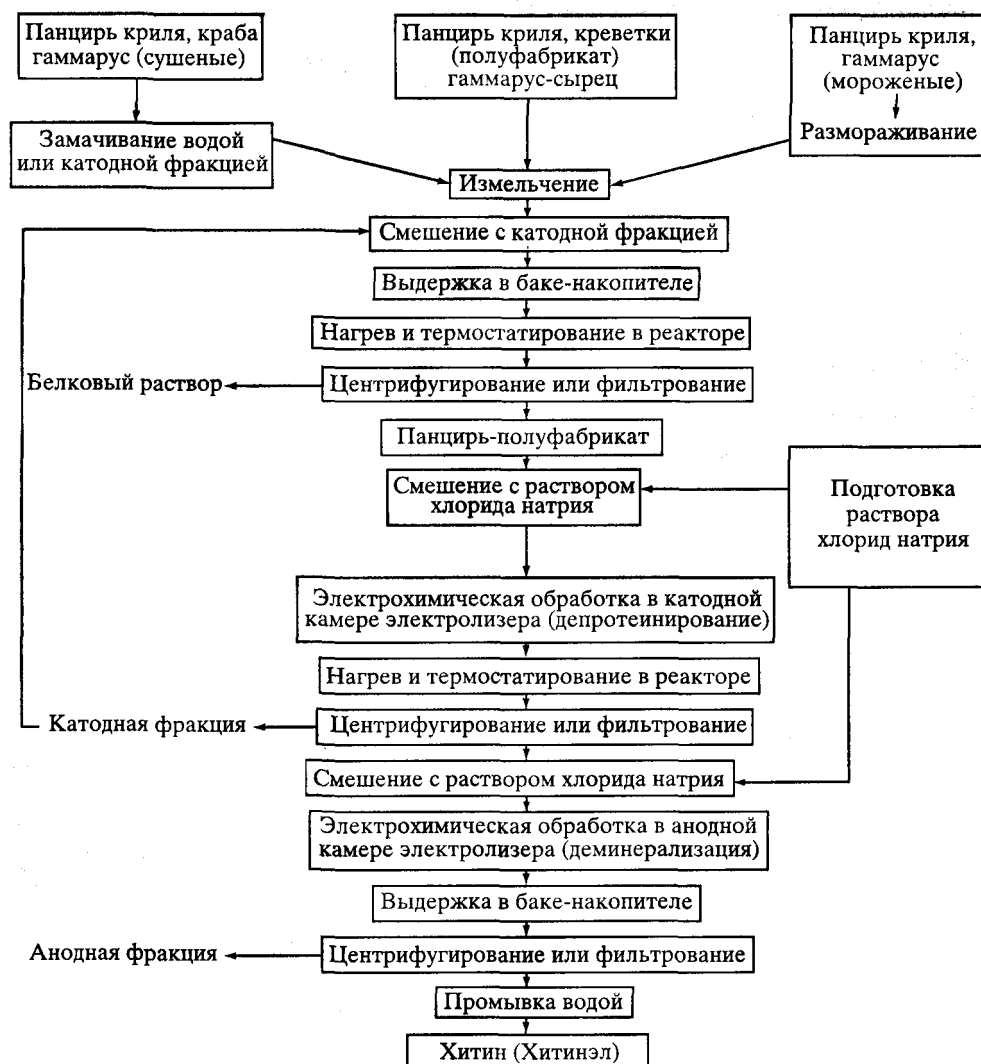


Рис. 3. Технологический процесс получения хитина электрохимическим способом

Согласно технологии панцирьсодержащее сырье (ППС) предварительно замачивают водой или катодной фракцией раствора электролита при соотношении 1:1. Мороженое сырье - гаммарус, панцирь криля дефростируют до температуры -3 ± 1 °С. Затем замоченное, дефростированное или свежее сырье (свежий гаммарус, полуфабрикаты панциря криля, креветки) диспергируют на измельчителе с диаметром отверстий решетки 3-5 мм. Диспергированное сырье смешивают в определенном соотношении с катодной фракцией, полученной после депротеинирования в электролизере предыдущей партии, выдерживают в баке-накопителе, нагревают и термостатируют в реакторе при температуре 85 ± 5 °С при постоянном перемешивании. После термостатирования смесь разделяют на фильтре или с помощью центрифуги на белковый гидролизат и панцирь-полуфабрикат. Последний смешивают с раствором электролита (например, 1 %-ным раствором NaCl) в соотношении 1 : 20 и направляют в катодную

Таблица 1. Характеристика химического состава ПСС

Вид сырья	Содержание влаги, %	Содержание, % от сухого вещества			
		общего азота	липидов	минеральных веществ	хитина
Панцирь краба	9,7	5,9	0,9	33,8	32,4
креветки	9,8	6,7	13,9	24,8	9,7
речного рака (карапакс и хитиновый покров абдомена)	8,0	5,8	–	29,0	–
Гаммарус сушеный	10,0	9,1	7,7	26,1	6,6

Таблица 2. Физико-химические свойства хитина, полученного электрохимическим способом из различного ПСС

№ образца	ПСС	Зольность, %	$[\eta]$, дл/г	Молекулярная масса (М)	Степень полимеризации (СП)
1	Краб	2,64	5,10	66400	330
2	Креветка	0	5,20	68300	340
3	Речной рак	0	5,20	70200	350

камеру для последующего депротеинирования. Электрохимическую обработку осуществляют при $\text{pH} > 12,2$, плотности тока $300\text{--}450 \text{ А/м}^2$ при постоянном перемешивании. После обработки в катодной камере смесь непродолжительное время выдерживают в реакторе при температуре $85 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ до полного растворения белка, затем направляют на фильтр или центрифугу, где разделяют ее на катодную фракцию и панцирь.

Депротеинированный панцирь снова смешивают с 1 %-ным раствором хлорида натрия в соотношении не менее 1 : 25 и направляют на электрохимическую обработку в анодную камеру электролизера. Деминерализацию панциря осуществляют при $\text{pH} < 2,0$ и плотности тока $300\text{--}450 \text{ А/м}^2$ в течение 30–45 мин с последующей выдержкой в баке-накопителе при комнатной температуре.

После окончания процесса деминерализации смесь разделяют на анодную фракцию и хитин. Выделенный хитин промывают водой до нейтральных значений pH , высушивают до остаточной влажности 8–10%, расфасовывают и упаковывают.

Совместно со специалистами Института высокомолекулярных соединений РАН были проведены исследования физико-химических свойств хитина, выделенного электрохимическим способом из различного сырья (табл. 2).

Оптимальные значения электрических и технологических параметров депротеинирования и деминерализации определяются видом используемого хитинсодержащего сырья и задаваемыми свойствами получаемого хитина. Показано, что из различного ПСС может быть получен хитин с близкими физико-химическими характеристиками (см. табл. 2) и, наоборот, из одного и того же вида сырья (например гаммаруса) можно получить хитин с различными физико-химическими показателями и функциональными свойствами, регулируемой молекулярной массой от 30000 до 380000 [11, 12].

Таблица 3. Влияние условий деминерализации на молекулярную массу хитина из гаммаруса

№ образца	Концентрация раствора NaCl, %	pH анолита	$[\eta]$, дл/г	Молекулярная масса, $M \cdot 10^{-3}$
1	3,0	1,8	16,9	377,3
2*	3,0	1,8	3,2	33,8р
3	1,0	1,5	6,1	86,9
4*	1,0	1,5	3,1	32,0
5	3,0	2,0	5,2	70,2

* Образцы после обработки в электролизере выдержаны в анолите 24 ч.

Как видно из табл. 3, на характеристики хитина влияет не столько вид сырья, сколько условия его выделения (число циклов, время обработки в анодной камере, последующего выдерживания в анолите и т.п.). Таким образом, очевидна перспективность производства хитина из пресноводного ракообразного - озерного бокоплава *Gammarus pulex*, запасы которого исчисляются тысячами тонн и вылов его не сопряжен с нарушением экологического равновесия, так как гаммарус водится в мелких, не пригодных для рыборазведения и рыбного промысла водоемах. Высокое содержание панциря в гаммарусе (25—30%) дает основание считать этот вид ракообразных одним из перспективных источников для получения хитина и хитозана. При использовании гаммаруса не требуется больших затрат на его добычу и транспортировку, так как он водится во внутренних водоемах.

Еще одно из преимуществ использования пресноводного рачка при производстве хитина - малая толщина панциря, что облегчает процессы диспергирования, депротеинирования и деминерализации и обеспечивает получение биополимеров требуемой степени очистки в более мягких условиях, за более короткое время, чем при переработке панцирей краба, креветки, криля и других морских ракообразных. Хитин и хитозан, полученные из гаммаруса электрохимическим способом, отличаются сравнительно небольшой молекулярной массой, обладают легкой формуемостью, что позволяет их широкое использование в косметологии, медицине, сельском хозяйстве [13, 14].

Электрохимическая технология значительно повышает рентабельность производства хитина за счет комплексной переработки сырья и возможности использования всех ценных его компонентов [15-18]. Проведение технологических процессов в анодных и катодных камерах электролизеров обеспечивает практически безотходную переработку ПСС, отходов от разделки панцирьсодержащих морских и пресноводных ракообразных с получением в одном технологическом цикле кроме хитин/хитозановых полимеров и других нутриентов - белковых веществ, липидов, минерализованного остатка. Аппаратурная схема комплексной переработки хитинсодержащего сырья электрохимическим способом представлена на рис. 4.

Комплексная переработка, основанная на способности растворов электролитов в катодной и анодной камерах электролизеров одновременно воздействовать на погруженное в них сырье активными ионами H^+ и OH^- , свободными радикалами, ОВП, а также потоком заряженных частиц и самим электрическим полем, обеспечивает достаточно полное выделение и получение целевых продуктов высокой степени очистки [19-23]. Электрохимический способ переработки ХСС позволяет достичь более глубокой степени депротеинирования при более низких концентрациях OH^- ионов, чем при традиционном щелочном гидролизе.

Исследование химизма процессов электрохимической экстракции и гидролиза белковых веществ показало, что экстрагирующее действие электро-

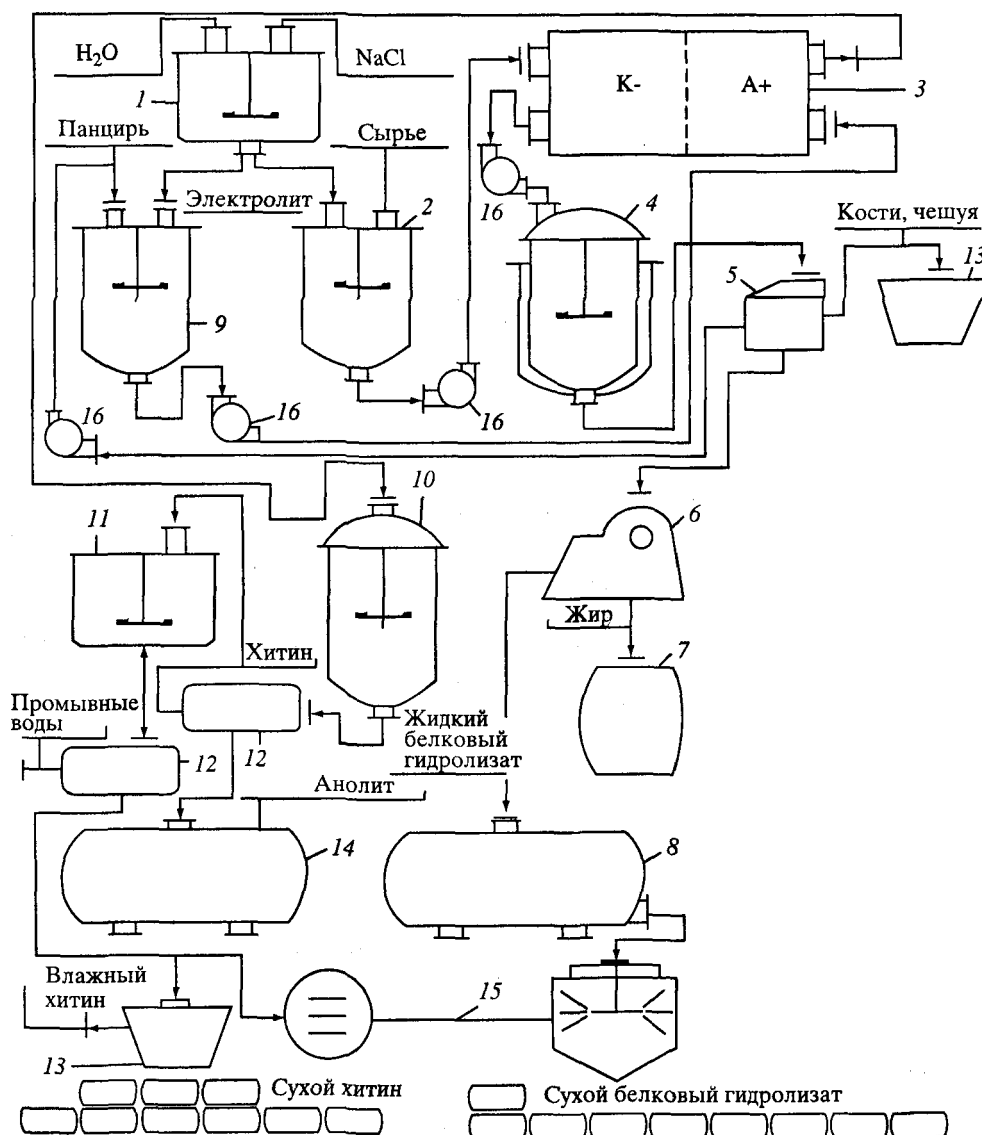


Рис. 4. Аппаратурная схема комплексной переработки ХСС электрохимическим способом
 1 - емкость для приготовления раствора электролита; 2- емкость для приготовления суспензии измельченного сырья с раствором электролита; 3 - электролизер; 4 - реактор для нагрева и выдержки суспензии после катодной обработки; 5 - центрифуга; 6 - сепаратор; 7 - сборник жира; 8 - сборник жидкого белкового гидролизата; 9 - аппарат для приготовления смеси депротеинированного панциря с раствором электролита, 10 - реактор для выдержки смеси после анодной обработки; 11 - аппарат для промывки хитина; 12 - фильтры; 13 - сборники костей, чешуи, влажного хитина; 14 - сборник анолита; 15 - сушилки; 16 - насосы

химически активированных растворов основано на способности восстановителей, образующихся в процессе электролиза (H , H_2 и др.), взаимодействовать с белками, вызывая разрыв дисульфидных связей с образованием тиоловых групп. Наблюдаемое при электрохимической обработке подавление деградации по $-C-S-$ связям, ответственной за образование токсичных побочных

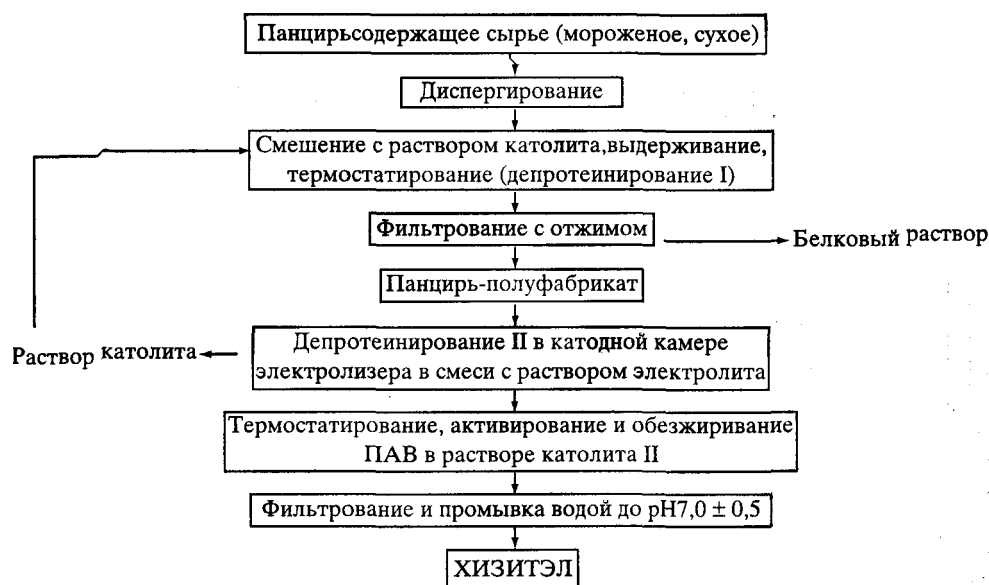


Рис. 5. Технология получения хизитэла

ных продуктов, обеспечивает получение белковых гидролизатов более высокого качества [24].

Процессы диспергирования и эмульгирования сырья с раствором электролита, проводимые перед электрохимической обработкой, также способствуют максимальной степени извлечения белка и минеральных веществ. Использо-

вание в качестве электролита растворов поваренной соли, сульфата натрия облегчает и ускоряет протекание электрохимических процессов, позволяет повысить эффективность экстракции и осаждения белковых веществ.

Образующиеся при электролизе в анодной камере ионы ClO^- , H_2O_2 , газообразный Cl_2 оказывают обесцвечивающее и антимикробное действие на получаемые продукты. Поэтому дополнительного отбеливания, проводимого при кислотно-щелочной и ферментативной технологиях с помощью этанола, гипохлорита натрия, перекиси водорода и других реагентов при электрохимическом способе получения хитина не требуется.

Наличие щелочных и антиоксидантных свойств у католита позволяет получить за счет нейтрализации свободных жирных кислот очищенные (рафинированные) липиды, что позволяет использовать при производстве хитина даже несколько окисленное и задержанное сырье.

Свойства получаемых продуктов могут варьироваться в широком диапазоне так как технологический процесс легко контролируем и управляем. Продолжительность отдельных операций, температурные режимы, pH, концентрация раствора электролита, гидромодуль (соотношение обрабатываемого сырья и раствора электролита), другие технологические параметры могут регулироваться в зависимости от вида и состояния обрабатываемых продуктов, диктуемых направлением их дальнейшего использования.

На базе электрохимического способа разработана технология другого хитинсодержащего продукта - минерализованного хитина, получившего название "хизитэл" [25]. Данный продукт получен по упрощенной технологической схеме включающей две стадии депротеинирования, активирование и обезжирива-

ние суспензии обработкой ПАВ и не предусматривающий операцию деминерализации (рис. 5).

Полученный по данной технологии хитин представляет собой продукт с содержанием минерального остатка после прокаливании 25-27% и остаточным содержанием белка - 0,25%. Обезжиривание хитизата позволило увеличить удельную поверхность с 1,8 м²/г до 11,0 м²/г, что важно при его использовании в качестве сорбента и носителя для иммобилизации бактерий.

ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ХИТИНА И КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ХСС ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМ СПОСОБОМ

Многочисленными экспериментальными исследованиями было выявлено, что для получения хитина важно не только использование электрохимически активированных сред, которые могли бы быть созданы, например, с помощью серийно выпускаемых установок типа СТЭЛ, "Изумруд", "Редокс" и др., но и проведение технологических процессов непосредственно в анодных и катодных камерах электролизеров. Установлено, что только одновременное воздействие всех факторов электрохимической активации (рН, редокс-потенциала, суперактивных соединений, микропузырьков электролизных газов, потока заряженных частиц, электрического поля и др.) при оптимальных постоянных (нерелаксирующих) параметрах обеспечивает максимальный выход и сохранение высоких функциональных свойств получаемых продуктов.

Процессы экстракции и гидролиза белковых, веществ непосредственно в катодных и деминерализации в анодных камерах электролизеров выполнены авторами [7-10] впервые, и установок промышленного масштаба для этих целей в отечественной и зарубежной практике не существует. Поэтому была разработана и изготовлена специализированная установка модульного типа оригинальной конструкции, которая, как и технология получения хитина, белковых гидролизатов, липидов электрохимическим способом, отличается новизной и защищены авторским свидетельством и патентами Российской Федерации [26-27].

Модульная установка включает в себя два диафрагменных электролизера с плоскопараллельными электродами, источник питания, пульт управления, а также серийно выпускаемое оборудование - смесители и реакторы с мешалками, насосы, фильтр, объединенные в один блок [28-30]. Учитывая высокие окислительные свойства анодной фракции и восстановительной катодной, особое внимание при создании установки было уделено выбору материала электродов, разделительной перегородки, корпуса электролизеров и соединительных трубопроводов [31]. В созданной установке корпус электролизеров выполнен из листового полипропилена, катоды изготовлены из нержавеющей стали Х18Н9Т, аноды - из платинированного титана. В качестве разделительной перегородки вместо широко используемых на практике пористых диафрагм (брезентовые, угольные) использована мембрана из ионоселективного полимера. Замена диафрагмы на ионообменную мембрану создает ряд технологических преимуществ: катодные и анодные пространства могут существенно отличаться по ионному составу, так как мембрана проницаема для катионов и непроницаема для анионов, чего практически невозможно достичь при использовании диафрагм; исключается проникновение диспергированных веществ по обе стороны мембраны, что снижает потери продукта и его загрязнение.

Кроме того, мембрана химически инертна, что позволяет использовать ее в контакте с пищевыми продуктами, химически стойка к концентрированным кислотам и щелочам, термически устойчива, механически прочна и долговечна,

обладает низким электросопротивлением, легко поддается санитарной обработке, не склонна к биопоражению.

Использование ионообменной, катионоселективной мембраны позволяет достигать крайних значений pH за более короткое по сравнению с диафрагмами время и проводить работу на интенсивных режимах, т.е. осуществлять процесс более быстро и надежно.

Конструктивно электролизеры изготовлены так, чтобы можно было легко осуществлять замену электродов и мембран, а также варьировать расстояниями между электродами, увеличивая или уменьшая катодные и анодные пространства. Депротеинирование в катодных и деминерализация в анодных камерах происходит одновременно в режиме противотока. Продолжительность отдельных операций, температура, параметры электрического тока (сила тока, напряжение) могут регулироваться в широких пределах соответствующими контрольно-измерительными приборами, расходомером, регулирующим и исполнительными органами подачи суспензии в электролизеры. Все системы управления выведены на отдельный щит.

Определены производительность модуля, его технические и технико-экономические характеристики. Решены вопросы утилизации газообразных выбросов и сточных вод, для чего предусмотрены использование скруббера, приточно-вытяжной вентиляции, нейтрализация стоков смешением в баке-накопителе щелочных и кислых отработанных растворов.

Габариты модуля установки: 4 х 2,2 х 2,5 м, занимаемая площадь - 20 м², расход электроэнергии (220/380 В, 50 Гц) - 20 кВт/ч, производственная мощность - 1,5 т хитина в год.

Эксплуатация установки показала стабильную работу всех узлов и аппаратов, обеспечивающих достижение оптимальных параметров в соответствии с разработанными: технологической инструкцией, технологическим регламентом, инструкцией по эксплуатации установки.

Созданная установка позволяет сократить число единиц оборудования и снизить временные затраты на технологические процессы за счет проведения депротеинирования и деминерализации, отбеливания в одном аппарате, повысить износоустойчивость технологического оборудования и снизить фактор экологического риска вследствие исключения использования агрессивных сред - кислот и щелочей, уменьшить расход воды и других вспомогательных материалов, оперативно изменять производительность путем компоновки участка из различного числа модулей в зависимости от наличия сырья и требуемого количества готового продукта.

Малые габариты установки позволяют осуществить ее изготовление в контейнерном варианте, а это, в свою очередь, производить хитин в любом регионе и особенно в местах переработки ракообразных.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИТИНА И ПРОДУКТОВ КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ХСС

Хитин, полученный электрохимическим способом, представляет собой высокомолекулярный биополимер в виде хлопьев размером до 2 мм или порошка белого цвета без вкуса и запаха с содержанием: влаги 8-10%, золы 0,3-0,5%, общего азота 6,2-6,4%, основного вещества 85-90%.

На хитин, очищенный электрохимическим способом и получивший коммерческое название "Хитинэл" разработана и утверждена нормативная документация - технологическая инструкция по его производству и ТУ 9289-005-004

72437-2000 "Хитинэл". Имеется гигиеническое заключение Центра санитарно-эпидемиологического надзора в г. Санкт-Петербурге № 78.1.6..928П9992.12.00. от 13.12.2000 г.

Хитинэл предназначен для использования в качестве полуфабриката при производстве хитозана и других производных хитина, а также самостоятельного готового продукта в различных отраслях народного хозяйства, для которых приемлемы его физико-химические и органолептические характеристики.

Учитывая имеющиеся сложности в реализации хитин/хитозановых биополимеров отечественными отраслями промышленности и отсутствие практических рекомендаций по использованию хитина и продуктов комплексной переработки ХСС, полученных электрохимическим способом, были проведены работы по изучению возможных направлений их использования [32-37]. В частности, были проведены исследования по использованию хитина, очищенного электрохимическим способом, в медицинских целях. На базе Санкт-Петербургской академии последипломного образования под руководством проф., д.м.н. С.А. Симбирцева и д.м.н. Н.А. Белякова были произведены оценка токсических свойств хитина и исследования по использованию его в качестве биосорбента [32].

Определения сорбционных свойств хитина проведены в стендовых условиях *in vitro* и *in vivo* на мелких (мыши и крысы) животных. В качестве маркеров интенсивности поверхностной активности сорбента определяли динамику показателей концентрации среднемолекулярных фракций, олигопептидов, мочевины, ионов кальция, т.е. компонентов, способных накапливаться во внутренних средах организма при тяжелых заболеваниях и оказывать влияние на течение и исход патологии.

Определение острой и хронической токсичности хитина, очищенного электрохимическим способом, осуществлялось согласно Требованиям к доклиническому изучению общетоксического действия новых фармакологических веществ, одобренных Фармакологическим комитетом Минздрава РФ. Полученные результаты сопоставляли с результатами аналогичных экспериментов с хитином, очищенным традиционной кислотнo-щелочной обработкой. Результаты определения сорбционных свойств хитина в стендовых испытаниях *in vitro* показали, что хитин связывает на своей поверхности из поликомпонентного раствора среднемолекулярные фракции, олигопептиды, креатин, мочевины, холестерин, триглицериды. Не зафиксировано сорбции крупномолекулярных белков и ионов натрия, отмечена слабая адсорбция ионов кальция и умеренная - ионов кальция.

При добавлении сорбента к взвеси микробных тел *E. Coli*, *St. aureus*, *C. albicans* сорбция микробных клеток составляла 55-65%.

Оценка токсичности хитина *in vitro* осуществлялась в двух сериях экспериментов: потребление хитина с кормом из расчета 0,5 г/кг условной массы животного; внутрибрюшинное вшивание энтеросорбента при дозе препарата 20 г/кг условной массы животных.

Результаты наблюдения при определении острой и хронической токсичности хитина показали, что животные охотно поедали пищу и их общее состояние не нарушалось - не наблюдалось изменений в органах животных, составе артериальной крови, метаболизме почечной ткани, не менялось содержание в крови лейкоцитов и тромбоцитов, оставались в норме другие жизненно важные показатели. Не было обнаружено токсического действия и при введении хитина в брюшную полость животного в дозах, в 40 раз превышающих терапевтическую.

Исследования сорбционной способности хитина на фоне развития патологических состояний, сопровождающихся эндоксимией, выявили, что применение хити-

на уменьшает в крови содержание токсичных олигопептидов и других веществ, обладающих негативным действием на организм, снижает процент гибели животных в два раза по сравнению с контрольными особями, не получавшими биосорбента.

Анализ данных, полученных в экспериментах и клинике при пероральном применении хитина позволил сделать предположение об участии хитина в поглощении плазменных компонентов, таких как холестерин, триглицерин, мочевины, креатинин, серотонин, гистамин и других, что может иметь существенное значение в лечении ряда патологических расстройств, связанных с хроническими нарушениями деятельности соответствующих органов и систем.

Оценивая полученные результаты можно констатировать, что хитин, полученный электрохимическим способом, является биологически активным сорбентом и не обладает выраженными остротоксичными свойствами. Проведенное исследование сорбционной способности указывает на присутствие активных центров в поверхностных структурах очищенного электрохимическим путем хитина, способных извлекать из биологических растворов различные биогенные токсины. Такой хитин по основным характеристикам поглощения близок к хитину, полученному традиционным кислотно-щелочным способом. Заметим, что для использования хитина в медицине весьма

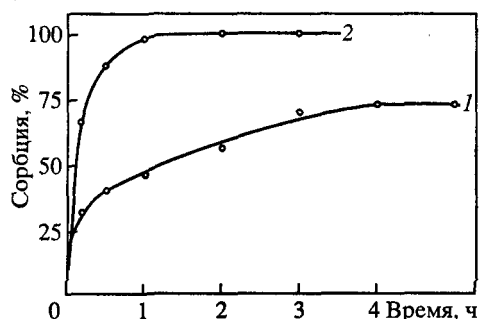


Рис. 6. Изотерма сорбции Cu^{2+} хитином (1) и хитозаном (2) гаммаруса при температуре сорбции 20°C ; pH 8,0; режим статический

важна достаточно полная его очистка от белка и остаточных количеств хлора.

На основании изложенного выше представляется перспективным использование хитина, очищенного электрохимическим способом, в качестве энтеросорбента при создании эффективных средств в лечении ряда патологических расстройств. По аналогии с активированным углем типа "Ваулен", полифепаном, энтеродезом возможными сферами применения хитина в медицине [35] являются: острые и хронические инфекционные заболевания желудочно-кишечного тракта; заболевания желудочно-кишечного тракта, в основе которых лежат расстройства кинетической и ферментативной функции кишечника; поражения гепато-билиарной системы; патологические расстройства острого и хронического характера, сопровождающиеся развитием эндотоксемии (пневмонии, послеоперационных осложнений гнойно-септического характера, острой и хронической почечной недостаточности и других); различные нарушения аллергического и обменного характера. Кроме того, хитин может быть использован в ветеринарии и животноводстве при инфекционных и неинфекционных диспепсических расстройствах у домашних животных [36].

В Институте высокомолекулярных соединений РАН проведены работы по определению сорбционных свойств хитина, очищенного электрохимическим способом, и хитозана, полученного из него, по отношению к тяжелым металлам [37] на примере извлечения ионов $\text{Cu}^{(2+)}$ из охлаждающе-смазочной эмульсии и ионов из растворов хлористого хрома. Эффективность сорбционной способности хитина и хитозана определялась в зависимости от pH-среды, концентрации ионов тяжелых металлов в исходных растворах, степени деацетилирования (СД) хитина, вида сырья, из которого получены данные полимеры.

На рис. 6 представлены результаты сорбции ионов $\text{Cu}^{(2+)}$ хитином и хитозаном гаммаруса. Оба сорбента поглощают ионы $\text{Cu}^{(2+)}$, но скорость поглощения

Таблица 4. Поглощение ионов $\text{Cu}^{(2+)}$ из охлаждающе-смазывающей жидкости хитозаном * различного происхождения

Сорбент	СД	Количество поглощенной меди (мг)				
		30 мин	60 мин	120 мин	180 мин	240 мин
Хитозан гаммаруса СД = 0,59	0,59	3,7	5,2	5,9	5,9	6,6
Хитозан креветки СД = 0,75	0,75	1,0	2,5	4,5	5,6	6,2

ими различна. Хитин извлекает медь с меньшей скоростью, и изотерма сорбции выходит на насыщение через 3 ч, извлечение при этом составляет 72%. Хитозан сорбирует медь более интенсивно: 70% ионов извлекается уже за 10 мин, а через два часа происходит практически полное поглощение имеющейся в пробе меди.

Изучена также кинетика сорбции ионов меди двумя образцами хитозана из сырья различного происхождения. В опытах использован хитозан гаммаруса, имеющий СД = 0,59 и хитозан креветки с СД = 0,75.

В табл. 4 представлены абсолютные количества сорбированной меди за различное время при концентрации ионов меди 19,7 мг в пробе.

Из представленных данных видно, то хитозан гаммаруса сорбирует ион меди с большей скоростью, чем хитозан креветки, но величина насыщения у обоих сорбентов близка друг к другу. Это различие вызвано разной морфологией образцов: хитозан гаммаруса имеет рыхлую волокнистую структуру, более доступную для ионов меди, в то время как хитозан креветки имел более плотную чешуйчатую структуру. Влияние морфологии образцов сильнее влияет на скорости сорбции, чем степень деацетилирования. Несмотря на более высокую СД хитозан креветки сорбирует меньше меди и его полная обменная емкость несколько ниже, чем для хитозана гаммаруса.

Для изучения сорбции хрома из водных растворов хлористого хрома был использован образец хитина гаммаруса, имеющий СД = 0,15. Сорбционная способность хитина гаммаруса по отношению к иону $\text{Cr}^{(3+)}$ составляла от 0,15 до 0,39 ммоль/г, что близко к сорбционной емкости хитина краба, полученного традиционным кислотнo-щелочным способом. Для изучения сорбции $\text{Cr}^{(3+)}$ хитозаном был взят образец с СД = 0,79. Выявлено, что наибольшее количество хрома (до 85%) извлекается за первый час сорбции, максимум которой достигается за 4 ч и составляет 95%, дальнейшее увеличение времени сорбции не сказывается на количестве извлеченного хрома. Аналогичная зависимость наблюдалась при сорбции $\text{Cr}^{(6+)}$ крабовым хитозаном.

Сорбция хрома и меди хитином и хитозаном, полученными электрохимическим способом, находятся на уровне сорбции хитином и хитозаном из других видов сырья (краба, криля), изготовленных по традиционной технологии [38-41], и они могут быть рекомендованы для извлечения ионов тяжелых металлов.

Следует отметить, что хитозан гаммаруса благодаря особенностям морфологии волокон и физико-химических свойств обладает более высокой сорбционной способностью, чем хитозан из других источников сырья, что следует учитывать при конкретном его использовании.

Совместно с Институтом медико-биологических проблем и Институтом питания АМН РФ проведены исследования по изучению химического состава, усвояемости, пищевой ценности и безопасности жидких белковых гидролиза-

тов и сухих белковых концентратов, полученных электрохимическим способом. Во всех образцах определялось содержание белка, общего, белкового и небелкового азота, липидов, углеводов, золы, железа, а также токсичных элементов, нитратов, нитритов, нитрозаминов, пестицидов в соответствии с Гигиеническими требованиями к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов.

Исследования биологической ценности белковых гидролизатов и концентратов, полученных электрохимическим способом, показали, что включение их в рацион кормления животных (крыс) в качестве единственного источника белка, выявили их безвредность. Установлено, что величина усвояемости рациона с включением данных белковых продуктов превышает 86%, при этом чистая усвояемость белка составляет более 90%.

На основании заключения Института питания органами Государственного Комитета санитарно-эпидемиологического надзора РФ выдан гигиенический сертификат (NI-II-111122 от 25.02.93) на белковый гидролизат пищевой, полученный электрохимическим способом.

По результатам исследований пищевой ценности белковые гидролизаты и концентраты рекомендованы к использованию в питании населения в качестве пищевых добавок.

Высокая влаго- и жиродерживающая способности позволили рекомендовать их к использованию в рецептурах фаршевых рыбных продуктов, колбас, сосисок, паштетов и т.п., а высокая жирозэмульгирующая способность делает перспективным их использование при производстве соусов, кремов, майонезов. На Мурманском рыбокомбинате были апробированы технологии получения различных продуктов с использованием белковых гидролизатов, концентратов, изолятов, полученных электрохимическим способом. Разработано четыре вида майонезов, в рецептуре которых исключены желтки куриных яиц и снижено содержание растительного масла за счет введения сухих или жидких белковых гидролизатов.

В результате использования белковых веществ, полученных электрохимическим способом, и сокращения на 30-45% расхода растительного масла возрастает биологическая и питательная ценность майонезов за счет увеличения содержания белка при снижении липидной и холестериновой составляющих. Майонезы с использованием рыбных белковых добавок отличаются улучшенным, по сравнению с традиционным, внешним видом, более плотной, однородной и стабильной консистенцией, пониженным привкусом растительного масла.

Сухой белковый гидролизат был использован также при изготовлении бульонного концентрата "Рыбацкий" выпускаемого в виде таблеток по ТУ 15-02-389-82. Отмечена его высокая технологичность - таблетки имели правильную геометрическую форму, требуемую плотность, хороший внешний вид, отличались полной растворимостью в горячей воде, бульон превосходил по запаху, вкусу и цвету бульоны из таблеток, изготовленных по традиционной технологии.

* * *

Разработаны научные и практические основы новой технологии получения хитина, базирующейся на использовании в качестве технологических сред электрохимически активированных растворов.

Электрохимическая активация как новая отрасль прикладной электрохимии позволила изменить подход к выбору и получению экстрагирующих и гид-

ролизующих реагентов и пересмотреть концепцию обеспечения экологической безопасности производства хитина.

Важными преимуществами электрохимического способа получения хитина по сравнению с традиционным являются: исключение из технологических процессов использования агрессивных химических реагентов (кислот и щелочей) и ферментов за счет осуществления стадий депротеинирования и деминерализации слабоминерализованными (разбавленными) электрохимически активированными водными растворами; максимальное извлечение белковых и минеральных компонентов за счет осуществления реакций на клеточном уровне благодаря способности активированных растворов проникать через биологические мембраны в межмолекулярные пространства веществ и тем самым повышать растворимость труднорастворимых соединений и усиливать экстракционную активность технологических растворов; возможность направленного изменения в широких пределах кислотно-щелочных, окислительно-восстановительных, каталитических свойств активированных растворов путем изменения режимов электрохимического синтеза, состава и содержания неорганических солей и получения хитина с регулируемой молекулярной массой и другими физико-химическими свойствами; обеспечение более высоких функциональных свойств получаемых продуктов за счет проведения технологических процессов в более мягких щадящих условиях: при более низких температурах, меньшей продолжительности, при более низких концентрациях ОН-ионов по сравнению с растворами NaOH и т.п. возможность осуществления технологических процессов: экстрагирование, гидролиз и осаждение белковых веществ (в случае получения белковых изолятов), деминерализация и отбеливание панциря, антимикробное и антиоксидантное воздействие на сырье и готовые продукты в одном аппарате, непосредственно анодных и катодных камерах электролизных установок; значительное сокращение единиц оборудования, повышение его износоустойчивости, уменьшение расхода воды и других вспомогательных материалов; максимальное использование всех ценных компонентов хитинсодержащего сырья путем комплексной его переработки с получением в одном технологическом цикле хитина, белковых гидролизатов, липидов, минерализованного остатка; возможность оперативного изменения производительности участка путем использования различного числа модулей установки и изготовления ее в контейнерном варианте, что создает возможность производства хитина в любом регионе, в том числе и в местах добычи и переработки ракообразных.

Полученный электрохимическим способом хитин представляет собой высокомолекулярный биополимер в виде хлопьев или порошка белого цвета без вкуса и запаха и может использоваться в качестве готового продукта или полуфабриката для получения хитозана и других его производных.

Проведенные исследования по практическому использованию хитина, очищенного электрохимическим способом, показали, что хитин обладает высокими сорбционными способностями и может использоваться в качестве сорбента тяжелых металлов и энтеросорбента при создании эффективных средств в лечении различных патологических расстройств организма человека и домашних животных.

Полученные в результате депротеинирования хитинсодержащего сырья белковые гидролизаты и изоляты обладают высокими функциональными свойствами - влаго- и жиростойкостью, жиростойкостью, эмульгирующей способностью и рекомендованы к использованию в качестве пищевой добавки в фаршевые рыбные продукты, колбасы, сосиски и т.п. или в виде основы для производства различных соусов и кремов.

На продукты, полученные электрохимическим способом, разработана и утверждена нормативная документация (ТИ, ТУ, технологические регламенты), имеются соответствующие гигиенические сертификаты и заключения.

В целом разработанная электрохимическая технология позволяет интенсифицировать, упростить, повысить экономическую эффективность и улучшить экологическую ситуацию производства хитина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Krasavtsev V.E., Degtyareva E.V. Chitin and Chitosan in Science 8-th Intern. Chitin and Chitosan Conf. (8-th JCCC) and 4-th Asia Pacific Chitin and Chitosan Symposium // (4-th APCCS) Yamaguchi, Japan, 2000. P. 321-324.
2. Красавцев В.Е. Материалы Пятой конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. -С. 35-37.
3. Бахир В.М., Курпичников П.А., Леакумович А.Г. и др. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 286. № 3. С. 663-666.
4. Бахир В.М. Электрохимическая активация. М.: ВНИИИ мед. техники, 1992. 2 ч. 657 с.
5. Прилуцкий В.И., Бахир В.М. Электрохимически активированная вода: аномальные свойства, механизм биологического действия. М.: ВНИИИМТ, 1997. 228 с.
6. Леонов Б.И. Прилуцкий В.И., Бахир В.М. Физико-химические аспекты биологического действия электрохимически активированной воды. М.: ВНИИИМТ, 1999. 224 с.
7. Маслова Г.В., Куприна Е.Э., Богерук А.К., Ежов В.Г. // Рыб. хоз-во, 1996. № 3. С. 60-61.
8. Маслова Г.В. // Научн-техн. симпоз. "Современные средства воспроизводства и использования водных биоресурсов". Тех. докл. СПб., 2000. С. 246-247.
9. Maslova G. Chitin and Chitosan inlife Science 8-th International Chitin and Chitosan Conference inlife Science 8-th Intern. Citin and Chitosan Conf. (8-th ICCS) and 4-th Asia Pacific Chitin and Chitosan Symp. (4-th APCCS), Yamaguchi, Japan, 2000. P. 325-327).
10. Маслова Г.В. Тез. док. // III Междунар. симп. "Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве, промышленности" М.: ВНИИИМТ, 2001. С. 229-232.
11. Маслова Г.В., Сподобина Л.А., Худьга Л.А., Петрова В.А. // Материалы. VI Междунар. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 2001. С. 35-38.
12. Krasavtsev V., Maslova G., Spodobina L. et al. // Abstract book. 3-rd International Symposium on Chitin Enzymology and 4-th Conference of the European Chitin Society. Italy, Ancona, 2001. P. S-85.
13. Maslova G., Krasavtsev V., Bogeruk F. // Sekond Asia-Pacific Symposium. Abstract Book "Chitin and Chitosan", Bangkok, Thailand, 1996. P. 68-71.
14. Маслова Г.В. // Материалы Междунар. науч.-техн. конф. "Пищевой белок и экология". М.: МГУПБ, 2000. С. 91-92.
15. Маслова Г.В., Куприна Е.Э., Богерук А.К., Ежов В.Т. //Тез. докл. IV Всеросс. конф. "Производство и применение хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1995. С. 74-77.
16. Maslova G., Kuprina H., Bogeruk A., Ezhov A. // I Intern. Conf. of the European Chitin Society Advances in Chitin Science. V. 1. "EUCHIS-95", Brest, France, 1995. P. 216-221.
17. Маслова Г.В., Богерук А.К., Ежов В.Г. //Мед. докл. I Междунар. симп. "Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве, промышленности". М.: ВНИИИМТ. 1997. С. 221-222.
18. Маслова Г.В. // Материалы II Междунар. симп. "Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве, промышленности". М.: ВНИИИМТ, 1999. С. 229-231.
19. А.с. 1687213 СССР. А23J 1/04.
20. А.с. 1517156 СССР. А23J 1/04.
21. Маслова Г.В. // Матер. Междунар. науч.-тех. конф. "Пищевой белок и экология". М.: МГУПБ, 2000. С. 91-92.
22. Маслова Г.В., Нееслер Л.И., Сподобина Л.А., Зайцева В.И. // Рыб. хоз-во, 1997. № 1. С. 44-45.
23. Патент 2090595. РФ. С11В 3/00.
24. Водолажская С.В. Технология получения белковых гидролизатов из гидробионтов электрохимическим способом для производства микробиологических питательных сред // Автореф. дис. ... канд. техн. наук. СПб.: СПбТИ(ТУ), 2001. 20 с.

25. *Куприна Е.Э., Водолажская С.В., Няникова Г.Г., Тимофеева К.Г.* // Материалы VI Междунар. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 2001. С. 31-34.
26. А.с. 1751888. РФ. А23Л1/33.
27. Пат. 2059390. РФ. А23Л1/33, А23Л/04.
28. *Маслова Г.В., Куприна Е.Э., Богерук А.К.* Материалы Пятой конференции "Новые перспективы в использовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999 С. 46-48.
29. *Maslova C, Kuprina E., Bogeruk A.* // EUCHIS-99, Third Intern. Conf. of the European Chitin Society, Potsdam, Germany, V. IV. 1999. P. 4-6.
30. *Maslova C, Kuprina E.* // In: "Chitin and Chitosan", Lodz: Polish Chitin Soc. 1999. P. 17-21.
31. *Яковлев С.В., Краснобородько И.Г., Погов В.М.* Технология электрохимической очистки воды. Л.: Стройиздат. 1987. 312 с.
32. *Maslova C, Krasavtsev V.* // Third ASIA-PACIFIC Chitin and Chitosan Symposium, Keelung, Taiwan, ROC, 1998. P. 443-447.
33. *Маслова Г.В.* // Тез. докл. VII Междунар. симп. "Информационно-технологическое и медицинское обеспечение защиты населения и охраны окружающей среды в чрезвычайных ситуациях". Кипр, Протарас. М.: ВНИИИМТ, 2000. С. 129-131.
34. *Беляков Н.А., Соломенников А.В.* Изучение медико-биологических свойств хитина, полученного электрохимическим способом, на мелких животных / Отчет о выполнении хозяйственных работ. Л., Гипрорыбфлот, 1989. 9 с.
35. *Беляков Н.А., Соломенников А.В.* Данные о фармакологических свойствах лечебного хитина / Научный отчет. Л., Гипрорыбфлот, 1988. 28 с.
36. *Щедрина Н.А., Никитин В.Ю., Маслова Г.В.* // Материалы Юбилейной конф. "Рыбохозяйственные исследования океана". Дальрыбвтуз, Владивосток, 1996. 88 с.
37. *Maslova G., Krasavtsev V.* // 7-th Intern. Conf. on chitin and chitosan, Lyon, France, 1997. P. 554-560.
38. *Kurita K., Sannan T., Iwakura S.* // J. Appl. Polym. Sci. 1979. V. 23. N5. P. 511-515.
39. *Muzzarelli R.A.A., Tubertini O.* // Talanta, 1969. V. 16. N 12. P. 1571-1577.
40. *Muzzarelli R.A.A., Rochetti R., Accoroni V.* // Sep. Sci. Technol. 1978. V. 13. P. 163-173.
41. *Domard A.* // Int. J. Biol. Macromol., 1987. V. 9. N2. P. 96-104.

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И АКТИВАЦИИ ХИТИНА И ХИТОЗАНА

Е.Э. Куприна, С.В. Водолажская

Гипрорыбфлот, Санкт-Петербург
svetlana@yandex.ru

Процесс получения хитина из панцирьсодержащего сырья (ПСС) заключается в удалении из последнего минеральных солей, белков, липидов, пигментов, поэтому качество хитина и хитозана зависит во многом от способа и степени удаления этих веществ, а также от условий проведения реакции деацетилирования. Требования к свойствам хитина и хитозана определяются областями их практического использования, которые весьма разнообразны. На конференциях в Таиланде (1996) и в Москве (1999) и др. обсуждалась проблема унификации свойств этих полимеров, однако не было выработано единого решения. В России, как и в других странах, нет единого стандарта, но существует деление на хитин и хитозан технический, промышленный, пищевой и медицинский.

Для упрощения идентификации образцов хитина и хитозана необходимо создать номенклатурную систему. В результате обсуждения этой проблемы [1-3] предложена следующая система [4].

1. Деление на хитин и хитозан следует проводить на основании растворимости или нерастворимости получаемого полимера в 0,1М уксусной кислоте.

2. В литературе встречается большое количество терминов и условных обозначений показателя мольного содержания фракции 2-ацетамидо-2-дезоксид-глюкозы, (степень деацетилирования, уровень деацетилирования, % деацетилирования, степень N-ацетилирования, уровень N-ацетилирования). С целью унификации и упрощения представления результатов исследований предлагается использовать символ Fa, показывающий мольное содержание фракции 2-ацетамидо-2-дезоксид-глюкозы. В тех случаях, когда необходимо представить мольное содержание фракции 2-амино-2-дезоксид-глюкозы, следует использовать символ Fd или, что более предпочтительно, 1-Fa.

3. Если значение Fa известно, оно должно быть указано в скобках после названия образца, например хитин[0,94], хитозан[0,25].

4. Если процесс деацетилирования осуществлялся в гомогенных условиях, то полученный продукт дополнительно помечается курсивной буквой "h" (homogeneous), например, хитозан[0,5h], в отличие от хитозана, полученного гетерогенным деацетилированием - хитозан[0,5]. При известном распределении двух ко-мономеров вдоль цепи применяют курсивные буквы: *r* (random), *b* (block), *a* (alterating).

5. Следует указывать различие между хитозанами, полученными прямым деацетилированием хитина и повторным N-ацетилированием хитозана (N-ацетилхитозан). Для N-ацетилхитозана значение Fa представляют в двух частях, например, N-ацетилхитозан[0,10/0,4h]. Первая цифра указывает на значение Fa исходного хитозана, вторая цифра показывает величину, на которую произошло увеличение значения Fa в результате процесса N-ацетилирования. Таким образом, N-ацетилхитозан[0,1/0,4h] представляет собой хитозан со значением Fa = 0,5, полученный в условиях гомогенного N-ацетилирования хитозана [0,1] и первоначально приготовленный в условиях гетерогенного деацетилирования.

ПОЛУЧЕНИЕ ХИТИНА

Базовым способом является химический, заключающийся в проведении стадии депротеинирования, деминерализации и депигментации с помощью химических реагентов - кислот, щелочей, перекисей и др. Широко используются биотехнологические методы, основанные на применении ферментных препаратов и протеолитических бактерий, разработаны также новые физико-химические методы получения хитина.

Упрощенная схема получения хитина приведена на рис. 1.

В зависимости от вида сырья и требуемого качества хитина, а также получаемых из него продуктов количество и последовательность операций, представленных на рис. 1, могут быть различными.

Химический способ. Условия депротеинирования (ДП) варьируются от наиболее щадящих, например, обработка 0,1М Na_2CO_3 + мыло до достаточно жестких - 5,0М NaOH, предпочтительные продолжительность процесса 4-6 ч при температуре - 100 °С. Однако наиболее распространенные условия - 1,0М NaOH, $t = 100$ °С, $\tau = 0,5-72$ ч [4]. Очевидно, что большая жесткость условий обработки должна вести к деградации цепи хитина и/или частичному деацетилированию (ДА). Кроме того, в процессе щелочной обработки белок подвергается значительной физической и химической модификации. Так, например, наблюдается изменение растворимости, гидролиз, отщепление боковых цепей аминокислотных остатков, включение новых соединений в белковые молекулы, рацемизация аминокислот, модификация и удаление небелковых групп в молекулах белка [5]. Ухудшение качества белка усложняет проблему его дальнейшего использования. Дезагрегация молекул белка приводит к неполному его выделению из раствора при изoeлектрическом осаждении. Денатурированные белки значительно труднее расщепляются ферментами, понижается их питательная ценность, могут появляться токсические свойства.

Для интенсификации процесса щелочного гидролиза белковой части панциря при более низких концентрациях щелочи применяют поверхностно-активные вещества (ПАВ). Например, в способе получения хитина из панциря криля, разработанном Гамзаде и др. [6], ДП неизмельченного панциря осуществляют в 1-5%-ном растворе NaOH с добавлением ПАВ анионного типа при комнатной температуре в течение 6-8 ч. Применение ПАВ позволяет снизить концентрацию щелочи. При этом наряду с эффективным удалением белка наблюдается дополнительное экстрагирование красящих веществ и липидов.

Последующую деминерализацию (ДМ) обычно проводят обработкой HCl при нормальной температуре для минимизации риска гидролиза хитиновой цепи. Используют широкий диапазон концентраций кислоты, температуры и продолжительности обработки - от 0,3 М HCl при нормальной тем-

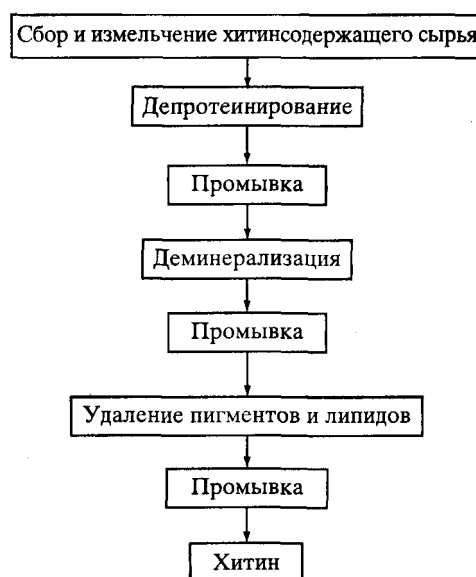
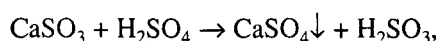
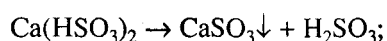


Рис. 1. Этапы процесса получения хитина

пературе в течение 16 ч до 2,0М HCl при нормальной температуре в течение 48 ч или 11,0М HCl при -20 °С в течение 4 ч [7-10]. Применение растворов кислот высокой концентрации может приводить к частичной деструкции и ДА хитина и, следовательно, к снижению вязкостных характеристик хитозана, а чем мягче условия обработки, тем более высокомолекулярный хитин может быть получен [10]. Имеются данные о том, что наличие в хитине ионов кальция повышает вязкость хитозана, что связано с увеличением термостабильности хитина [11]. Однако слишком мягкие условия могут привести к неполной ДМ.

В качестве альтернативы HCl применяют муравьиную, азотную или сернистую кислоты и др. Например, возможно использование сернистой кислоты [12], которая в присутствии избытка солей кальция образует $\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2$, легко вымываемый водой, при этом сернистая кислота может быть регенерирована в две стадии



Поэтому весь процесс эквивалентен деминерализации серной кислотой, которая значительно дешевле соляной.

Деминерализацию по методу Horowitz, Rosoman и Blumental [13] проводят 90%-ной муравьиной кислотой в течение 18 ч при комнатной температуре, а затем осушивают ДП 10%-ным гидроксидом натрия в течение 2,5 ч на паровой бане.

Для мягкой деминерализации было предложено использовать ЭДТА [14]: крупные фрагменты панциря краба *Canaser pagurus* подвергали длительному воздействию ЭДТА в течение 2-3 недель при pH9,0; измельченный панцирь с размером частиц 1-10 мм обрабатывали быстрее, в некоторых случаях за 15 мин. Полученный хитин содержал до 4,5% золы и около 5% белка. Для более полного удаления минерального остатка требуется дополнительная обработка кислотой в мягких условиях.

Простейшим методом обесцвечивания хитина является процесс отбеливания H_2O_2 или NaOCl, однако подобные отбеливающие агенты вызывают деградацию цепи полимера. Так при использовании H_2O_2 относительная вязкость хитозана снижается с 226 до 151,5 и до 98 при проведении отбелики после стадии ДМ и ДП, соответственно. Отбеливание после стадии ДА приводит к получению хитозана с вязкостью 1,35, поэтому его лучше проводить как можно раньше по ходу технологической цепи [9].

Для щадящего отбеливания предложен способ, исключающий использование кислорода активных окислителей и кислых сред и основанный на применении гидросульфита натрия (0,25-0,5%) при нормальной температуре. Это позволило получать хитин белоснежного цвета с сохранением концевых звеньев полимера и исключило вторичную пигментацию продукта при переводе его в хитозан [15]. Кроме того, для обесцвечивания используют 95%-ный этанол, перманганат калия, уксусно-этиловый эфир [13, 16].

К достоинствам химического способа получения хитина относятся: высокие степени ДП и ДМ хитина; небольшое время обработки сырья; относительная доступность и дешевизна ДП- и ДМ-агентов.

Недостатками химического способа получения хитина являются: экологическая опасность из-за использования концентрированных реагентов и образования больших объемов кислотно-щелочных, солевых и органических стоков; необходимость использования достаточно концентрированных растворов хими-

ческих реагентов, вызывающих ухудшение качества целевых продуктов, что обусловлено процессами деструкции хитина, гидролиза и химической модификации белка и липидов; возможность использования только коррозионно-стойного оборудования; большой расход воды на технологические нужды и многократные промывки.

Биотехнологические методы. Использование ферментов для удаления остаточного белка изучено достаточно детально. Эти работы обобщены СВ. Немцевым в обзоре [17]. Наиболее оправданным является использование активного комплекса протеолитических ферментов самого криля - автопротеолиз [18]. ДП панциря осуществляется смешиванием целого криля с отходами в соотношении 1:2. Процесс ведут при 50 °С и перемешивании в течение 5 ч. Полученный в результате хитин содержит до 12% белка, что требует дополнительного ДП. Кроме того, присутствующие в ферментативном комплексе криля хитиназы могут снижать молекулярную массу хитина, что обуславливает получение хитозанов пониженной вязкости.

Для достижения более высокой степени ДП более эффективными представляются способы, предусматривающие применение ферментов и ферментных препаратов микробиологического и животного происхождения. Методы [17] предполагают получение хитина из панциря королевского краба с применением папаина и протеаз. Панцирь декальцинируют в ЭДТА при pH10,0 и нормальной температуре, депротеинируют протеиназой тунца при pH8,6 и 37,5 °С; папаином при pH5,5-6,0 и 37,5 °С или бактериальной протеиназой при pH7,0 и 60 °С в течение около 60 ч. Остаточное содержание белка в хитине составляет около 5%. Более полное удаление белка возможно при действии додецилбензолсульфоната натрия или диметилформамида.

Разработаны способы проведения ДП ПСС и более дешевыми, выпускаемыми промышленностью ферментными препаратами, такими, как панкреатин, кислые протеиназы Г10Х, щелочные протеиназы Г20Х [19]. Способ Рогожина, описанный в [6], предусматривает одновременное проведение деминерализации и депротеинирования хитина с применением кислых протеиназ при pH 1,5-4,5 и температуре 15-60 °С в течение 1-48 ч. Полученный таким образом хитин не содержит золы, а остаточное содержание белка составляет 5-8%.

Для более глубокого ДП панциря ракообразных эффективным представляется способ, предложенный Simahare и др. [20], где используют активный штамм протеолитических бактерий *Pseudomonas maltophilia*. Панцирь предварительно декальцинируют 2N соляной кислотой в течение 48 ч при нормальных условиях, измельчают до размера частиц 0,5 см². Культуральную среду готовят внесением 0,8 г панциря в 80 мл 0,2%-ного раствора К₂НРО₄, pH раствора доводят до 7,0 соляной кислотой, *P. maltophilia* засевают в колбу, инкубируют при 30 °С и взбалтывают. По окончании инкубации хитин промывают водой. Остаточное содержание белка снижается в хитине до 1 %.

В работе Розенталя [19] описан способ ДП хитина криля свежевыделенной культурой *B. subtilis*, позволяющий достичь степени гидролиза белка 98% за 15 сут, причем полученный хитин содержит менее 1 % белка.

Наиболее интересным направлением получения хитина из панциря ракообразных является процесс молочнокислой ферментации, предложенный Hall и др. [21]: тщательно измельченный панцирь инокулируется культурой, производящей молочную кислоту, добавляется источник углеводов, смесь перемешивают. В ходе ферментации идет синтез молочной кислоты, который приводит к снижению pH и, как следствие, к растворению СаСО₃, в то же время происходит удаление остаточного белка из панциря под действием протеолитических

ферментов. После ферментации содержимое реактора разделяют на обогащенный белком раствор и твердый хитин, из которого удалено около 7% белка и 35% кальциевых солей.

По технологии, предложенной в [22], в результате молочнокислой ферментации отходов креветки достигается степень ДП и ДМ хитина 90 и 80% соответственно на шестой день обработки.

Хитин, полученный молочнокислым брожением, может быть доочищен стандартными обработками NaOH и HCl, но с гораздо меньшими затратами реактивов. Так при ферментативной обработке отходов креветки бактериями *Lactobacillus plantarum* [23] использовалось дополнительное ДП 2%-ным раствором NaOH в течение 24 ч при нормальных условиях и ДМ 2%-ным раствором HCl в течение 24 ч.

Buatista et al. [24] предложили проводить ДМ хитинсодержащих продуктов одновременно с процессом получения уксусной кислоты бактериями *Lactococcus lactis* и *Clostridium formicoaceticum*. Полученный хитин, содержащий до 3,3% белка и 4,1% золы, подвергали дополнительной обработке 0,25M NaOH и раствором NaOCl при нормальных условиях в течение 6 ч. В результате содержание белка и золы снижалось до 0,8 и 2,0% соответственно.

Таким образом, можно перечислить целый ряд достоинств биотехнологических способов депротеинирования и деминерализации хитина [19, 23, 25]: 1) используются "щадящие" условия, что позволяет сохранить в наибольшей степени нативные свойства хитина и белка и получаемые при этом белковые продукты практически не содержат хлорида натрия, присутствие которого неизбежно в случае применения кислотно-щелочных растворов; 2) использование ряда ферментных препаратов делает возможным совмещение нескольких операций, что упрощает процесс; 3) уменьшается, по сравнению с кислотно-щелочным способом агрессивность реакционной среды, что, в свою очередь, снижает затраты на оборудование и увеличивает срок его службы; 4) возможно осуществлять производство хитина в судовых условиях непосредственно в месте вылова сырья.

Однако биометоды не лишены существенных недостатков: 1) невысокая степень депротеинирования хитина даже при применении нескольких последовательных обработок в свежееинокулированных ферментах, что связано с присутствием части белка недоступной для протеолитических ферментов форме; 2) многостадийность и длительность обработки; 3) использование дорогостоящих ферментов или штаммов бактерий; 4) необходимость обеспечения стерильности производства.

Электрохимический способ. Альтернативой химическому и биотехнологическому способам является электрохимический способ, позволяющий в одном технологическом процессе получать хитин достаточно высокой степени очистки и ценные в пищевом отношении белок и липиды [26, 27].

Целесообразность обработки биологического сырья продуктами электролиза воды была показана в 1980-х гг. в трудах Казанского химико-технологического института [28-30]. В институте "Гипрорыбфлот" в 1990-х гг. были проведены исследования электрохимически активированных водно-солевых растворов - католита и анолита в качестве экстрагирующих систем для ДП и ДМ панциря гидробионтов. Однако из-за быстрой релаксации окислительно-восстановительного потенциала и низкой концентрации H^+ - и OH^- -ионов (0,1-0,2%) данная технология позволяла экстрагировать лишь 25-30% белков без разрушения клеточной структуры ткани [31]. В дальнейших исследованиях было предложено обрабатывать диспергированное сырье в виде водно-солевой суспензии не-

посредственно в электролизерах при воздействии постоянного электрического поля и последующего нагрева. Оптимизация процесса позволила достичь практически полного выделения белка (в виде белкового раствора), липидов и костной (в случае рыбного сырья) или покровной панцирной (в случае ракообразных) ткани. Все продукты, получаемые по электрохимической технологии, имеют коммерческое название с окончанием "-эл", например, хитинэл.

Известно, что электрофизические и электрохимические методы воздействия на биологическое сырье в ресурсосберегающих технологиях весьма эффективны [32]. Они обеспечивают прямое воздействие электрического поля непосредственно на объект биологического происхождения и среду без промежуточной трансформации энергии. Это позволяет более тонко регулировать процессы, упрощать их автоматизацию (в связи с безынертностью управления потоком заряженных частиц) и при этом расходовать небольшое количество энергии.

Сущность технологии получения хитина заключается в проведении стадий ДП, ДМ и обесцвечивания ПСС в виде водно-солевой суспензии в электролизерах оригинальной конструкции под действием электромагнитного поля, направленного потока ионов и образующихся в результате электролиза воды H^+ - и OH^- -ионов и ряда низкомолекулярных продуктов, обуславливающих кислую и щелочную реакцию среды и ее окислительно-восстановительный потенциал соответственно [26, 27].

Из-за полярности молекулярной структуры и гетерогенности электрофизических свойств ПСС под действием электромагнитного поля легко поляризуется, заряжается и поддается его силовому воздействию. В результате ускоряются все процессы массопереноса (экстрагирование, диффузия), изменяется клеточная структура, что выражается в увеличении проницаемости или разрушении клеточных мембран и агрегации внутриклеточного содержимого, и возрастает интенсивность физических и химических превращений.

Комплексное воздействие перечисленных факторов на ПСС позволило: достичь глубокого депротеинирования и деминерализации в значительно более мягких условиях, чем при кислотно-щелочной технологии и получить хитин, белки и липиды не только с высоким выходом, но и с максимально возможным сохранением их нативной структуры и свойств; достичь требуемой степени очистки хитина при однократном проведении стадий депротеинирования и деминерализации; существенно упростить технологическую схему - стадию обесцвечивания стало возможным осуществлять одновременно с деминерализацией, под действием низкомолекулярных продуктов, выделяющихся при электролизе одновременно с H^+ -ионами; исключить промывки материала водой до нейтральной реакции среды между стадиями, так как нейтрализация происходит при последующей обработке в электролизере.

Не менее существенным достоинством электрохимической технологии стала возможность осуществлять химическую модификацию и деструкцию хитина во время его получения или дополнительной обработкой продуктами электролиза [33].

Первичное депротеинирование сырья (рис. 2) осуществляется католитом - раствором электролита, являющимся отходом от стадии вторичного депротеинирования предыдущей порции сырья в электролизере. В результате весь экстрагированный белок оказывается в конечном продукте - белоксодержащем растворе, названном протеинэлом. Этот продукт обладает ценными пищевыми и функциональными свойствами, что делает его перспективным для использования в качестве пищевой добавки в фаршевые, кондитерские изделия, майоне-

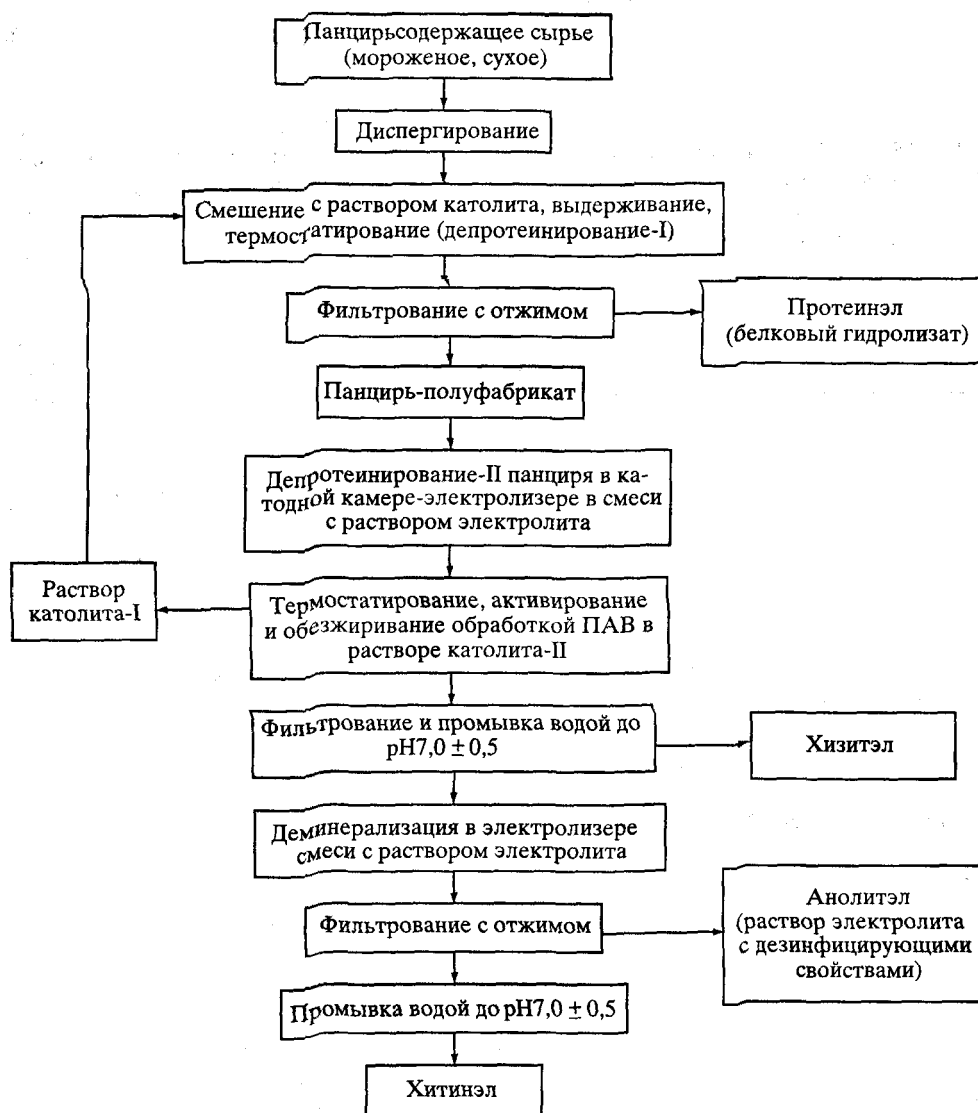


Рис. 2. Технология получения хитинэла и хизитэла электрохимическим способом

зы и т.д. Получены положительные результаты по применению его в качестве основы микробиологических питательных сред [5].

При электрохимическом способе ДП панциря на степень экстрагирования белков, кроме значения pH и ионной силы определяющее значение имеют восстановительные свойства экстрагентов, величина которых, выраженная через окислительно-восстановительный потенциал E_h , должна быть не выше минус 620 мВ [5].

Процесс электрохимического экстрагирования белков при столь низких концентрациях гидроксидионов (0,1-0,2%) основан на способности восстановителей, образующихся в результате электролиза воды (H^+ , H_2), вызывать в белках разрыв дисульфидных связей $-S-S-$ и переводить в раствор щелочерастворимую фракцию белков [5]. На этом основано преимущество электрохимического спо-

Таблица 1. Физико-химические и биохимические характеристики хитинов, %

Свойства	Образец		
	хизитэл	хитинэл	хитин (кислотно-щелочной)
Водоудерживающая способность	44,8	39,9	71,9
Влагосодержание	31,0	28,5	41,8
Остаток после прокаливания	27,2	0,5	0,4
Азот общий	4,2	6,1	6,3
Содержание липидов	2,0	7,8	12,0
Растворимость в ДМАА/LiCl	10,7	97	98

соба перед традиционной *щелочной* обработкой (1N NaOH), при которой в белках происходит разрыв преимущественно -C-S-связей [34], и в продукте образуются побочные примеси, исключающие возможность его дальнейшего использования. Стадия обработки ПАВ необходима для обезжиривания сырья, при этом использование органических растворителей нецелесообразно, так как увеличивает класс пожароопасности производства. Хитин, получаемый без обезжиривания, при ДП содержит много (15-25%) липидов, что обусловлено низкой концентрацией ОН-ИОНОВ по сравнению с кислотно-щелочными методами.

Побочным продуктом электрохимической переработки ПСС является раствор электролита - анолитэл, получаемый после стадии ДМ сырья в электролизаторе. Анолитэл обладает дезинфицирующими свойствами, его биоцидность - 700 ед. кратности, что в 150-300 раз выше, чем биоцидность широко используемого для этой цели гипохлорита натрия. Анолитэл применяют в качестве моющего, дезинфицирующего и стерилизующего раствора в пищевой промышленности для увеличения сроков хранения мясопродуктов при консервации силоса, и др.

Анализ качественного и количественного состава хитинэла (см. табл. 1) позволяет заключить, что он пригоден для использования во всех известных для хитина областях применения. Следует отметить, что при необходимости получения хитина особо чистого, например, с содержанием минерального остатка после прокаливания менее 0,1%, необходимо вводить дополнительные промывки до нейтральной реакции среды после стадий ДП и активации ПАВ.

Электрохимическая технология позволяет получать и различные химические и структурные производные хитина с ценными и оригинальными свойствами: низкой молекулярной массой (до 5000), пониженной растворимостью в ДМАА (до 10%), повышенной до уровня хитозана сорбционной емкостью (2,5 мг-экв/г), усиленными бактерицидными свойствами. Одним из таких производных хитина является хизитэл (см. табл. 1). Он производится по упрощенной технологии (см. рис. 2), дешевле хитинэла более чем в 2 раза, при этом его сорбционные свойства на порядок превышают аналогичные характеристики последнего и составляют 80 мг/г для ионов Cu^{2+} и 100 мг/г для ионов Pb^{2+} [33]. Хизитэл весьма эффективен как средство борьбы с клеточными патогенами. В виде добавки в почву (0,5%) он снижает распространение и развитие инфекционных заболеваний сельскохозяйственных растений до 50% [35].

Электрохимическая технология получения хитина малоотходна, так как стоки образуются только после двух технологических операций: отделения липидов от липидсодержащей эмульсии и промывки хитина в конце технологиче-

ской цепочки. Стоки при смешивании взаимно нейтрализуются до pH 6,5-7,0. При электролизе также образуются газообразные продукты (O_2 и H_2) в не-взрывоопасном соотношении. При использовании в качестве электролита галогенидов, газообразные продукты электролиза улавливаются типовыми орошаемыми скруберами.

Таким образом, к преимуществам электрохимической технологии получения хитина относятся: возможность получения в одном технологическом цикле всех ценных компонентов сырья с максимальным выходом при сохранении их биологических и функциональных свойств за счет щадящих условий обработки; исключение необходимости использования кислот, щелочей и ферментов, и, соответственно, снижение экологических нагрузок на окружающую среду; сокращение расхода пресной воды на промывки; интенсификация процесса; повышение износостойкости оборудования из-за отсутствия агрессивных сред; возможность оперативного изменения производительности и технологической схемы процесса; возможность получения широкого спектра производных хитина.

ПОЛУЧЕНИЕ ХИТОЗАНА

Среди производных хитина наибольшее распространение имеет хитозан, благодаря своей биологической активности, реакционной способности и технологичности, обусловленной простотой растворения. В основе получения хитозана лежит реакция отщепления от структурной единицы хитина - N-ацетил-D-глюкозамина - ацетильной группы, или реакция деацетилирования, глубину которой принято оценивать по величине степени ацетилирования - Fa или по величине степени деацетилирования (1-Fa). В зависимости от условий реакции получают хитозаны, существенно различающиеся величиной Fa.

Реакция ДА наряду с отщеплением ацетильных групп сопровождается одновременным разрывом гликозидных связей полимера, т.е. уменьшением молекулярной массы (ММ), изменением надмолекулярной структуры, степени кристалличности и т.д. Таким образом, хитозан представляет собой полидисперсный по ММ и по Fa полимер D-глюкозамина, содержащий некоторое количество недеацетилированных ацетамидных групп [36], допустимое количество которых строго не определено. Обычно хитозаном называют хитин с $Fa < 0,5$.

Стандартного процесса ДА хитина не существует, однако в большинстве традиционных способов используются концентрированные растворы NaOH в широком диапазоне концентраций (от 35 до 50%), температур (от 20 до 140 °C), гидромодулей (от 3:1 до 10:1) и времени обработки (от 0,5 до 10 сут.).

Процесс ДА хитина имеет ряд особенностей. Например, для получения высокодеацетилированного хитозана требуется не менее чем десятикратный мольный избыток NaOH, причем процесс ДА наиболее быстро проходит в течение 1 ч реакции, когда Fa достигает величины 0,15, далее реакция замедляется и достижение меньших значений Fa требует дополнительных воздействий. Столь жесткие условия получения хитозана нежелательны, так как они вызывают деструкцию полимера, приводят к изменению его надмолекулярной структуры; экологически небезопасны и существенно увеличивают стоимость хитозана, ограничивая возможные области его использования. В связи с этим важность поиска новых усовершенствованных способов получения хитозана очевидна.

Исследование структуры хитина различными методами ИК-спектроскопии, ЯМР, дериватографическим и термическим анализами, микроскопией, рассея-

нием рентгеновских лучей, а также методами сорбции газов и жидкостей [7, 37, 38] позволило установить, что низкая реакционная способность хитина и необходимость использования жестких условий реакции ДА обусловлены особенностями его надмолекулярной и морфологической структуры. Хитин характеризуется высокой степенью кристалличности (до 85%), стеклообразным состоянием аморфной фазы ($T_{СТ} = +55$ и $+105$ °С) [39], развитой системой межмолекулярных водородных связей, в которую включены гидроксильные, амидные и аминокислотные группы, а также кислород гликозидных связей, энергия взаимодействия которых близка к 2,8 ккал/моль [7]. Высокая жесткость макромолекул наряду с гидрофобностью и не очень высокой пористостью ($S_{уд} = 5-20$ м²/г, $V_{пор по воде} = 0.84$ см³/г), обуславливают малую доступность реакционных центров хитина - ацетамидных групп. Поэтому принято считать, что причиной трудности ДА до $Fa < 0,2-0,15$ является упорядоченная надмолекулярная структура хитина и недоступность всех N-ацетильных групп для действия NaOH, если не используются особо жесткие условия [40]. Другая гипотеза предполагает, что хитин образует комплекс со щелочью, причем константа скорости реакции ДА подобного-хитин-щелочного комплекса много меньше, чем константа скорости процесса ДА хитина [41].

Следовательно, наиболее рациональный путь уменьшения жесткости условий реакции деацетилирования заключается в воздействии на надмолекулярную структуру и морфологию хитина. Одновременно значительное число работ посвящено исследованию влияния температурных и концентрационных параметров на процесс ДА.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ РЕАКЦИИ НА ПРОЦЕСС ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЯ ХИТИНА

Температура - решающий фактор, влияющий на глубину ДА хитина, но при ее увеличении резко возрастает степень деструкции полимера. Между температурой и скоростью реакции существует прямо пропорциональная зависимость [42]. По мере снижения температуры ММ продукта возрастает, но при этом получение образца с заданной степенью ДА требует значительно более длительного воздействия. По-видимому, энергия активации реакции гидролиза ацетамидных групп ниже, чем энергия активации процесса распада полимера по гликозидным связям.

Результаты исследований [43] показывают, что реакция ДА наиболее быстро проходит в течение первого часа. За это время хитин деацетируется примерно на 70% при условии обработки его 50%-ным раствором NaOH. Далее скорость реакции значительно замедляется, и к пятому часу степень ДА достигает 80%. Увеличение времени обработки в большей степени способствует снижению ММ и в меньшей - Fa . Продолжительность обработки свыше 1 ч не влияет на величину Fa , в большей степени она зависит от концентрации NaOH и температуры [42] (см. рис. 3).

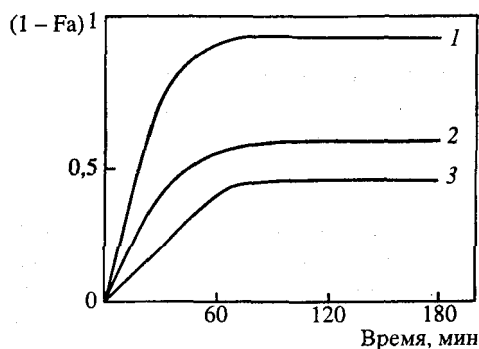


Рис. 3. Степени деацетилирования хитозана $(1 - Fa)$ в зависимости от температуры, концентрации NaOH и времени обработки
1-3 - $T = 130, 112$ и 105 °С

На степень деструкции хитина существенно влияет среда, в которой проводят реакцию ДА, в частности, присутствие в ней кислорода. Замедлить снижение ММ хитозана можно, проводя реакцию в инертной среде азота или аргона, а также добавляя улавливатели кислорода, такой, как тиофенол, или восстанавливающий агент, например, боргидрид натрия для подавления окисления концевых звеньев цепи. Во всех указанных случаях отмечается повышение ММ и вязкости хитозанов без снижения степени ДА. Значительную роль играет и степень очистки инертного газа.

Были предприняты попытки снижения температуры и концентрации NaOH при проведении реакции ДА. При температуре 30 °С, концентрации NaOH 23-33% и гидромодуле 14:1 растворимые в кислоте продукты были получены только при продолжительности обработки 6 дней. Увеличение концентрации NaOH с 33 до 35 и 39% сокращало время реакции до 5 и 4 дней, соответственно. Увеличение гидромодуля также приводило к уменьшению продолжительности реакции: при гидромолекуле 56:1 и концентрации щелочи 33% она составила только 1 день [31].

Для уменьшения концентрации NaOH было предложено смешивать хитин с 2-5 частями раствора щелочи или обрабатывать его избытком щелочи, который затем удаляют фильтрацией или центрифугированием, оставляя 0,5-2,5 части NaOH на 1 часть хитина [42]. Смесь хитин-щелочь нагревали до 40-80 °С и затем до 45-110 °С.

Мягкие режимы деацетилирования хитина позволяют использовать его для приготовления пищевого хитозана с достаточно высокой вязкостью [44]. Порошкообразный хитин заливали 4-кратным количеством 50%-ного раствора NaOH и перемешивали, затем суспензию переливали в противень, подогревали до 60 °С и при этой температуре выдерживали в течение 2 ч. В результате образовывалась вязкая масса, содержащая около 30% влаги, ее промывали водой для удаления щелочи и высушивали. Полученный в результате хитозан имел в три раза более высокую вязкость, чем хитозан, приготовленный в обычном жестком режиме.

Практически полностью деацетилированный хитозан был получен многократными обработками хитина 47%-ным раствором NaOH в течение двух часов в атмосфере аргона при 60 °С с промежуточными его промывками кислотой. После второго цикла обработки достигалась величина F_a 0,16, а после третьего - 0,01 при ММ хитозана, равной 500 тыс. [45]. Оптимизация параметров щелочного ДА в направлении уменьшения температуры и концентрации щелочи позволила получить менее деструктированный хитозан, но при этом (максимально достигаемая величина F_a составила 0,15) усложнилась технологическая схема и увеличилось общее время процесса.

Кроме традиционного щелочного способа существуют также способы ДА другими агентами. По одному из методов хитин обрабатывали в инертной атмосфере гидроксиламином в щелочной среде при pH 13, температуре 100 °С в течение 10-20 ч. Основные недостатки этого способа - высокая степень ацетилирования получаемого хитозана ($F_a = 0,3$), длительность обработки, а также деструкция цепи полимера [17]. Способ ДА хитина гидразингидратом [31] практически лишен этих недостатков. Он предусматривает 2-4-часовую обработку хитина гидразингидратом при 120-150 °С. При минимальной деструкции хитина достигается степень ацетилирования $F_a = 0,03-0,1$. Однако этот деацетирующий агент труднодоступен и высокотоксичен. Обработка хитина смесью 10%-ного раствора NaOH с гидразингидратом обеспечивает получение хитозана с ММ = 120-150 тыс. и $F_a = 0,05$ [46].

Известны также ферментативные способы деацетилирования хитина, например применение хитиндезацетилазы из микроорганизма (дрожжей) *Absidia coerulea* штамм 5301. Было показано, что 5 кг хитина со значением $Fa = 0,85$ можно перевести в хитозан со значением $Fa = 0,35$, используя 1 кг мицелия в течение 10 ч [47].

Исследования, направленные на интенсификацию процесса ДА хитина воздействием на его надмолекулярную структуру и морфологию, оказались более результативными.

ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ ХИТИНА НА ПРОЦЕСС ЕГО ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЯ

Так как процесс получения хитина всегда сопровождается его ДА и Fa хитина часто достигает значений 0,6 (как, например, при получении хитина электрохимическим способом), в данном разделе одновременно с действием активирующих факторов на хитин будет рассматриваться и их действие на хитозан.

Возможность воздействия на надмолекулярную структуру в процессе получения хитозана была обнаружена более 40 лет назад при проведении промежуточных промывок и высушиваний, но не было дано объяснения наблюдаемым явлениям. Luseña и Rose [7] показали, что две ДА обработки продолжительностью по 0,5 ч в 55%-ном растворе КОН, разделенные промывкой и высушиванием на воздухе, по эффективности были эквивалентны одному непрерывному процессу продолжительностью 15 ч, при этом появлялась возможность получать продукт с более высокой ММ. Было показано, что и в случае растворов NaOH [40] наблюдается аналогичная закономерность: применение трех последовательных обработок продолжительностью по 1 ч 47%-ным раствором NaOH при 110 °С дает хитозан со значением $Fa = 0,04$, тогда как непрерывная обработка в течение 4 ч при тех же условиях позволяет получить продукт со значением $Fa = 0,18$.

Для объяснения эффекта промежуточных промывок и высушиваний было предложено две гипотезы. Saito G. [48] предположил, что во время промывок концентрация щелочи внутри хитин/хитозановых частиц снижается до концентрации максимального набухания, которая по аналогии с целлюлозой должна быть около 18-20%. Подобное увеличение набухания приводит, в свою очередь, к увеличению доступности цепей полимера для следующей ДА обработки. По другой гипотезе, промывки и высушивания способствуют разрушению хитин-щелочного комплекса, делая таким образом N-ацетилированные группы более доступными и реакционноспособными для последующих ДА-обработок [41].

Процессы щелочного набухания полисахаридов, особенно целлюлозы, детально исследованы [49]. Для набухания пригодны растворы и растворители, способные не только быстро проникать в капиллярно-пористую структуру полисахарида, но и термодинамически с ним совместимые. Благодаря этому происходит набухание, в первую очередь, аморфной, а иногда и относительно упорядоченной фазы. В результате набухания ослабляются внутри- и межмолекулярные связи, повышается подвижность различных структурных элементов, аморфная фаза переходит в высокоэластическое состояние что, естественно, повышает реакционную способность полимера [50].

Сродство полисахаридов, содержащих гидроксильные группы, к щелочи и сорбции катионов щелочи на этих группах [51] способствует их набуханию в щелочи. Например, активация хитина была осуществлена замораживанием предварительно измельченного хитина в 40%-ном растворе NaOH с добавлени-

ем додецилсульфата натрия, что позволило существенно увеличить его реакционную способность [52]. Подобно мерсеризации целлюлозы, эффективность активации хитина набуханием в щелочи зависит от температуры и концентрации последней. Слишком низкая концентрация щелочи обеспечивает лишь набухание и разупорядочивание аморфных межфибриллярных областей. Увеличение концентрации до 17-25% позволяет вовлечь в процесс фибриллы, сферолиты и кристаллы, вызывая интеркристаллитное набухание [51]. Понижение температуры также способствует активации хитина [17]. Очевидно, что перед высокотемпературным ДА в концентрированных щелочных растворах целесообразно осуществить стадию набухания хитина в 17-25%-ных растворах щелочи при комнатных условиях в течение 1-3 ч.

Один из наиболее эффективных способов воздействия на надмолекулярную структуру и активацию хитина и хитозана - их переосаждение. Для этого в качестве растворителей используют органические амиды в присутствии солей или концентрированную фосфорную кислоту; в качестве осадителей - менее полярные и более низкокипящие растворители - хлороформ, спирт, ацетон, гексан или щелочь соответственно. Хитозан переосаждается из раствора в кислоте раствором щелочи. Данный способ активации основан на известном факте неполного восстановления системы меж- и внутримолекулярных водородных связей в полисахаридах при переосаждении, и, следовательно, разрушения их надмолекулярной структуры. Это подтверждается, например, видом кривых при потенциометрическом титровании хитозана до и после его переосаждения [53]. Применяя предварительно переосажденный из раствора в 85%-ной фосфорной кислоте хитин, был получен хитозан с ММ 540 тыс. и $Fa = 0,22$ [54]. Таким образом, растворение и последующее переосаждение хитозана также делает N-ацетильные группы более доступными. Подобным способом были получены полностью деацетилированные хитозаны. Очевидно, что из-за дороговизны реактивов и длительности процесса переосаждение как способ активации может быть использован лишь в лабораторной практике.

На явлении набухания основаны способы активации хитина и хитозана с использованием органических веществ, обладающих сродством к полисахаридам, достаточной полярностью, нуклеофильностью [55]. Среди исследованных органических веществ наиболее эффективными оказались жидкие алифатические амины и амиды, этилендиамин, диметилформамид, диметилсульфоксид [51-55]. Эффективность их использования обусловлена интеркристаллитным набуханием, которое увеличивается в присутствии кислот (20% CH_3COOH или 10% CCl_3COOH). Хотя электронно-микроскопические исследования не показали существенного изменения морфологии образцов, по данным ИК-спектроскопии, ЯМР-релаксации протонов [56] и сорбции паров воды и аргона, можно сделать вывод об увеличении активной поверхности этих полимеров, размера пор, ослаблении межмолекулярных связей. Например, у хитозана отмечается увеличение $S_{уд}$ с 0,14 до 19 м²/г и снижение степени кристалличности с 70 до 45% в первые двое суток набухания и до 20-15% в последующие 7-10 суток, правда, у хитина степень кристалличности изменяется меньше [57]. Указанный способ активации имеет существенный недостаток, связанный с необходимостью удаления активирующей системы многократным инклюдированием полимера в менее полярных растворителях с последующей сушкой, что также возможно лишь в лабораторной практике.

Другое направление исследований в этой области - использование системы растворителей, сочетающей в себе водорастворимые (ацетон, изопропиловый спирт, тетрабутилацетат) и водонерастворимые (парафиновое масло или диметиловый эфир полиэтиленгликоля) жидкости. Например, при активации хитина

жидким парафином, гексаном, изопропиловым спиртом, при значительном снижении расхода щелочи и понижении деструкции хитина, достигается $Fa = 0,08$. Такие системы служат реакционной средой, обеспечивающей равномерное смачивание и смешение хитина со щелочью [17].

Прост в реализации, но энергоемок способ активации хитина и хитозана механическим размолотом и экструзией. Давно известен способ диспергирования целлюлозы в виброшаровых или ударных мельницах [51]. Применение его для активации хитина и хитозана приводит к существенному увеличению дисперсности частиц полимеров. Их удельная поверхность, степень кристалличности и ММ меняются незначительно. Эффективность размолоту увеличивается, если его осуществлять не "сухим", а "мокрым" способом в среде тех реагентов, которые будут использоваться на последующих стадиях переработки полисахаридов, например: диметилформамид, диметилформамид + кислота, изопропанол и др. [58]. При этом реагенты не должны содержать воду, так как она вызывает набухание и рекристаллизацию макромолекул при сушке полимера.

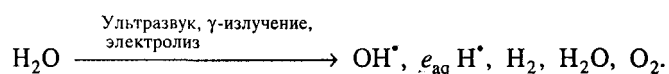
Наиболее эффективен в отношении активации хитина и хитозана способ экструзионного размолоту [59], сочетающий воздействие на полимер сдвиговых деформаций и высокого давления. При этом происходит аморфизация структуры хитина, снижение степени кристалличности ММ (до двухкратного), существенное увеличение удельной поверхности. В случае активации хитозана степень его кристалличности снижается с 74 до 30%, ММ с $1,9 \cdot 10^5$ до $5,0 \cdot 10^4$ D, удельная поверхность увеличивается с 0,49 до 6,75 м²/г. К недостаткам экструзионной активации можно отнести получение неоднородных по структуре полимеров с пониженной ММ, при этом активация часто сопровождается "ороговением" полимера, обусловленным образованием сшивок. На этом способе активации основан перспективный способ твердофазного щелочного ДА хитина в условиях сдвиговых деформаций в экструдерах, разработанный отечественными учеными [60].

Твердофазное ДА хитозана сплавлением хитина с гидроксидом калия при 180-190 °С было проведено Гильсоном еще в 1895 г. [10]. Наличие таких факторов как сдвиговые деформации и давление позволило существенно интенсифицировать процесс. Например, снизить молярное соотношение хитин/NaOH с привычного 1:10 до 1:5, время реакции до 3-5 мин. Однако спецификой этого способа является получение неоднородного по структуре и степени ацетилирования полимера и существенная деструкция макромолекулярных цепей, приводящая к снижению ММ со 190 до 70-40 кD [60]. Однако в ряде случаев, в частности, при использовании хитозана в медицине и сельском хозяйстве последнее является положительным фактором.

АКТИВАЦИЯ ХИТИНА НЕТРАДИЦИОННЫМИ СПОСОБАМИ

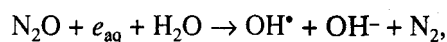
(радиолит, ультразвук, микроволновое облучение, электрохимическая обработка)

В последние годы возрос интерес к новым физическим и физико-химическим методам активации хитина и хитозана, позволяющим облегчить процесс их ДА и направленно влиять на их молекулярные и структурные параметры [61-63]. Несмотря на разнообразие этих методов активации, всех их объединяет общий механизм, основанный на действии на молекулы хитина и хитозана активных радикалов, окислителей и др. частиц, образующихся в процессе радиолита, ультразвуковой обработки воды или ее электролиза.



В работе [62] рассматривается механизм взаимодействия с полисахаридами радикалов OH^\bullet , H^\bullet как основных реагентов, обуславливающих активацию. OH^\bullet реагирует с моно- и полисахаридами с отрывом водорода от С-Н-связей. В результате образуются вторичные углеродные радикалы на полимерной цепи, причем скорость этого процесса, например, при радиоллизе, постоянна и $K = 6,4 \cdot 10^8 \text{ дм}^3 \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Радикалы H^\bullet менее реакционноспособны в отношении полисахаридных макромолекул, но механизм их действия аналогичен. Образовавшиеся углеродные радикалы быстро преобразуются в устойчивые продукты с отщеплением молекул воды и образованием карбонильных групп и вторичных радикалов, либо со взаимодействием радикалов у C_1 , C_4 и C_5 с гликозидной связью. Последний процесс и обуславливает деструкцию цепей и уменьшение ММ. Количество разрывов цепи прямо пропорционально концентрации первичных радикалов и времени их взаимодействия с полисахаридами [62]. Кроме общих закономерностей каждый из способов активации имеет свои особенности.

Действие радиолиза на твердый хитозан достаточно исследовано, он применяется для стерилизации и сопровождается деструкцией цепи. К его недостаткам относится невозможность остановки процесса деструкции в момент прекращения γ -излучения. Значительно более перспективен радиоллиз хитозана в его водных растворах в присутствии кислот, среди которых наиболее целесообразно использовать HClO_4 , которая, в отличие от других, не взаимодействует с радикалами. Хитозан облучали в дозе $0,062 \text{ Gy} \cdot \text{с}^{-1}$ $\text{Co-}\gamma$ -излучением (пригодны и электроннолучевые излучатели). Перед облучением хитозан выдерживали в воде, а затем добавляли кислоту. Раствор насыщали N_2O или смесью $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$ в соотношении 4:1. Эти добавки обеспечивали перевод гидратированного электрона в OH^\bullet по реакции



что приводило к увеличению эффективности облучения. Спецификой данного способа активации является снижение деструкционных процессов в полимерах в присутствии O_2 [61] и их прекращение в момент остановки γ -излучения, что позволяет регулировать ММ полисахарида временем облучения.

Ультразвуковая обработка проходит по аналогичному механизму за счет присутствия в полимере молекул H_2O в газовых пузырьках. Их квазиразрушение под действием давления и температуры также приводит к образованию OH^\bullet -, H^\bullet -радикалов [64]. Имеются и другие механизмы, интерпретирующие действие ультразвука - пиролиз в тонком слое воды окружающей газовый пузырек или разрыв полимерной цепи под действием гидродинамических сил. В водно-кислотной среде превалирует OH^\bullet -радикальный механизм, а в среде органических растворителей - гидродинамический. Ультразвуковой обработкой удалось снизить ММ хитозана с $4 \cdot 10^5$ до $2 \cdot 10^5 \text{ D}$. Подтверждением определяющей роли OH^\bullet -радикалов в деструкции цепи служит проведение обработки в присутствии $0,002 \text{ M}$ раствора тетрабутанола, связывающего OH^\bullet -радикалы. В результате деструкция цепи хитозана уменьшалась в несколько раз [62].

Ультразвуковая обработка (220 Вт) 1% -ного раствора хитозана с $\text{Fa} = 0,37$ и $\text{MM} = 6,5 \cdot 10^5 \text{ D}$ в $0,2 \text{ M}$ растворе уксусной кислоты в присутствии $0,1 \text{ M}$ раствора ацетата натрия при температуре 60°C в течение $1,5 \text{ ч}$ привела к снижению ММ до $1,6 \cdot 10^5 \text{ D}$, а через 48 ч ММ снизилась до $1,2 \cdot 10^5 \text{ D}$. При этом происходит уменьшение полидисперсности в два-три раза. Наиболее интенсивно уменьшение ММ происходит в первые $1,5 \text{ ч}$, далее деструкция замедляется [64].

К сравнительно новым способам активации можно отнести термохимический, реализуемый с помощью микроволнового облучения. В работе [65] мелко измельченный сухой панцирь моллюска смешивали с 30%-ным раствором NaOH, подвергали микроволновому облучению ($\sim 2,45$ ГГц) в течение 22 мин, промывали холодной водой и высушивали. Микроволновая обработка снижает продолжительность реакции ДА как минимум в 16 раз. Приготовленный по данной методике хитозан имел более низкую ММ и \bar{M}_n , чем полимер, полученный из того же сырья обычным щелочным способом, но оба материала имели сходную картину кристалличности и другие структурные характеристики.

Смешение хитина с 30%-ным раствором NaOH и обработка его в микроволновом поле мощностью 440 Вт в течение 35 мин обеспечило получение хитозана с $\bar{M}_n = 0,02$ и ММ = 131,8 kD в то время как обработка этого же хитина 50%-ным раствором NaOH при 136 °C в течение 1 ч в атмосфере азота обеспечила достижение $\bar{M}_n = 0,26$ при величине ММ = 467,7 kD [66]. Таким образом, этот способ активации позволяет получить хитозан с более высокой СД и сниженным показателем ММ за более короткое время и при меньшей концентрации щелочи.

Прост в реализации и электрохимический способ активации хитина, осуществляемый на том же оборудовании (в электролизере оригинальной конструкции), на котором проводят ДМ и ДП панциря [26, 27]. При электрохимическом способе ДП и ДМ панциря благодаря синтезу радикалов OH^* , NO_2 , H_2O_2 и др. частиц [63] и значительному окислительному потенциалу (например, в анодной фракции он достигает +1200 мВ), одновременно с ДМ несмотря на очень низкие концентрации H^+ и OH^- происходит деструкция макромолекул хитина [33]. Так как концентрация радикалов и значения окислительно-восстановительного потенциала регулируются электрическими параметрами {силой тока, напряжением и др.) и временем электролиза, величину ММ хитина и, соответственно, хитозана можно варьировать в широких пределах. Например, при увеличении времени обработки в анодной фракции с $E_h = +1200$ мВ с 1 до 8 ч при 20 °C ММ хитина из гаммаруса снизилась в пять раз с 125 до 25 тыс. Последующая деминерализация хитина с такими характеристиками традиционным щелочным способом требует меньшего времени и завершается за 1 ч при температуре реакции 98 °C.

Большие перспективы имеют электрохимическая модификация и деацетилирование хитина в электролизерах в разных средах под действием постоянного электрического тока, что является предметом настоящих исследований.

Способы получения и структура хитозанов. Как известно, на физико-химические (а значит и потребительские) свойства хитозана существенно влияют особенность его надмолекулярной структуры, величина \bar{M}_n , молекулярная масса, степень кристалличности и полидисперсности по структуре и показатели \bar{M}_n и ММ в объеме полимера. Все эти показатели в большой степени определяются способом и условиями реакции ДА, которая всегда сопровождается снижением \bar{M}_n и ММ, степени кристалличности и общей аморфизацией структуры. Например, средняя ММ хитина из краба $> 1 \cdot 10^6$, а у коммерческого хитозана, полученного из него ММ $> 3 \cdot 10^5$. Кроме этого, на структуру и свойства хитозана влияют сырьевые источники, степень очистки хитина от белка и минеральных примесей и условия изготовления хитозановой продукции (способ формирования, растворители и т.д.).

Многообразие областей использования и разные требования, предъявляемые к хитину и хитозану, не позволяют конкретизировать оптимальность величин ММ, F_a , вязкость и др., но на основе взаимосвязи структуры и свойств, возможно, осуществить выбор того или иного способа получения хитозана.

Как и для других полимеров, для полисахаридов сохраняется закономерность, при которой чем более однородна химическая структура полимера, тем более однородна его надмолекулярная структура, выше степень кристалличности, жесткость цепей, прочность, устойчивость к биodeградации, но ниже реакционноспособность, сорбционная емкость и т.д. Более однородному состоянию отвечают хитины с большей, а хитозаны с меньшей F_a [58]. Например, степень кристалличности снижается с 70-85% до 40-60% при $F_a > 0,15$ и повышается до 90% при $F_a < 0,05$ [1, 13].

Что касается ММ, то известно, что с ее снижением, т.е. деструкцией макромолекул хитина и хитозана происходит формирование более упорядоченной структуры с большими по размерам фибриллами и сферолитами и большей степенью кристалличности и жесткостью цепей. Макромолекулы с большей ММ склонны к образованию более дефектной и неоднородной надмолекулярной структуры с мелкими фибриллами и сферолитами и меньшей степенью кристалличности [37].

На свойства хитина и хитозана существенно влияет степень полидисперсности ММ и F_a . Можно предположить, что увеличение индекса полидисперсности, определяемого как отношение максимальных значений F_a к его среднему значению для каждой фракции полимера и ширины ММР приводит к снижению однородности полимера, аналогично увеличению F_a и уменьшению ММ для хитозанов.

Современные исследования позволили установить влияние гетерогенности или гомогенности реакции деацетилирования хитина или повторного N-ацетилирования хитозана на величину F_a и ее полидисперсность в объеме образца. У хитозанов, имеющих одинаковые значения F_a , но приготовленных разными способами, наблюдаются различия в таких свойствах как кристалличность, растворимость и способность к набуханию. Kurita K и др. [4, 67] на основании исследования растворимости и данных дифракционной спектроскопии установили, что хитозан, приготовленный в результате гомогенного ДА, имеет беспорядочную полимерную структуру, в то время как хитозан, полученный гетерогенным ДА, имеет блочную полимерную структуру. Данные результаты были подтверждены Aiba [68], Ogawa и Yui [69]. Однако Varum и др. [70], на основании данных ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии, показали, что распределение N-ацетилированных остатков в хитозанах, полученных как гетерогенным, так и гомогенным деацетилированием хитина, было одинаковым, близким к беспорядочному распределению Бернулли.

Образцы хитозанов с одинаковыми численными значениями F_a были приготовлены в условиях: гетерогенного деацетилирования хитина в растворе NaOH или N-ацетилирования хитозана и гомогенного деацетилирования хитина, растворенного в растворе NaOH, или повторного N-ацетилирования хитозана [4, 67]. В табл. 2 представлены результаты фракционирования хитозанов при различных pH, полученных в гомогенных и гетерогенных условиях.

Видно, что хитозаны, полученные в гетерогенных условиях, отличаются значительной полидисперсностью по величине F_a , в то время как гомогенный способ получения обеспечивает формирование однородных образцов с индексом полидисперсности по $F_a = 1$.

Таблица 2

Хитозан, приготовленный гетерогенным деацетилированием (Fa = 0,25)					
pH	6,80	7,04	7,47	8,45	9,35
Фракция, %	20,5	46	74	91	100
Fa	0,33	0,30	0,28	0,26	0,25
Хитозан, приготовленный гомогенным повторным N-ацетилированием (Fa = 0,27)					
pH	6,81	7,13	7,34	8,02	8,80
Фракция, %	16	50	60	87	98
Fa	–	0,27	0,27	0,27	0,27

Авторами [66] при проведении гетерогенного деацетилирования хитина в 50%-ном растворе NaOH при 136 °C в течение 1 ч в атмосфере азота и гомогенного ДА в 50%-ном NaOH при 60 °C в течение 46 ч были получены образцы хитозана с Fa = 0,26 и 0,18 и ММ = 467,7 и 251,2 KD соответственно. Таким образом, гетерогенный процесс обеспечивает получение хитозанов с меньшей Fa, но большей ММ, отличающихся высокой полидисперсностью по величине Fa. По мнению авторов [66], гомогенный процесс способствует формированию более подвижной макромолекулярной структуры хитозана, образующей вытянутые конформации, а гетерогенный процесс обеспечивает образование менее подвижных структур, склонных к беспорядочному свертыванию. При одной и той же ионной силе и pH макромолекулы, полученные в гомогенных условиях, в растворе склонны к большему запутыванию и увеличению его вязкости.

Влияние технологических параметров ДА хитина (времени, температуры, концентрации щелочи и др.) на Fa и ММ и др. характеристики хитозана исследованы и рассмотрены в данном обзоре ранее и подробно описываются в литературе [10, 13].

На величину ММ и структуру хитозана оказывает влияние степень деминерализации и депротеинирования хитина, например, отсутствие стадии деминерализации хитина способствует получению более высокомолекулярного хитозана, так как деминерализация сопровождается кислотным гидролизом [71].

Получение хитозана в солевой или основной форме также влияет на его свойства. В солевой форме жесткость цепей и степень кристалличности ниже, так как противоионы кислотных остатков играют функцию пластификаторов [10] и разрушают межмолекулярные связи. При этом полимер начинает проявлять высокоэластичную деформацию, которая отсутствует у хитозанов в основной форме.

На формирование структуры хитозана оказывает влияние его концентрация в растворе, способы формирования и условия высушивания и т.д. Однако определяющее действие на структуру и свойства хитозана все же оказывают условия и способ проведения реакции дезаминирования.

Таким образом, имеющееся многообразие способов получения хитина и хитозана, возможность активации сырья с использованием современных физико-химических и электромагнитных способов воздействия на молекулярную и надмолекулярную структуру этих полимеров позволяют ожидать создания в скором времени весьма эффективных, экологически безопасных ресурсосберегающих технологий получения этих полимеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Roberts G.F.A.* Chitin Chemistry. L.: Macmillan Press, 1992. 352 p.
2. *Roberts G.F.A.* // Chitin Newsletter. 1993. N 1. P. 21-23.
3. *Domar A.* // Ibid. 1993. N 2. P. 10-15.
4. *Roberts G.F.A.* // Advances in chitin science. 7th ICCS, 3-5 September 1997, - Lyon, France, 1997. P. 22-31.
5. *Водолажская С.В.* Технология получения белковых гидролизатов из гидробионтов электрохимическим способом для производства микробиологических питательных сред // Дис.... канд. техн. наук. СПб.: СПбГТИ(ТУ), 2001. 137 с.
6. А.с. 665683 СССР. С 08 В 37/98.
7. *Lusena C.V., Rose R.C.* // J. Fish Res. Board Can. 1953. V. 10. P. 521-525.
8. *Madhavan P., Ramachandran Nair K.G.* // Fishery Technol. 1974. V. 11. P. 50-53.
9. *Moorjani M.N., Achuta V., Khasim D.I.* // Food Sci. Technol. 1975. V. 12. P. 187-190.
10. *Плюско Е.А., Нудьга Л.А., Данилов С.И.* // Усп. химии. 1977. XLVI, вып. 8. С. 1470-1487.
11. *Гарсия-Алонсо И., Овьедо-Вега Д., Хенрикес Р.* // Биоорганическая химия. 1984. Т. 10. №9. С. 1253-1255.
12. Pat. 4066735 US C 01 F 11/46.
13. *Muzzarelli R.A.A.*, Chitin. Oxford: Pergamon Press, 1977. 309 p.
14. *Foster A.B., Hackman R.H.* // Nature. 1957. V. 180. P. 40-44.
15. *Леваньков С.В., Купина Н.Н., Блинов Ю.Г.* // Материалы V конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. С. 44-46.
16. *Bao Чи Мин.* // Химические волокна. 1960. № 3. С. 12-15.
17. *Немцев С.В.* // Материалы III Всесоюз. конф. "Совершенствование производства хитина и хитозана из панцирьсодержащих отходов крыля и пути их использования". М.: ВНИРО, 1991. С. 7-15.
18. *Роль Л.Н., Ярочкин А.П., Ерошкина М.Я.* и др. // Тез. докл. I Всесоюз. научн.-техн. конф. по производству и использованию хитина и хитозана из панциря крыля и других ракообразных. Владивосток: Дальрыбвтуз, 1983. С. 40-42.
19. *Розенталь А.Д.* Биотехнологические основы переработки панциря антарктического криля // Дис. ... канд. биол. наук. Л.: ЛТИ им. Ленсовета, 1988. 102 с.
20. *Shimahara K., Ohkouchi K., Ikeda M.* // In chitin and chitosan. Ed. S. Hirano, S. Tokura. The Japanese Society of Chitin and Chitosan. 1982. P. 10-15.
21. *Hall G.M., Reid C.L.* // Chitin and chitosan, the versatile environmental friendly modern materials. Malaysia: UKM. 1995. 47 p.
22. *Cira L.A., Huerta S., Guerrero I.* et al. // Advances in chitin science, EUCHIS-99. Potsdam: 1999. P. 21-27.
23. *Rao M.Sh., Stevens W.F.* Processing parameters in scaling-up of lactobacillus fermentation of shrimp biowaste // Advances in chitin science, 7th ICCS, Lyon: 1997. P. 88-93.
24. *Bautista J., Cremades O., Corpas R.* et al. // Advances in chitin science, EUCHIS-99. Potsdam: 1999. P. 28-33.
25. *Людгерус Л.Л.* // Э.И. ЦНИИТЭИРХ, сер. "Обработка рыбы и морепродуктов". 1982. Вып. 10. 24 с.
26. А.С. 175188 СССР. А 23 I 1/33.
27. Пат. 2059390 РФ. А 23 I 1/33.
28. *Лобанов А.В., Погоскаева Е.Ю., Кузьминский Р.В.* // Тез. докл. VI Всесоюз. научн.-техн. конф. "Электрофизические методы обработки пищевых продуктов и сельскохозяйственного сырья". М., 1989. С. 200.
29. *Суханов Б.П., Королев А.А., Сушенкова О.А.* // Там же. С. 201.
30. *Маматов И.М.* // Там же. С. 202.
31. *Куприна Е.Э., Козлова И.Ю., Тимофеева К.Г.* // Обзорн. информ. Сер. "Обработка рыбы и морепродуктов". М.: ВНИЭРХ, 1999. Вып. 111(1). 60 с.
32. *Бывальцев А.М., Ликумович А.Г., Агаджанян С.И.* // Тез. докл. VI Всесоюз. научн.-техн. конф. "Электрофизические методы обработки пищевых продуктов и сельскохозяйственного сырья". М., 1989. С. 203.
33. *Куприна Е.Э., Красавцев В.Е., Козлова И.Ю.* и др. // Материалы V конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. С. 37-42.
34. *Nashet A.S., Osuga D.T., Lee H.S.* et al. // J. Agric. Food Chem. 1977. N 25. P. 245-273.

35. Kuprina E., Kozlova I., Nianikova C, Pestova O. // Chitin and Chitozan. Poland: Polish Chitin Society, 1999. P. 99-114.
36. Нудьга Л.А., Плиско Е.А., Данилов С.Н. // ЖОХ. 1971. Т. 41. С. 2555-2558.
31. Нудьга Л.А., Баглагина Ю.Г., Петропавловский Г.А. и др. // Высокомол. соед. 1991. Т. 33Б. № 11. С. 864-868.
38. Salmon S., Hudson S.M. // J. Macromolecular Sci / Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics. 1997. V. C37. N 2. P. 199-276.
39. Кайминь И.Ф., Озолия Г.А., Плиско Е.А. // Высокомол. соед. А 1980. Т. 32. № 1. С. 151-156.
40. Mima S., Miya M., Iwamoto R. et al. // In chitin and chitosan. Ed. S. Hirano, S. Tokura. The Japanese Society of Chitin and Chitosan. 1982. P. 21-25.
41. Новиков М.Ю., Орлова Т.А., Веронина И.Е. // Изв. вузов. Пищ. Технол. 1990. № 5. С. 64-67.
42. Прокопов А.А. N-производные хитозана и пленки на их основе // Дис.... канд. техн. наук. Л.: ЛТИ им. Ленсовета, 1985. 146 с.
43. Bough W.A., Sober W.L., Wu A.C.M. et al. // Biotechnol., Bioengin. 1978. V. 20. P. 1931-1943.
44. Suiyanarayana R.Y., Yashodho S.V., Mahendrakak N.S. et al. // Indian J. Technol. 1987. V. 25. N 4. P. 194-196.
45. Mima S., Miya M., Iwamoto R., Yoshikawa S. // J. Appl. Polym. Sci. 1983. V. 26. N 6. P. 1909-1917.
46. А.с. 730695 СССР. С 08 В 37/08.
47. Stevens W.F., Win N.N., Ng Ch.H. et al. // Advances in chitin science, 7th ICCS, Lyon, 1997. P. 40-47.
48. Saito G. // Cellulosechemie. 1940. V. 18. P. 106-110.
49. Иванов М.А., Моисеев Б.А., Покровский Н.И. и др. // Физические и физико-химические аспекты активации целлюлозы. Рига: Зинатне, 1981. С. 39-45.
50. Аким ЭЛ., Наймарк Н.И., Васильев Б.В. // Высокомол. соед. 1971. Т. 13А. № 12. С.2244-2249.
51. Кленкова Н.И. Структура и реакционная способность целлюлозы. Л.: Наука, 1976. 360 с.
52. Tokura S., Nichi N., Joshid J. // Polym. J. 1982. V. 14. N 7. P. 527-536.
53. Нудьга Л.А. Получение хитозана, его производных и исследование их свойств // Дис. ... канд. хим. наук. Л.: ИВС, 1979. 155 с.
54. Любина С.Я., Стрельнина И.А., Нудьга Л.А. // Высокомол. соед. 1983. Т. А25. № 7. С.1467-1472.
55. Матвеева Н.А. Структурные изменения целлюлозы под влиянием активных жидких сред // Дис.... канд. хим. наук. Л.: ИВС, 1972. 135 с.
56. Грунин Ю.Б. // Изв. вузов. Лесной журн., 1985. № 1. С. 88-92.
57. Вихорева Г.А., Гладышев Д.Ю., Базт М.Р. и др. // Cellulose Chem. Techn. 1992. V. 25. N 6. P. 663-674.
58. Вихорева Г.А. Синтез и свойства водорастворимых производных хитина // Дис. ... докт. хим. наук. М.: ВНИИПВ, 1998. 316 с.
59. Роговина С.З., Аكوпова Т.А. // Высокомол. соед. А 1994. Т. 36. № 4. С. 593-600.
60. Аكوпова Т.А. Химические превращения хитина и хитозана в твердом состоянии при механическом воздействии // Дис. ... канд. хим. наук. М.: Ин-т синтетических полимерных материалов. 2001. 120 с.
61. Ulanski P., Wojtasz-Pajak A. et al. // Advances in chitin science, EUCHI-99. Potsdam, 1999. P. 429-435.
62. C. von Sonntag. // Adv. Carboghydr. Chem. Biochem. 1980. V. 37. P. 7-77.
63. Бахур В.М. // Тез. докл. II Междун. симп. "Электрохимическая активация". М., 1999. С. 39-49.
64. Chen R.H., Jiahn S.C. // Advances in chitin science, EUCHIS-99. Potsdam, 1999. P. 361-366.
65. Goycoolea F.M., Higuera-Ciupara I., Hernandez G. et al. // Advances in chitin science, 7th ICCS, Lyon, 1997. P. 78-83.
66. Cid C, Ramos V. // Advances in chitin science, EUCHIS-99, Potsdam, 1999. P. 93-97.
67. Kurita K., Sannan T., Iwakura Y. // Makromol. Chem. 1997. V. 178. P. 3149, 3152.
68. Aiba S. // Int. J. Biol. Macromol. 1991. V. 13. P. 40-45.
69. Ogawa K., Yui T. // Biosci. Biotech. Bioche. 1993. V. 57. P. 1466-1470.
70. Varum M., Anthonsen M.W. // Carbohydr. Res. 1991. V. 211. P. 17-21.
71. Гамзазаде А.М., Скляр А.М., Рогожин С.В. // Высокомол. соед. 1985. Т. А27, № 6. С. 1179-1184.

ТВЕРДОФАЗНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ХИТИНА И ХИТОЗАНА В УСЛОВИЯХ МЕХАНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

С.З. Роговина

Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва

Твердофазные процессы измельчения, смешивания и вальцевания давно и широко используются при переработке полимеров, а также при утилизации полимерных отходов. Долгое время считалось, что в полимерных системах, находящихся в твердом агрегатном состоянии, в отсутствие пластификаторов диффузионные процессы и химические реакции протекают с крайне низкими скоростями, и поэтому твердофазная модификация полимеров не представляла практического интереса. Систематические исследования превращений органических, в том числе полимерных соединений, в условиях совместного воздействия на них высокого давления и сдвиговых деформаций были начаты в 1960-х годах, хотя первые наблюдения были сделаны Бриджменом уже в 1930-1940 гг. Многочисленные исследования последних десятилетий, проведенные под руководством академика Н.С. Ениколопова и продолжаемые его учениками, показали широкие возможности как структурной, так и химической твердофазной модификации полимеров и их смесей в этих условиях, осуществляемой в аппаратах различного типа - экструдерах, наковальнях Бриджмена, смесителях Брабендера и др. Основные результаты этих исследований суммированы в обзорах [1-5].

При деформировании твердых тел возникают различные, богатые энергией, промежуточные соединения, при дальнейшем распаде которых выделяется значительная часть теплоты. Полагают, что если выделение энергии происходит с большей скоростью, чем ее превращение в теплоту, то создаются предпосылки для реализации различных химических превращений. На рис. 1 приведена схема основных путей превращения активных неравновесных состояний, возникающих при механических воздействиях на твердые тела [6, 7].

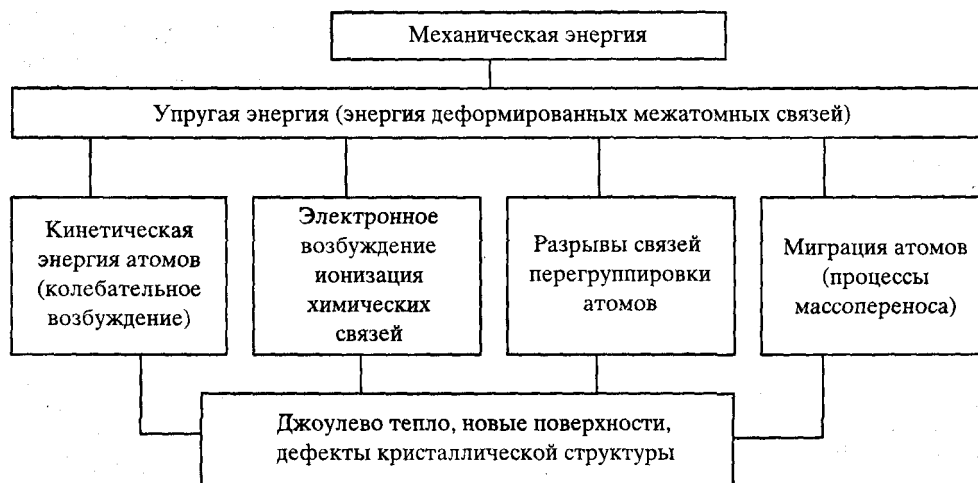


Рис. 1. Пути превращения активных неравновесных состояний в твердых телах

Таблица 1. Работы по твердофазной модификации полисахаридов

Физико-химические процессы	Химические превращения
Измельчение [9–11]	Деацетилирование хитина [15–17]
Смещение [12, 13]	Алкилирование хитина и хитозана [18]
Аморфизация [9]	Этерификация [19, 20]
Активация [11, 14]	Сшивка и другие [21, 22]

Улучшенные экономические и экологические показатели твердофазных технологий по сравнению с традиционными, осуществляемыми в суспензиях или растворах, обусловлены, во-первых, отсутствием жидких дисперсионных сред, в ряде случаев являющихся горючими, токсичными или взрывоопасными, и необходимостью их регенерации, а, во-вторых, высокими скоростями протекания реакций.

В цикле работ, выполненных авторами в области твердофазного модифицирования целлюлозы и хитина, показана возможность получения различных производных этих полисахаридов. Выбор полисахаридов в качестве объектов модифицирования обусловлен тем, что эти биополимеры, выполняющие роль структурных каркасов в растительном мире и мире беспозвоночных животных, широко распространены и постоянно воспроизводятся в природе. Значение целлюлозы и ее производных хорошо известны [8], в то время как хитин из-за его рассеянности в мировом океане долгое время оставался значительно менее изученным и востребованным. Однако ценные свойства этого полисахарида и стремление человека все более полно использовать природные ресурсы позволяют ожидать, что в ближайшем будущем мировой рынок продукции на основе хитина и его производных будет основательно пополнен.

По своей химической природе целлюлоза и хитин представляют собой относительно жесткоцепные неплавкие и нерастворимые в доступных и дешевых растворителях полимеры, поэтому одним из основных вопросов, возникающих при их модификации и переработке в изделия, является поиск способов перевода этих полимеров в набухшее или текучее состояние. Модификация хитина и хитозана в твердом состоянии может рассматриваться как один из экономичных и экологически чистых способов решения указанной проблемы. В табл. 1 представлены некоторые из описанных в литературе примеров твердофазной структурной и химической модификации целлюлозы, хитина и хитозана.

Твердофазное модифицирование целлюлозы подробно рассмотрено в обзоре [23]; в настоящем обзоре приведены основные результаты по твердофазному модифицированию хитина и хитозана.

ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЕ ХИТИНА И СВОЙСТВА ХИТОЗАНА, ПОЛУЧЕННОГО ТВЕРДОФАЗНЫМ СПОСОБОМ

Деацетилирование хитина, приводящее к получению самого известного производного хитина - хитозана, обычно осуществляют обработкой хитина концентрированными (40-50%-ными) растворами едкого натра при температуре 100-150 °С в течение 2-3 ч. Ни исходный хитин, ни хитозан не растворяются в щелочной среде, поэтому реакция протекает в гетерогенных условиях. Большой избыток щелочи (не менее 10 молей NaOH на 1 моль хитина) удаляют промывками водой. Полноту превращения хитина в хитозан характеризуют степенью деацетилирования (СД), т.е. степенью замещения по аминогруппам [24-26].

Таблица 3. Характеристики образцов хитозана, полученных экструзионным способом [15,17]

Условия получения		Характеристики образцов хитозана		
Молярное отношение хитин:NaOH	T, °C	СД	растворимость, %	ММ · 10 ⁻⁴
1:3	120	0,09	5	6,05
1:3	180	0,63	62	4,7
1:3*	180	0,73	70	4,5
1:3	200	0,70	65	4,52
1:5	25	0,33	36	6,72
1:5	100	0,40	39	4,65
1:5	160	0,59	60	7,22
1:5	180	0,81	78	7,75
1:5*	180	0,90	87	6
1:5	200	0,98	90	4,3
1:10	25	0,12	5	4,06
1:10	50	0,27	8,5	4,23
1:10	100	0,43	46	6
1:10	160	0,76	77	7

* Двукратная обработка реакционной смеси.

СД, что позволило сделать вывод об отсутствии побочных реакций при проведении деацетилирования твердофазным способом. Как видно из приведенных в табл. 2 данных, образец ХЗ-2, полученный в экструзионных условиях, практически не отличается от образца ХЗ-1, полученного суспензионным способом по таким важным характеристикам, как растворимость и СД.

Характеристики образцов хитозана, полученных деацетилированием хитина в условиях сдвиговых деформаций при различных начальных соотношениях хитина и щелочи и различных температурах показывают, что пятикратный мольный избыток NaOH достаточен для получения высокодеацетилированного продукта с растворимостью около 90%, хотя традиционный суспензионный метод для получения хитозана с такой степенью деацетилирования предполагает использование не менее, чем 10-кратного избытка щелочи (табл. 3). Таким образом, в предлагаемом методе расход щелочи снижается примерно в два раза.

Существенным фактором, влияющим на выход хитозана, является температура. При мольном соотношении реагентов 1:5 СД увеличивается от 0,39 до 0,98 при повышении температуры от 25 до 200 °C. Температурный интервал 180-200 °C и 5-кратный избыток NaOH, по-видимому, являются оптимальными для получения высокодеацетилированного и высокорастворимого хитозана для данного типа оборудования. Большой избыток щелочи, вероятно, приводит к интенсивному протеканию побочных процессов и снижению выхода хитозана, а в сочетании с высокой температурой вызывает возгорание реакционной смеси.

В работе [27] проанализировано влияние присутствия в реакционной среде небольшого количества (до 30%) воды, которое не изменяет твердого агрегатного состояния реакционной смеси, и сделан вывод о том, что в присутствии воды может быть получен более однородный продукт. Этот вопрос, на наш взгляд, требует дополнительного и более детального исследования.

ММ полученных образцов хитозана составляет 40000-70000. В общем случае уменьшение ММ сильно зависит от температуры и с ее увеличением протекает более интенсивно. Существенное уменьшение степени полимеризации в

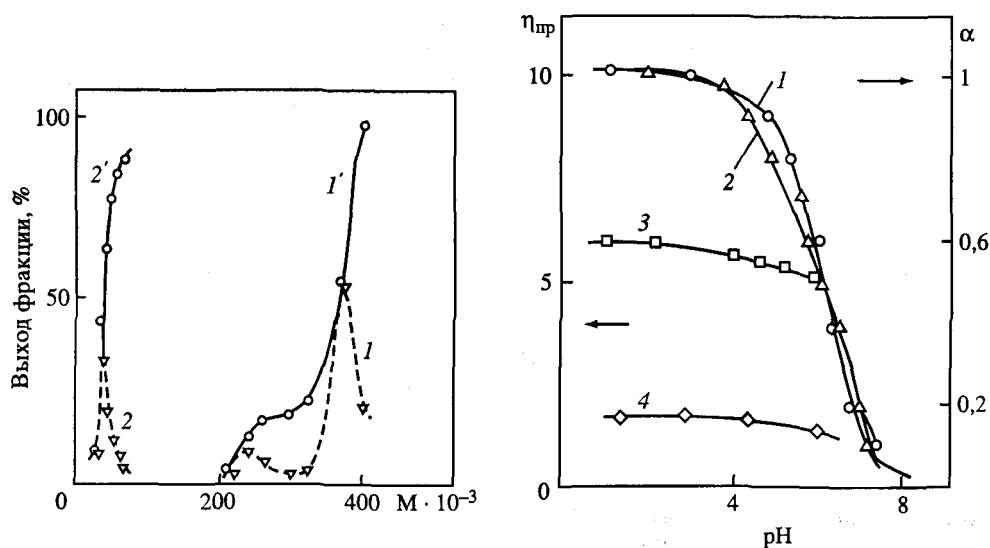


Рис. 2. Дифференциальные (1, 2) и интегральные (1', 2') кривые ММР образцов промышленного хитозана (1, 1') и хитозана, полученного в экструдере (2, 2')

Рис. 3. Степень ионизации α (1, 2) и вязкости η (3, 4) в зависимости от pH 0,05%-ных растворов образцов ХЗ-1 (1, 3) и ХЗ-2 (2, 4) в 0,1 МНС1

условиях совместного воздействия высокого давления и сдвиговых деформаций является закономерностью, обусловленной спецификой указанного типа воздействия. Объяснение характера зависимости ММ хитозана от соотношения хитин: NaOH и температуры реакции также требует проведения дополнительного исследования.

Фракционирование методом дробного осаждения показало, что ХЗ-1, полученный суспензионным способом, характеризуется бимодальным ММР, а твердофазный ХЗ-2 является более однородным и имеет унимодальное ММР (рис. 2). Аналогичная закономерность изменения ММР обнаружена и в ходе экструзионного размола высокомолекулярного суспензионного хитозана [9]. По-видимому, механодеструкция полимера в условиях сдвиговых деформаций не носит избирательного характера, что приводит к получению низкомолекулярного продукта с более узким ММР.

Значительное снижение ММ хитозана, полученного твердофазным способом, очевидно, не является следствием только механической деструкции. Возможно, что деструкция макромолекул при деацетилировании связана с термоокислительными процессами, ускоряющимися при взаимодействии полисахаридов со щелочами. Отметим, что снижение молекулярной массы полимера может оказаться полезным и даже необходимым для ряда его практических применений, поскольку приводит к уменьшению токсичности инъекционных полимерных лекарственных препаратов, повышению растворимости полимера и снижению вязкости его растворов, а также другим положительным эффектам [28]. Именно поэтому разработке условий получения хитозана с пониженной молекулярной массой уделяют большое внимание [29-32].

Как и следовало ожидать, вязкость растворов ХЗ-2 ниже вязкости растворов ХЗ-1, однако характер зависимости вязкости от pH у обоих образцов одинаков: в интервале pH 1-6 при изменении α от 1 до 0,5 падение вязкости растворов не превышает 10% (рис. 3 кривые 3 и 4), что обусловлено относительно вы-

сокой жесткостью макромолекул этого полиэлектролита. Данные показывают (рис. 3), что выпадение полимера в осадок в сравниваемых образцах также происходит при одном и том же значении рН. При концентрации хитозана 0,05% и ионной силе 0,1 моль/л этот показатель равен $6,1 \pm 0,2$, что соответствует величине $\alpha - 0,5$. Зависимости степени ионизации аминогрупп α от показателя рН раствора для образцов ХЗ-1 и ХЗ-2, представленные на рис. 3 (кривые 1 и 2), имеют абсолютно идентичный характер, следовательно, и величины рК ионизационных групп этих образцов одинаковы.

Особый интерес представляло изучение характеристик надмолекулярной структуры хитозана, полученного твердофазным способом, поскольку снижение

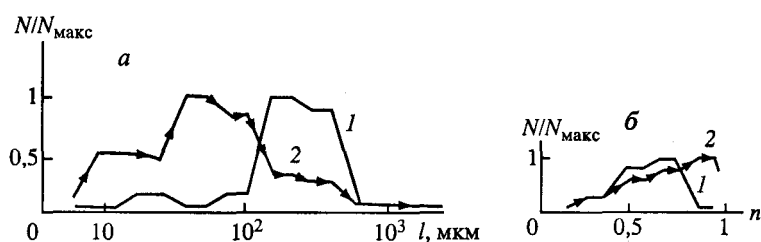


Рис. 4. Гистограммы распределения по размерам частиц (а) и фактору формы частиц (б) для промышленного (1) и экструзионного (2) хитозана [16]

ММ способствует повышению подвижности и формированию более упорядоченной структуры, а глубокий размол, наоборот, разрушает ее. Данные рентгеноструктурного анализа показали, что, несмотря на аморфизацию полимера при экструзионном твердофазном деацетилировании, полученный хитозан характеризуется также сравнительно высокой степенью кристалличности (55%). По-видимому, это является следствием протекания процесса рекристаллизации в ходе промывок хитозана водой от избытка щелочи. Особенностью структуры ХЗ-2 является большая степень дисперсности кристаллитов. Так размеры кристаллитов, рассчитанные из наиболее сильного рефлекса при $2\theta = 20,1^\circ$, составляют 3,3-3,8 и 2,5-3,0 нм для ХЗ-1 и ХЗ-2, соответственно. Малые размеры кристаллитов обуславливают большую полуширину максимумов на дифрактограммах, вследствие чего дифрактограмма ХЗ-2 имеет вид наиболее аморфизованного полимера [9].

Как и следовало ожидать, степень дисперсности образцов хитозана, полученных суспензионным и твердофазным способами, существенно различаются между собой. Как видно из рис. 4, образец ХЗ-1 имеет более крупные (130-500 мкм) и асимметричные частицы, в то время как у экструзионно полученного образца ХЗ-2 частицы мельче (10-130 мкм), более однородны по размерам и имеют круглую форму. Закономерно, что низкомолекулярный, высокодисперсный и аморфизованный ХЗ-2 обладает большей сорбционной способностью по отношению к парам воды [33] и другим сорбатам, например, ионам металлов [34].

Пленки, сформованные из растворов хитозана, полученного твердофазным способом, визуально не отличаются от пленок, сформованных из растворов высокомолекулярного хитозана. Они характеризуются отсутствием неоднородностей и в сухом виде прозрачны, причем их механическая прочность ниже, чем прочность пленок из высокомолекулярного суспензионного хитозана. Так, разрывное напряжение σ_p находится на уровне 80-100 МПа, разрывное удлинение - 25-28% (против 130-150 МПа и 30-35%, соответственно) [35], однако этого вполне достаточно для использования их в качестве разделительных мембран или пленочных перевязочных средств.

Таким образом, твердофазный способ получения хитозана включает в себя одновременное измельчение, аморфизацию и снижение ММ полимера. Способ отличается пониженным расходом реагентов (едкого натра и воды для промывки продукта), а также существенным сокращением продолжительности процесса.

ХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ ХИТОЗАНА

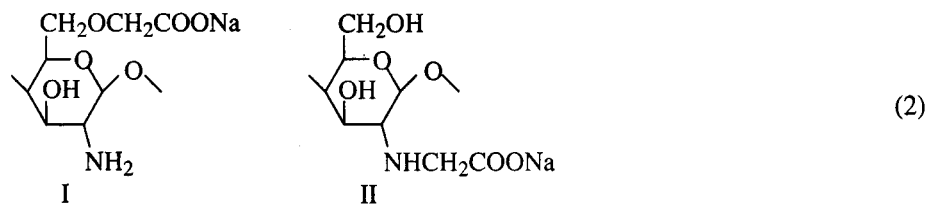
Химические превращения хитина и хитозана в течение последних десятилетий вызывают к себе повышенный интерес, что связано со сходством этих полисахаридов с целлюлозой. Наличие в элементарном звене хитина и хитозана гидроксильных групп, как и у целлюлозы, а в случае хитозана также и аминогрупп, позволяет получение производных, аналогичных соответствующим производным целлюлозы. Среди них можно отметить простые (например, карбоксиметилловые) и сложные эфиры.

Твердофазная модификация хитозана в условиях совместного воздействия высокого давления и сдвиговых деформаций имеет те же преимущества перед существующими способами модификации, что и процесс твердофазного получения хитозана. Кроме того, при модификации хитозана в гетерогенных (суспензионных) средах обычно предварительно проводят стадию активации полимера размолом, пересаживанием или набуханием инклюдированием в жидких органических реагентах или в водно-кислотных растворах, в то время как предлагаемый способ позволяет объединить стадию активации с непосредственно стадией химического превращения.

КАРБОКСИМЕТИЛИРОВАНИЕ ХИТИНА И ХИТОЗАНА

Перспективными для практического применения являются продукты алкилирования, в частности, карбоксиметилирования хитина и хитозана. Эти производные растворяются в воде, обладают способностью к волокно- и пленкообразованию, к ионному обмену и комплексообразованию, а также проявляют физиологическую активность. В качестве карбоксиметилирующего агента обычно используют монохлоруксусную кислоту (МХУК) или ее натриевую соль, которыми обрабатывают предварительно активированный полимер в присутствии избытка едкого натра в водной или водно-спиртовой среде при повышенных температурах.

Карбоксиметилирование хитина в щелочной среде сопровождается частичным дезацетилированием полимера, и поэтому получаемый продукт является смешанным карбоксиметилированным производным хитина и хитозана. При карбоксиметилировании хитозана может происходить образование как О- (I), так и N-замещенного (II) карбоксиметилхитозана (КМХ)



Простой и оригинальный способ получения избирательно N-замещенного КМХ заключается в получении на первой стадии N-карбоксиметилиденхитозана с последующим восстановлением его цианборгидридом натрия [36]. Для получе-

Таблица 4. Сравнительные данные о строении образцов КМХ
 $[C_6H_7O_2(OH)_{2-x_1}(OCH_2COONa)_{x_1}(NHCH_2COONa)_{x_2}(NH_2)_y(NHCOCH_3)_z]$

Метод	Содержание, %					СЗ по группам			
	C	N _{общ}	N _{ацет}	N _{амин}	COONa	X1	X2	y	z
Твердофазный*	41,8	5,7	1,9	2,8	19,4	0,53	0,15	0,46	0,29
Суспензионный**	41,2	5,4	1,2	3,2	21,4	0,55	0,18	0,52	0,20

* Молярное соотношение хитин: NaOH:МХУК = 1:5,25:2,5.

** Молярное соотношение хитозан: NaOH:МХУК = 1:4,2:2.

Таблица 5. Влияние условий проведения твердофазной реакции на свойства получаемых карбоксиметилированных производных

Молярное соотношение поли- мер:NaOH:МХУК	Температура, °C		Раствори- мость в воде, %	ММ · 10 ⁻³ растворимой фракции	СЗ по кар- боксиметиль- ным группам (X1 + X2)	СЗ по аце- тильным группам (z)
	стадия 1	стадия 2				
1:4,25:2	—	80	48	—	0,90	0,10
1:2,6:2,3	—	80	20	47	0,40	0,62
1:4,8:2,3	80	120	30	5	0,51	0,32
1:5,25:2,5	100	100	70	82	0,70	0,35
1:5,25:2,5	200	100	68	6	0,68	0,29
1:8,4:2,9	120	120	65	70	1,02	0,25
1:8,4:4,0	80	60	70	90	1,40	0,45
1:4,4:4,0	100	100	58	45	0,87	0,27
1:2,6:2,3	100	100	46	62	0,65	0,45

ния избирательно О-замещенного карбоксиметилхитозана разработан способ, основанный на алкилировании хитозана после его переосаждения и защиты аминогрупп действием салицилового альдегида [37]. Полученный таким способом КМХ содержит карбоксильные и свободные первичные аминогруппы и является типичным полиамфолитом, растворимым в кислых и щелочных водных средах и нерастворимым в нейтральных. К недостаткам указанного способа относятся большой расход алкилирующего агента, сложность и длительность процесса в связи с необходимостью блокирования и последующего деблокирования аминогрупп. О-КМХ получают также деацетилизацией карбоксиметилхитина в водном 10%-ном растворе щелочи [38]. В работе [39] показано преимущество использования алкилирующего реагента (МХУК в изопропиловом спирте) для активации хитозана, т.е. изменения порядка обработки, используемого при синтезе карбоксиметилцеллюлозы, на обратный - вначале вносят МХУК, а затем щелочь. Такой способ проведения синтеза обеспечивает получение высокозамещенных и полностью растворимых продуктов при сокращении расхода реагентов.

Получение карбоксиметилэфиров хитозана в твердой фазе [18, 35, 40] в условиях сдвиговых деформаций дает возможность совместить стадии активации и непосредственно химической реакции при значительно меньшем расходе реагентов (едкого натра, органических растворителей и воды). Получение карбоксиметилхитозана в экструдере проводили при различных соотношениях полимера, NaOH и МХУК, в интервале температур 60—120 °C. Учитывая возможность протекания процесса деацетилирования, в качестве исходного полимера использовали и хитин. В табл. 4 приведены сравнительные характеристики образцов КМХ, полученных твердофазным и суспензионным методами, а в табл. 5

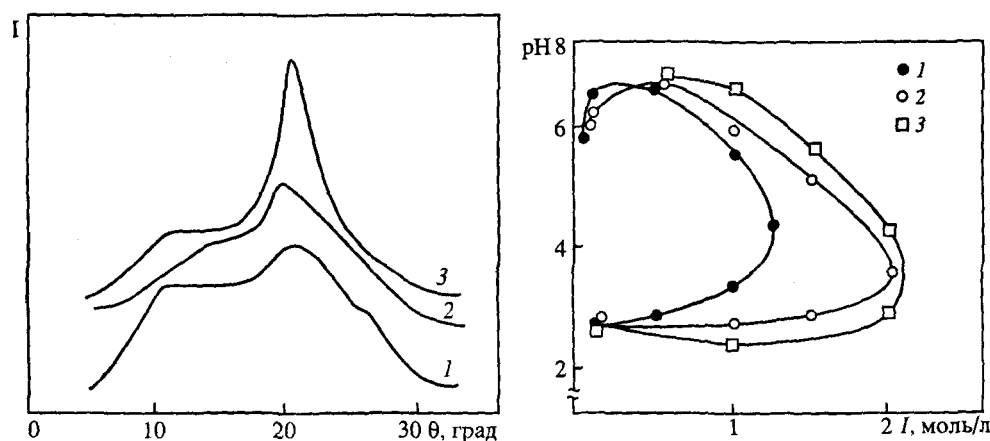
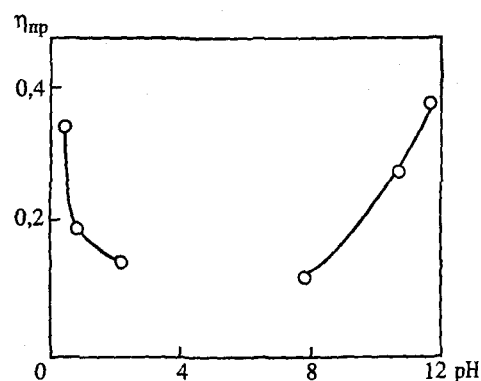


Рис. 5. Дифрактограммы образцов карбоксиметилловых эфиров хитозана (1, 2) и целлюлозы (3)

1 – образец получен суспензионным методом ($СЗ = 1,1$); 2, 3 – образцы получены твердофазным экструзионным методом ($СЗ = 0,7$ и $0,5$, соответственно) [18]

Рис. 6. Границы фазового разделения в системе водно-солевой раствор – КМХ для образцов с $СЗ = 0,7$ и $ММ \cdot 10^{-3} = 6$ (1), 40 (2) и 82 (3) [18]

Рис. 7. Влияние pH на приведенную вязкость 0,15%-ного раствора КМХ $СЗ = 0,7$; $ММ = 6 \cdot 10^3$ [18]



влияние условий проведения реакции на свойства получаемых продуктов. Близкие значения величин $СЗ$ по всем функциональным группам ($X1$ и $X2$ - O - и N -карбоксиметильным, соответственно, y - свободным аминогруппам, z - N -ацетильным), рассчитанных на основании экспериментально определенных данных об элементном составе для образцов КМХ, полученных твердофазным и суспензионным способами (табл. 4), свидетельствуют о практически полной аналогии их строения.

Необходимо отметить, что оба образца являются не избирательно, но преимущественно замещенными по гидроксильным группам элементарных звеньев макромолекул, поскольку $X1$ существенно больше $X2$. Обнаружено также, что $ММ$ полученных продуктов резко снижается с увеличением температуры процесса.

Судя по данным табл. 5, с увеличением содержания МХУК и щелочи возрастает степень замещения по карбоксиметильным группам, достигая максимального значения 1,4. Введение МХУК в виде раствора в изопропиловом спирте, сохраняющем реакционную смесь в твердом состоянии, способствует значительному повышению растворимости конечных продуктов, так как обеспечивает более равномерное смешение компонентов. При использовании в качестве алкилирующего реагента натриевой соли МХУК расход едкого натра сокращается, однако при этом существенно снижается выход растворимого КМХ.

Рентгеноструктурные исследования образцов КМХ, полученных суспензионным и экструзионным методами, и карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), полу-

ченной экструзионным методом, показали наряду с имеющимися аналогиями некоторые различия в их структуре (рис. 5).

Для дифрактограмм всех трех образцов характерно наличие широкого рефлекса при $2\theta = 20^\circ$ и широкого плато в области $2\theta = 10-15^\circ$. Такого рода дифрактограммы с небольшим количеством широких рефлексов свойственны малоупорядоченным структурам с невысокой степенью кристалличности. Более четко выраженный максимум на дифрактограмме КМЦ, очевидно, связан с меньшей степенью карбоксиметилирования этого образца по сравнению с производными хитозана, т.е. степень кристалличности полученных образцов понижается с повышением степени замещения. Не исключено также, что производные целлюлозы легче восстанавливают (регенерируют) свою кристаллическую структуру в ходе отмывки полярными растворителями.

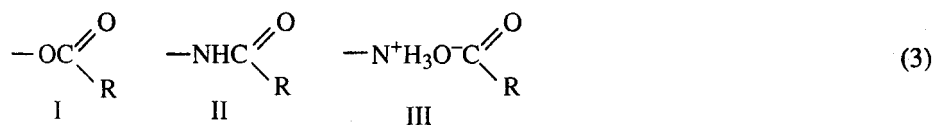
Растворимость КМХ в воде и вязкостные свойства его растворов зависят от величины pH и ионной силы, что свидетельствует о его полиамфолитной природе. Представляло интерес выяснить, сохраняется ли эта зависимость для низкомолекулярных образцов КМХ. На рис. 6 представлены границы фазового разделения в системе КМХ-водно-солевой раствор для образцов, полученных разными способами и различающихся по ММ.

Как видно из приведенных на рис. 7 данных, даже образец с $ММ = 6 \cdot 10^3$ в интервале pH 3 - 6,5, где перекрываются области ионизации карбоксильных и аминогрупп и понижается суммарный заряд и степень гидратации, выпадает в осадок. У более высокомолекулярных образцов КМХ область, отвечающая совокупности изоэлектрических точек, закономерно расширяется, и их растворимость ухудшается. Понижение суммарного заряда полиамфолита по мере приближения к границам указанной области в разбавленных растворах сопровождается уменьшением степени асимметрии макромолекул, о чем свидетельствует уменьшение вязкости раствора (рис. 7).

МОДИФИКАЦИЯ ХИТОЗАНА КАРБОНОВЫМИ КИСЛОТАМИ И АНГИДРИДАМИ

Как указывалось выше, полиоснование хитозан не растворяется в воде при $pH > 6$, но хорошо растворяется в подкисленных средах, в частности, в растворах одноосновных кислот (муравьиная, уксусная, соляная), в которых аминогруппы полимера переходят в ионизованное и гидратированное состояние. В растворах двухосновных кислот (серной, щавелевой) протонирование аминогрупп и солеобразование приводит к сшивке макромолекул. Изучение структуры солей хитозана и неорганических кислот (серной, азотной и галогенсодержащих) методом рентгенографии проведено, например, в работе [41]. Выделенный из раствора (осаждением или лиофилизацией) и высушенный хитозан в солевой форме сохраняет растворимость в воде (так называемый водорастворимый хитозан). Его используют в косметических изделиях и сельском хозяйстве.

Обычно производные хитозана и кислот получают в жидких средах [42-45]. Образующиеся при этом взаимодействия продукты имеют сложное строение, заместители в них могут быть присоединены как к гидроксильным, так и к аминогруппам полимера сложноэфирными (I), амидными (II) и солевыми (III) связями



Возможность механохимического взаимодействия хитозана с твердыми кислотами - янтарной, малеиновой и яблочной - при их совместном твердофазном размоле показана в работе [22]. К сожалению, авторами не приведены данные о составе и химическом строении, а также растворимости и других свойствах полученных продуктов, тем не менее, в ней указано, что они могут быть основой для приготовления агрохимических препаратов, сорбентов, флокулянтов.

В работах [19, 20] проведено более детальное исследование закономерностей протекания твердофазного взаимодействия хитозана с некоторыми кислотами и ангидридами, находящимися при нормальных условиях в твердом агрегатном состоянии. В экструдере в указанных выше условиях было осуществлено взаимодействие хитозана с твердыми органическими двухосновными кислотами и ангидридами (щавелевая (ЩК), малоновая (МК), янтарная (ЯК) кислоты, малеиновый (МА), янтарный (ЯА) и фталевый (ФА) ангидриды), а также с высшей жирной (стеариновой) кислотой (СК).

Модификация хитозана стеариновой кислотой и другими ПАВ позволяет варьировать гидрофильно-липофильный баланс повышать его поверхностную активность и эмульгирующую способность. Эти важные свойства хитозана и его производных используются в качестве структурообразующих и стабилизирующих добавок в пищевые и косметические изделия. Модификация хитозана бифункциональными карбонилсодержащими соединениями должна приводить к образованию как циклических продуктов, так и к его частичной сшивке за счет межмолекулярного взаимодействия.

Для установления возможности образования сложноэфирных связей в условиях твердофазной модификации исследовали взаимодействие фталевого ангидрида с целлюлозой - полисахаридом, имеющим, в отличие от хитозана, лишь один тип функциональных групп - гидроксильные группы. Изучение полученных продуктов методом ИК-спектроскопии показало наличие в их спектрах слабых характеристических полос, соответствующих поглощению бензольного кольца при 1610 см^{-1} , карбонильных групп при $1730, 1420\text{ см}^{-1}$ и ароматических эфиров при 1250 см^{-1} . Данные элементного анализа, в частности, о содержании углерода в исходной (43,98%) и модифицированной (49,67%) целлюлозе указывают на повышенное содержание углерода, однако степень превращения реагентов в исследованной реакции О-ацилирования не превышала 10%.

В отличие от производного целлюлозы, ИК-спектры модифицированного фталевым и другими ангидридами хитозана содержат сильные характеристические полосы поглощения карбоксильных групп ($1740\text{-}1710\text{ см}^{-1}$ и 1550 см^{-1}) и бензольного цикла (1600 см^{-1}). В случае модификации хитозана малоновой и янтарной кислотами, а также малеиновым ангидридом появляются характеристические полосы поглощения СН при 2950 и $720\text{-}700\text{ см}^{-1}$ (рис. 8, кривые 2-4).

В табл. 6 приведены характеристики некоторых продуктов взаимодействия хитозана с карбоновыми кислотами и ангидридами в условиях сдвиговых деформаций в интервале температур $25\text{-}100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Исходные вещества в указанном температурном интервале в обычных условиях друг с другом не взаимодействуют и не претерпевают никаких изменений. Данные табл. 6 показывают, что при избытке реагента присоединение идет по смешанному механизму, но преимущественно солевыми связями. Количество присоединяемых заместителей возрастает с увеличением избытка реагента и температуры. Повышение температуры оказывает наибольшее влияние на образование ковалентных связей. При этом амидные связи образуются лишь при существенном избытке реагента, о чем свидетельствует уменьшение соотношения $N_{\text{ам}}/N_{\text{общ}}$ в продуктах взаимодействия хитозана с ФА и ЯА, полученных при $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Характерной чертой этого про-

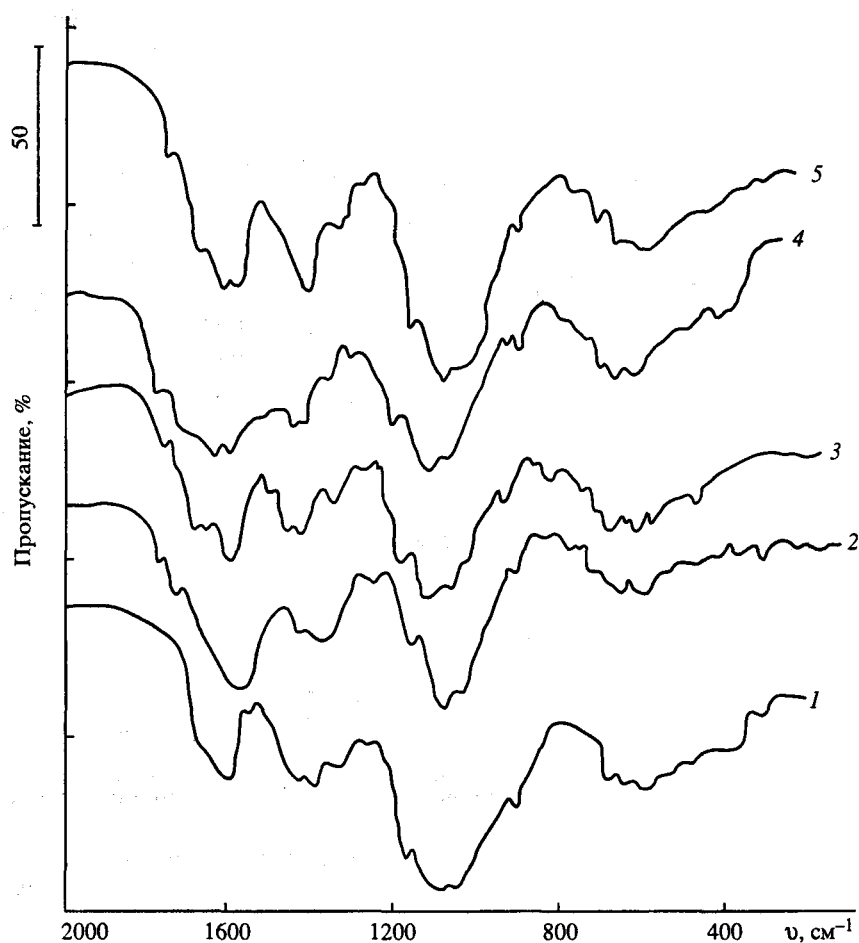


Рис. 8. Фрагменты ИК-спектров

/ - хитозан; 2-5 - продукты взаимодействия хитозана с малоновой (2), янтарной (3) кислотами и малеиновым (4) и фталевым (5) ангидридами

цесса является его зависимость от силы кислот (менее сильные высшие полимергомологи менее реакционноспособны) и нечувствительность к температуре реакции (50-100 °С), что свидетельствует об аналогии с протеканием указанных реакций в жидкой фазе и, следовательно, об отсутствии диффузионных ограничений для них в твердой фазе.

В случае N- и O-ацилирования хитозана ангидридами дикарбоновых кислот реакция ускоряется при повышении температуры и слабо зависит от природы ангидрида [20]. Неожиданная активность малеинового ангидрида по сравнению с другими ангидридами оказалась настолько высока, что взаимодействие хитозана с ним протекает количественно как при комнатной, так и при повышенной температурах. В условиях твердофазного проведения реакции при равенстве температуры и начального мольного соотношения реагирующих компонентов реакционная способность в ряду двухосновных карбоновых кислот и ангидридов изменяется следующим образом: щавелевая кислота > малоновая > янтарная; малеиновый ангидрид > янтарный > фталевый. Степень полезного использования наиболее слабой янтарной кислоты не

Таблица 6. Характеристики продуктов взаимодействия хитозана с карбонилсодержащими соединениями [19, 20]

Реагент	Мольный избыток реагента	T, °C	C/N	N _{ам} /N _{общ}	Степень замещения			Растворимость в 0,1M HCl, %
					суммарная	ионная	ковалентная	
Хитозан	–	–	5,56	0,90	–	–	–	100
Стеариновая кислота	1,5	25	10,7	–	0,16	0,16	–	83
	1,5	50	11,3	–	0,22	0,22	–	68
Щавелевая кислота	1,5	25	7,82	–	0,42	0,34	0,08	98
	1,5	50	7,85	–	0,43	0,23	0,2	94
Малоновая кислота	1,0	50	7,57	–	0,20	0,20	–	96
	1,5	50	8,22	–	0,40	0,36	0,04	94
	1,5	100	8,42	–	0,46	0,33	0,13	74
Янтарная кислота	1,5	50	7,33	–	0,10	0,05	0,05	60
	1,5	100	7,47	–	0,13	0,12	0,01	40
Малеиновый ангидрид	0,25	25	7,33	0,90	0,25	0,07	0,18	58
	0,5	50	8,30	0,81	0,50	0,36	0,14	31
Янтарный ангидрид	0,25	50	6,93	0,89	0,16	0,08	0,08	81
	0,5	100	8,19	0,59	0,47	0,27	0,2	40
Фталевый ангидрид	0,5	100	7,96	0,89	0,21	0,07	0,14	59
	1	50	8,86	0,90	0,32	0,32	–	93
	1	100	9,95	0,53	0,45	0,23	0,22	33

превышает 10%, а ЯА, как и следовало ожидать, обладает значительно большей реакционной способностью.

Взаимодействие хитозана с высшей жирной кислотой (стеариновой) протекает по ионному механизму, а степень замещения полученных при повышенной температуре стеаратов хитозана достигает 0,22. Гидрофобизация хитозана стеариновой кислотой подтверждается также частичной потерей им растворимости в разбавленных кислотах (~ на 60% в 2%-ной уксусной кислоте и на 30% в соляной). Нерастворимая и, очевидно, наиболее гидрофобизированная фракция полученных продуктов не растворяется и в таких органических растворителях как спирты, гексан, хлороформ, ацетон.

Таким образом, модификация хитозана карбоновыми кислотами и ангидридами не придала им способности растворяться в воде и органических растворителях, что можно было бы ожидать, учитывая существенное нарушение регулярности строения и введение в продукты гидрофильных карбоксильных и гидрофобных металльных групп. По-видимому, полученные производные хитозана характеризуются гидрофильно-липофильным балансом, который уже не позволяет им полностью растворяться в водных кислых средах, но одновременно еще не придает способности растворяться в органических растворителях. Значительное снижение растворимости некоторых полученных продуктов в кислых водных средах связано, очевидно, с образованием как внутримолекулярных, так и межмолекулярных сшивок.

Полученные производные хитозана и дикарбоновых кислот и их ангидридов обладают полиамфолитной природой и могут быть использованы как селективные сорбенты и носители аминокислот, ферментов и других биологически активных веществ, а растворимые фракции гидрофобизованного стеариновой кислотой хитозана в качестве эмульгаторов и стабилизаторов пен и эмульсий.

Продemonстрированная возможность твердофазной модификации хитозана дикарбоновыми кислотами и их ангидридами в условиях совместного воздействия давления и сдвиговых деформаций, является еще одним подтверждением перспективности использования этого метода для дальнейшей химической модификации хитозана. Вместе с тем необходимо еще раз отметить, что наибольший практический интерес представляет, на наш взгляд, твердофазный способ получения самого хитозана. Проводимая в настоящее время авторами его дальнейшая оптимизация, в частности, исследование влияния присутствия в реакционной среде антиоксидантов и других добавок, позволяет более тонко управлять строением и свойствами получаемого хитозана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ениколопов Н.С. Усп. химии. 1991. Т. 60. № 3. С. 586-594.
2. Zharov A.L. // High-Pressure Chemistry and Physics of Polymers / Ed. by A.L. Kovarskii. L.: CRS Press. 1994. P. 268-301.
3. Жорин В.А. // Высокомол. соед. 1994. Т. А36. № 4. С. 559-579.
4. Вольфсон С.А., Никольский ВТ. // Там же. 1994. Т. Б36. № 6. С. 1040-1056.
5. Прут Э.В., Зеленецкий А.Н. // Усп. химии. 2001. Т. 70. № 2. С. 72-87.
6. Барамбойм Н.К. Механохимия высокомолекулярных соединений. М.: Химия. 1978. 384 с.
7. Бутягин П.Ю. // Усп. химии. 1994. Т. 63. № 12. С. 1031-1043.
8. Роговина З.А. Химия целлюлозы. М.: Химия, 1972. 518 с.
9. Аكوпова Т.А., Роговина С.З., Горбачева И.Н., Вихорева Г.А. // Высокомол. соед. 1996. Т. А38. № 2. С. 263-268.
10. Албулов А.И., Комаров Б.А., Самуйленко Б.А. и др. // Материалы V конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО. 1999. С. 7-8.
11. Пат. 1252373 Великобритании. А61К27/00.
12. Роговина С.З., Аكوпова Т.А., Вихорева Г.А. и др. // Высокомол. соед. 2000. Т. А42. № 1. С. 10-15.
13. Зеленецкий А.Н., Аكوпова Т.А., Кильдеева Н.Р. и др. Исследование композиций фермент-полисахарид, полученных с использованием твердофазного смешения под давлением // Высокомол. соед. (В печати).
14. Горбачева И.Н. Разработка способа получения водорастворимых сульфатов хитина и хитозана и исследование их свойств // Дис. ... канд. хим. наук. М: МТИ. 1989. 236 с.
15. Аكوпова Т.А., Роговина С.З., Вихорева Г.А. и др. // Высокомол. соед. 1991. Т. Б32. № 10. С. 735-737.
16. Вихорева Г.А., Роговина С.З., Аكوпова Т.А. и др. // Там же. 1996. Т. Б38. № 10. С. 1781-1785.
17. Пат. 176049 РФ. С08В37/08.
18. Аكوпова Т.А., Роговина С.З., Вихорева Г.А., Зеленецкий С.И. // Высокомол. соед. 1995. Т. Б37. № 10. С. 1797-1801.
19. Роговина С.З., Вихорева Г.А., Аكوпова Т.А., Горбачева И.Н. // Там же. 1997. Т. А39. № 6. С. 941-946.
20. Роговина С.З., Аكوпова Т.А., Вихорева Г.А. и др. // Там же. 1998. Т. А40. № 8. С. 1389-1393.
21. Роговина С.З., Аكوпова Т.А., Вихорева Г.А. и др. // Там же. 2000. Т. А42. № 9. С. 1489-1492.
22. Гамзазаде А.И., Голиков Н.А., Савченко В.П. и др. // Докл. V Всерос. конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО. 1999. С. 29-30.
23. Роговина С.З., Аكوпова Т.А. // Высокомол. соед. 1994. Т. А36. № 4. С. 539-600.
24. Mima S., Miya M., Iwatoto R., Yoshikawa S. // J. Appl. Polym. Sci. 1983. V. 28. P. 1909-1917.
25. Kurita K., Kamiya M., Niskimura S. // Carbohydr. Polym. 1991. V. 16. P. 83-92.
26. Pelletier A., Lemire A., Sygusch J. et al. // Biotech. & Bioeng. 1990. V. 36. P. 310-318.
27. Зеленецкий С.И. // Пластич. массы. 1998. № 1. С. 29-33.
28. Марквичева Е.А., Купцова С., Вихорева Г.А. и др. Хитозан - перспективный полимер для микрокапсулирования животных клеток и их использования в биомедицине // Материалы

VI Междунар. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 2001. С. 212-216.

29. Hasegawa M., Isogai A., Onabe F. // Carbohydr. Polym. 1993. V. 20. N 4. P. 279-283.
30. Tanioka S., Matsui Y., hie T. et al. // Biosci. Biotech. Biochem. 1996. V. 60. N 12. P. 2001-2004.
31. Chen R.H., Chang J.R., Shyar J.S. // Carbohydr. Res. 1997. V. 29. N 4. P. 287-294.
32. Ильина А.В., Татаринова Н.Ю., Варламов В.П., Албулов А.И. // Материалы V конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО. 1999. С. 270-273.
33. Вихорева Г.В., Роговина С.З., Пчелко ОМ., Гальбрайт Л.С. // Высокомогл. соед. 2001. Т. В43. № 6. С. 1079-1084.
34. Вихорева Г.А., Роговина С.З., Шаблыкова Е.А., Мочалова Т.В. //Тез. докл. Всерос. науч.-тех. конф. "Текстиль-2001". М.: МГТУ. 2001. С. 18-19.
35. Аконова Т.А. Химические превращения хитина и хитозана в твердом состоянии при механическом воздействии // Дис. ... канд. хим. наук. М.: ИСПМ. 2001. 120 с.
36. Muzzarelli R.A.A., Tanfani F., Emanuelli M., Mariotti S. // Carbohydr. Res. 1982. V. 107. P. 199-214.
37. Нудьга Л.А., Плиско Е.А., Данилов С.Н. // ЖОХ. 1973. Т. 43. № 12. С. 2752-2756.
38. Desbriers J., Rinaudo M. // Absrt. Pap. American Chem. Soc. 1997. V. 213. N 4. P. 120-CELL.
39. Вихорева Г.А., Гладышев Д.Ю., Баев М.Р., Барков В.В. // Cellulose Chem. Techn. 1992. V. 26. N 6. P. 663-674.
40. Пат. 2044741 РФ. C08B37/08.
41. Ogawa K., Saeko N. // Carbohydr. Res. 1987. V. 16. P. 425^33.
42. А.с. 802290 СССР. C08B37/08.
43. А.с. 325234 СССР. C08B37/08.
44. Argulles-Monal W., Penche-Corvas C. // Makromol. Chem. Rapid Commun. 1993. V. 14. N 12. P. 735-740.
45. Demargerandre S., Domard A. // Carbohydr. Polym. 1994. V. 29. N 3. P. 211-219.
46. Rogovina S.Z., Vikhoreva G.A., Akopova T.A., Gorbacheva I.N. //J. Appl. Polym. Sci. 2000. V. 76. P. 616-622.

ЭНЗИМОЛОГИЯ СИНТЕЗА И ДЕГРАДАЦИИ ХИТИНА И ХИТОЗАНА

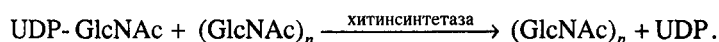
А.В. Ильина, В.П. Варламов

Центр "Биоинженерия" РАН, Москва
varlamov@biengi.ac.ru

Хитин и хитозан являются природными биополимерами и, безусловно, их биосинтез, получение, модификация и деградация связаны с ферментативными превращениями. (Важность этих научных направлений подчеркивает факт регулярного проведения в Италии Международных симпозиумов "Chitin Enzymology". В мае 2001 года там состоялся 3 симпозиум на эту тему*.) Данное научное направление условно можно разделить на следующие разделы: 1) ферменты синтеза хитина-хитинсинтетазы; 2) пути деградации хитина в природе; 3) механизм действия гликозил-гидролаз и их характеристика; 4) ферментативный гидролиз хитина и хитозана; 5) ферменты других классов, гидролизующие хитин и хитозан; 6) иммобилизованные ферменты.

ФЕРМЕНТЫ СИНТЕЗА ХИТИНА - ХИТИНСИНТЕАЗЫ

Хитин является внеклеточным биополимером эукариотов, отсутствует в растениях и у млекопитающих, активно продуцируется большинством грибов, где является главным структурным компонентом клеточной стенки (КС). Согласно общепринятой модели, хитин синтезируется внутри цитоплазматической мембраны из активного предшественника уридин-5'-дифосфата-N-ацетил-D-глюкозамина, в присутствии биокатализатора - хитинсинтетазы [(хитин-4-β-ацетил-глюкозаминилтрансфераза (КФ 2.4.1.16)], а далее "выталкивается" на внешнюю сторону мембраны [1-3]. Схематично синтез хитина можно представить следующим образом:



Все попытки по выделению и очистке этого белка пока не увенчались успехом. Это, вероятно, объясняется тем, что хитинсинтетаза трансмембранный бе-

Книги: Chitin Enzymology, 1993, 1996, 2001 /Под. ред. проф. R.A.A. Muzzareli имеются в правлении Российского Хитинового Общества.

лок, получаемые белковые фракции содержат большое количество связанных липидов. Достигнуты успехи по выделению генов хитинсинтетазы из ряда микроорганизмов. В настоящее время хорошо описаны и достаточно изучены три разных гена хитин-синтетазы из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, которые выполняют разные функции в процессе морфогенеза (формообразования).

В 1986 г. Bulawa с коллегами [4, 5] установили структуру генов дрожжей *S. cerevisiae*. По их данным ген хитинсинтетазы (CHS1), состоит из трех доменов: первый, кодирует белок, состоящий из 300 аминокислотных остатков, сильно гидрофильный, второй - центральный из 450 остатков - нейтральный, тогда как третий (С-конец) состоящий из 400 остатков - сильно гидрофобный и содержит мембранно-связывающие участки. С использованием различных методов и программ были получены вторичная и третичная структуры этих белков.

Было установлено [6, 7], что три разных гена, клонированных из дрожжей *S. cerevisiae*, выполняют разные функции, и только инактивация всех трех генов приводила к летальному исходу фенотипа, что указывает на то, что хитин является существенным компонентом целостности стенки микроорганизма. Разрушение гена, кодирующего хитинсинтетазу (CHS1) приводило к незначительным отклонениям от нормального синтеза хитина, несмотря на то, что ген кодирует основную массу хитинсинтетазной активности *in vitro*. Другой ген, кодирующий фермент CHS2, отвечал за конструирование перегородок в клетке (90% хитина локализовано в перегородках); его разрушение не приводило к снижению общего содержания хитина. И, наконец, третий ген, состоящий в свою очередь из трех аллельных (CAL1; DIT101; CSD2), кодирует фермент (CHS3), отвечающий за синтез основной массы хитина в латеральной (боковой) стенке мембраны. Уничтожение этого гена приводило к снижению синтеза хитина на 90%.

Таким образом продуктом действия хитинсинтетазы является гомополимер, построенный из звеньев N-ацетил-глюкозоамина, соединенных между собой β -(->4)-гликозидной связью. С помощью физико-химических методов показано (*in vitro*), что образование водородных связей внутри одной полимерной цепи и между соседними приводило к образованию кристаллического α -хитина (полимерные цепи расположены относительно друг друга антипараллельно). Следует отметить, что процесс формирования кристаллического хитина происходит во времени. Вновь образовавшийся хитин очень чувствителен к модификациям ферментами, например, хитиназами и хитиндеацетилазами и к конъюгации с другими полисахаридами, например, β -гликанами. В регионе роста хитина происходит некоторая конкуренция между процессом модификации его и кристаллизацией. Подтверждением сказанного, служит тот факт, что именно на стадии роста грибных клеток (регион активного роста), когда интенсивно работает хитинсинтетаза, продуцируются и хитиназы, которые кроме хитиназной обладают и трансгликозилирующей активностью, ответственной за связывание гликанов с хитином.

ПУТИ ДЕГРАДАЦИИ ХИТИНА В ПРИРОДЕ

В 1984 г. ученые Davis и Eveleigh [8] предположили, что в природе может существовать два пути катаболизма хитина. Один путь хорошо изучен и определены микроорганизмы, использующие хитин, как источник энергии, углерода и азота, а также ферменты, принимающие участие в процессе. Этот путь (рис. 1, а) заключается в деградации хитина под действием хитиназ первоначально до хитоолигосахаридов и далее до хитобиозы, с последующим превращением ее в N-ацетилглюкозоамин в присутствии N-ацетил- β -глюкозоаминидазы и в глюкозоамин при действии N-ацетилглюкозоамино-деацетилазы.

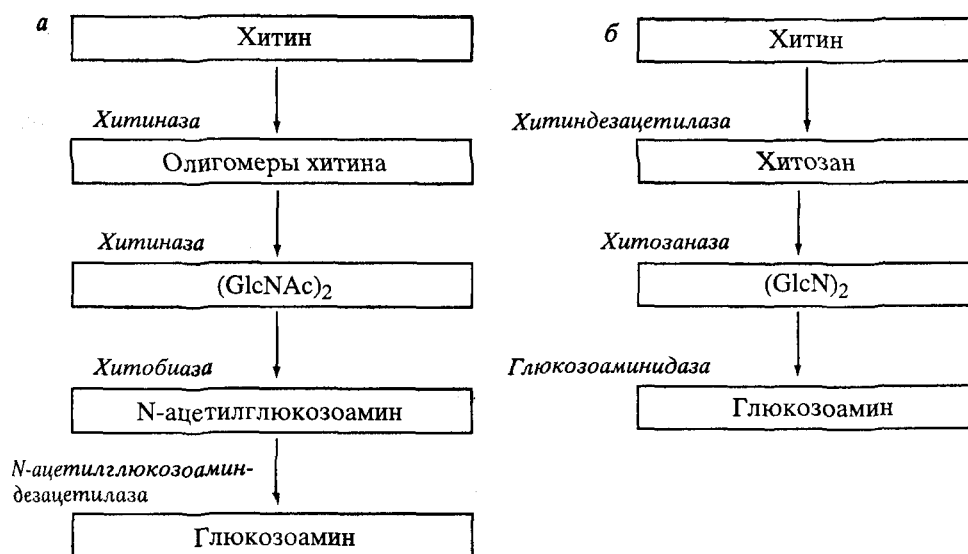


Рис. 1. Установленный (а) и постулированный (б) пути деградации хитина

Второй путь, так называемый, "хитозановый" постулирован по аналогии с деградацией других природных полимеров (см. рис. 1, б). Ключевым ферментом в этом случае служит хитиндеацетилаза (КФ 3.5.1.41), которая отвечает за превращение хитина в хитозан. Этот фермент был найден у некоторых микроорганизмов, в частности в грибах. Образующийся хитозан под действием хитозаназы деградирует до димеров глюкозамина, последний, в свою очередь, до мономеров в присутствии фермента - глюкозоаминидазы [9].

В настоящее время выделены, очищены и описаны хитиндеацетилазы из целого ряда микроорганизмов [10-14]. Эти ферменты представляют собой гликопротеины (содержание углеводов сильно варьирует). Они секретируются либо внутриклеточно, либо внеклеточно. Кроме того, все ферменты проявляют высокую термостабильность, значительно отличаются по молекулярной массе и рН-оптимуму активности, но все строго специфичны к водорастворимому поли-[(β -(1,4)-N-ацетил-D-глюкозамину)].

Хитиндеацетилазы из грибов в природе могут выполнять двойную функцию: участвовать при формировании своей клеточной стенки и при проникновении патогена в поражаемое растение.

Как было показано, они участвуют в биосинтезе хитин/хитозана. У гриба *M. rouxii* хитинсинтетаза первоначально синтезирует хитин полимеризацией N-ацетил-D-глюкозоаминных остатков из уридин-5'-дифосфата-N-ацетил-D-глюкозамина. Далее хитиндеацетилаза гидролизует N-ацетамидные связи вдоль полимерной цепи, образуя хитозан, причем реакция протекает более эффективно на вновь синтезированном субстрате, чем на плотно упакованном (микрофибриллярном) хитине. Аналогичный путь биосинтеза был прослежен и у гриба *Absidia coerulea*. Кроме этого было определено местонахождение хитиндеацетилазы - внутренняя сторона клеточной стенки. На примере *S. cerevisiae* показано, что хитиндеацетилазы (Cdp2a) необходима при деацетилировании в процессе аскоспорообразования (сумкообразования) клеточной стенки.

Другая функция хитиндеацетилазы - участие фермента в процессе взаимодействия растение-патоген. Исследования проводили на грибах *Colletotrichum*

lindemuthianum, которые являются патогенами для растений и синтезируют внеклеточную хитиндезацетилазу, активную по отношению к хитинолигосахаридам. Хитинолигомеры со степенью полимеризации ($n = 4-6$) являются элиситорами при самозащите растения от патогенов, тогда как их деацетилированная форма такую функцию не выполняет. Полагают, что хитиндезацетилаза гриба деацетилирует хитинолигосахариды, которые, в свою очередь, образуются при действии растительных хитиназ на клеточную стенку патогена и таким образом снижают их элиситорную активность. Кроме того, хитиндезацетилаза способствует проникновению грибной гифы в ткани растения, т.е. фермент деацетилирует хитин гифы, а ввиду снижения уровня ацетилирования происходит менее эффективный гидролиз хитина растительными эндохитиназами, образуется меньше хито-олигосахаридов (элиситоров), и постепенно патоген поражает растение. В настоящее время имеются работы, в которых показано, что деацетилированные олигомеры также могут в ряде случаев выполнять роль элиситоров [15-16].

Механизм действия хитиндезацетилазы был подробно изучен на примере действия фермента из *M. rouxii* на хитин/хитозановые олигомеры. Показано, что процесс гидролиза ацетильных групп субстрата происходит по механизму множественной атаки (со степенью множества равной трем). Этот механизм предусматривает первоначально образование фермент-полимерного комплекса с последующим гидролизом ацетильных групп вдоль полимерной цепи, с дальнейшим образованием нового активного комплекса с другой полимерной цепью. Необходимым условием успешного протекания реакции является наличие трех последовательно расположенных N-ацетил-D-глюкозоаминовых остатка полимерной цепи [17].

В определенных условиях (в присутствии 3М ацетата натрия) хитиндезацетилаза может катализировать процесс ацетилирования хитина [18].

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ГЛИКОЗИЛГИДРОЛАЗ И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА

Известно несколько семейств ферментов, сильно отличающихся по структуре и способу гидролиза хитина и хитозана [19-21]. Хитинолитические ферменты в основном определяются, как биокатализаторы, которые способствуют расщеплению Р-гликозидной связи между двумя соседними (C1 и C4) N-ацетил-глюкозоаминовыми звеньями в хитине.

Ферментативный гидролиз гликозидной связи происходит по типу кислотно-основного катализа, для которого необходимо наличие двух составляющих: донора протонов и нуклеофильного основания. Гидролиз может протекать либо с сохранением, либо с обращением конфигурации при асимметрическом атоме углерода [22-24].

Существует два варианта механизма катализа, которые являются общими для гликозилгидролаз. Первый - подразумевает наличие протонированного кислого остатка как донора протонов (обычно карбоксильная группа глутаминовой кислоты) и отрицательно заряженной аминокислоты, которая электростатически стабилизирует положительный заряд при углеродном атоме (O), образующийся в процессе катализа (рис. 2, а). Электростатическое взаимодействие протона карбоксильной группы глутаминовой кислоты с кислородным атомом гликозидной связи приводит к ее поляризации, образуется промежуточный карбоион. Отрицательно заряженная аминокислота стабилизирует карбоион или атакует как нуклеофил, приводя к образованию промежуточного соединения - гликозил-фермента. Далее карбоион реагирует с активной формой H_2O

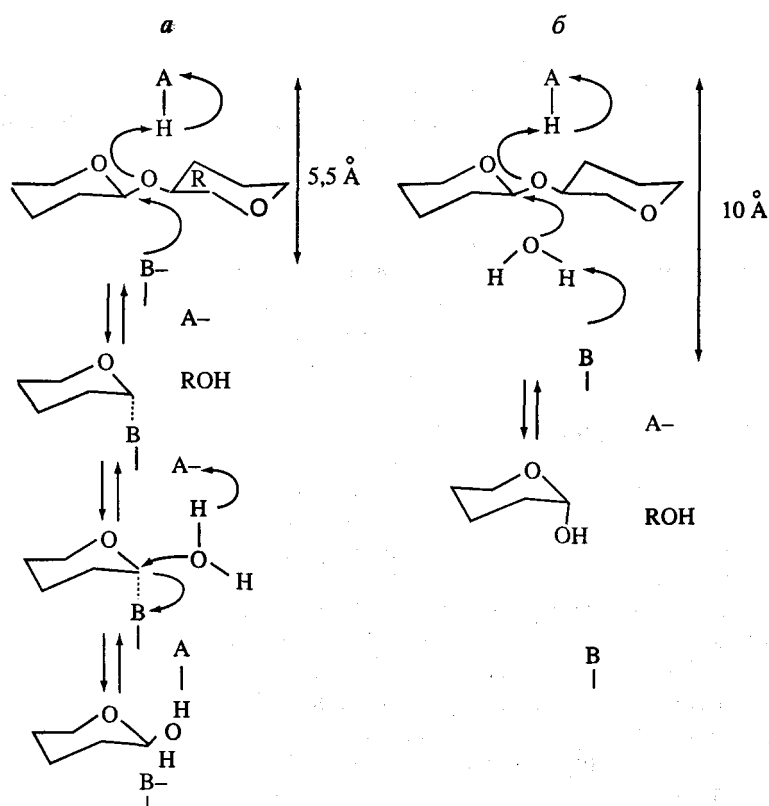


Рис. 2. Механизм катализа гидролиза Р-гликозидной связи с сохранением (а) и обращением конфигурации (б) заместителя у С1-атома

(ОН-) при экваториальном расположении заместителей, что приводит к сохранению аномерной конфигурации при углеродном атоме С1. При реализации катализа по второму варианту, основание (отрицательно заряженный остаток аминокислоты) располагается далеко от углеродного атома С1 чтобы стабилизировать промежуточный положительно заряженный карбоион (рис. 2, б). Образование промежуточного соединения облегчается благодаря молекуле воды, которая атакует непосредственно из аксиального положения, что приводит к обращению аномерной конфигурации. Расстояние между двумя каталитическими остатками аминокислот является характеристикой способа и стереохимии механизма реакции: расстояние 4,8-5,5 Å характерно для протекания гидролиза с сохранением аномерной конфигурации (механизм двойного замещения), 9-10 Å - механизм одинарного замещения с обращением.

На примере гликозилгидролазы (хитиназы В) из *Serratia marcescens* изучено влияние кислых остатков аминокислот, входящих в активный центр, на ферментативную активность. Например, замена глутаминовой кислоты (Glu 144) на амид соответствующей кислоты или на аланин в каталитическом центре привела к сильному снижению активности. Аналогичный результат наблюдали при заменах остатков аспарагиновой кислоты (Asp 140; 142 и 215). Наличие второго кислого остатка, тесно примыкающего к каталитическому центру, который действует как нуклеофил на стадии образования фермент-субстратного промежуточного соединения, является необходимым [25].

Гликозилгидролазы классифицируются по гомологии в аминокислотной последовательности на несколько семейств (18, 19 и 20). Семейство 18 включает в себя белки вирусов, бактерий, грибов, насекомых, рептилий и часть растений. Они отличаются по длине и некоторые из них имеют мультидоменную структуру. Семейство 19 объединяет группу растительных хитиназ, имеющих одинаковые консервативные участки, которые, в свою очередь, подразделяются на две ветви: одна содержит N-концевую, богатую цистеином область, и вторую, у которой ее нет. Небольшое семейство 20 содержит бактериальные хитобиазы и гексозаминидазы эукариотов. Известно, что гидролиз гликозилгидролазами из семейства 18 протекает по механизму двойного замещения, без обращения конфигурации (β -аномеры), а из семейства 19 по механизму одинарного замещения с обращением (α -аномеры) [26-31].

Хитиназы (гликозилгидролазы) широко распространены в живых организмах, играют индивидуальную и специфическую роль в них [32]. У насекомых и ракообразных хитиназы действуют в процессе линьки, у грибов и бактерий в процессе роста, у растений для защиты от патогенов, а у последних для проникновения в экзоскелет хозяина, что обеспечивает им питание непосредственно в форме аминокислот или "расчищает дорогу" для действия других ферментов (например, протеаз).

Согласно "Номенклатуре ферментов" существует два хитинолитических фермента: эндохитиназа (КФ 3.2.1.14) и N-ацетил- β -глюкозоаминидаза (КФ 3.2.1.30). Первая расщепляет полимерную цепь беспорядочно, в случайных местах, тогда как вторая гидролизует концевой N-ацетилглюкозаминный остаток от хитобиазы или более высшего аналога с невозстановливающего конца. Термин "хитиназа" иногда используется не корректно - ссылаясь, на любой фермент с хитинолитической активностью (не только эндохитиназы). В литературе также встречается название хитобиаза, во многих случаях это является синонимом N-ацетилглюкозоаминидазы, т.е. атакующая хитобиазу, давая N-ацетилглюкозамин [33-34]. Например, *T. harzianum* продуцирует хитинолитический фермент, который отличается от ферментов (КФ 3.2.1.14) и (КФ 3.2.1.30). Это экзохитиназа, которая отщепляет димерные звенья полимерной цепи с невозстановливающего конца. По аналогии с целлюлазным комплексом, фермент производящий хитобиазу из хитина следует называть 1,4- β -хитобиазидаза.

Хитинолитический комплекс *T. harzianum* хорошо изучен и охарактеризован [35-36]. Установлено, что для проявления эндохитиназной активности необходимо наличие тетрамера, хитобиазидазной - тримера, а для N-ацетилглюкозоаминидазной - димера. То, что названные ферменты относятся к разным классам, подтверждает синергичный (действующий совместно) эффект, характерный для большинства хитинолитических комплексов [37].

Для названия ферментов хитинолитического комплекса часто используется "хитозаназа"; ее главное отличие от хитиназы в том, что она гидролизует связь между GlcN-GlcN и не гидролизует GlcNAc-GlcNAc.

Известно, что хитиназы, N-ацетил- β -глюкозоаминидазы и хитозаназы ряда микроорганизмов помимо специфической могут проявлять и трансгликозилирующую активность [38-40]. Это свойство ферментов можно использовать для получения олигосахаридов со степенью полимеризации равной 3-8 [41]. Так, например, хитиназа с ММ-26 кДа, выделенная из *Streptomyces kurssanovii* (табл. 1), первоначально гидролизует N-ацетилхитоолигосахариды до N-ацетилхитобиазы, N-ацетилхитотриозы и N-ацетилглюкозамина, проявляя свою специфическую активность. Далее под действием этого же фермента в результате реакции трансгликозилирования (проявление неспецифической активности) происходит

Таблица 1. Некоторые свойства хитинолитических ферментных комплексов

Микроорганизм	Хитинолитический ферментный комплекс			
	активность, на 1 мг белка	pH	t °C	хитиназы, ММ, кДа
<i>S. marcescens</i>	0,33	4,5–7	30–55	45; 52; 58
<i>Bacillus</i> sp. 739	1,36	4–8	30–65	78; 87
<i>S. kurssanovii</i>	1,75	4–7	30–55	20; 22; 26; 40; 42

образование более длинных хитоолигосахаридов (пента- и тетрамеров, что было показано на модельных субстратах) [42].

В живых организмах хитиназы, проявляющие трансгликозилирующую активность, играют роль в связывании других полисахаридов с хитином в отрезок времени между полимеризацией и кристаллизацией хитина.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ХИТИНА И ХИТОЗАНА

Преимущества ферментативной деполимеризации хитина/хитозана перед химической очевидны, а именно, отсутствуют частичное дезацетилирование получаемых олигомеров и трудности контролирования процесса и выделения продуктов. Основными продуктами гидролиза являются хитоолигосахариды со степенью полимеризации 2–5, а не моносахариды. Кроме того, процесс ферментативной деполимеризации протекает, как правило, в гомогенных условиях (в растворе) с высоким выходом.

Очевидно, что хитиназы являются самыми подходящими из ферментов для получения хитоолигосахаридов. Последние широко распространены среди микроорганизмов [43–46]. Для многих из них известна способность секретировать хитинолитические ферменты в культуральную среду, например для бактерий рода: *Bacillus*, *Serratia*, *Streptomyces* и т.д. Изученные к настоящему времени хитиназы микроорганизмов относятся к эндогликаназам и преобладающим продуктом реакции деполимеризации является N,N'-диацетилхитобиоза, которая либо не гидролизует этим ферментом, либо гидролизует с очень низкой скоростью. Количество моносахарида в ферментативных гидролизатах хитина/хитозана резко возрастает, если его расщепление происходит под действием системы ферментов: хитиназы и N-ацетил-β-D-глюкозаминадазы. Молекулярная масса хитиназ названных выше микроорганизмов колеблется в диапазоне от 20 до 90 кДа. О субъединичной природе этих ферментов не известно, изоэлектрическая точка лежит в кислой и нейтральной областях, максимальная активность проявлялась в широком диапазоне pH от 4,0 до 8,0. Хитиназы бактерий обладают способностью адсорбироваться на субстрате (хитине/хитозане) за счет хитинсвязывающего участка в молекуле самого фермента [47].

Большинство микробных хитиназ успешно гидролизуют помимо коллоидного хитина также и хитозан, содержащий 10–50% N-ацетильных групп. Хитиназные комплексы, продуцируемые бактериями рода *Streptomyces*, одни из самых эффективных источников внеклеточных ферментов с полимердеградирующими свойствами. Для образцов *Bacillus species* хитинолитическая активность была обнаружена в 8 из 29 исследованных образцов. Наиболее охарактеризованы хитиназы, продуцируемые бактерией *B. circulans*, которые являются прекрасными моделями для изучения хитиндеградирующего механизма. Это связа-

Таблица 2. Влияние условий проведения гидролиза на ММ хитозана

Хитинолитический комплекс	pH	t °C	T, ч	Ф/С., ед.ак./ г – хитозана	ММ, кДа
<i>S. kurssanovii</i>	5	45	0,3	4	4
<i>S. kurssanovii</i>	4,6	30	3	6	24
иммобилизованный	6,2	30	2	6	2
<i>S. marcescens</i>	5,2	45	2	4	13
<i>T. viride</i>	5,2	55	2	0,4	18
<i>Bacillus</i> sp. 739	5,2	55	1	4	6

но с высокой гомологией аминокислотных последовательностей у продуцируемых хитиназ, почти со всеми бактериальными, некоторыми растительными, а также хитиназами насекомых и животных.

Хитинолитический комплекс культуры *S. marcescens* также имеет сходство с большинством хитинолитических систем эукариотов и прокариотов и, кроме того, является самым активным продуцентом хитиназ среди бактерий рода *Serratia*, и отличается от других хитинолитических систем, которые действуют только на разрыхленный хитин тем, что гидролизует и кристаллический хитин [48].

Наши исследования показали что, гидролиз коллоидного хитина не очищенными препаратами хитиназ культур *S. kurssanovii*, *Bacillus* sp. и *S. marcescens* дают следующие результаты по восстанавливающим сахарам: 1,75, 1,36 и 0,33 мкмоль/мин на 1 мг белка в препарате (см. табл. 1).

Процесс гидролиза коллоидного хитина имеет линейную зависимость в первый момент времени в условиях измерения хитиназной активности (0,1М Na-фосфатный буфер pH6,8, 37 °C для хитиназ культур *S. kurssanovii*, *Bacillus* sp. и 50 °C для *S. marcescens*). Скорость образования восстанавливающих Сахаров снижалась во времени быстро вероятно из-за накопления их в реакционной среде и как следствие ингибирования ферментативной реакции.

Хитинолитические комплексы, использованные нами для гидролиза растворов хитозана, имели рабочий диапазон в интервале pH4-8 [49-51]. Оптимальные условия для проведения гидролиза описаны в работах [52-55] и представлены в табл. 2.

Поскольку продукты ферментативной деполимеризации исходного хитозана представляют интерес, например, для биомедицинской отрасли, то желательно, чтобы конечный продукт содержал минимум посторонних белковых примесей. Поэтому мы иммобилизовали хитинолитический комплекс, продуцируемый культурой *S. kurssanovii*, на синтезированном макропористом сшитом хитине [56], который получали реацетилированием 2%-ного раствора хитозана по методу Hirano [57] в присутствии нерастворимых в системе вода-метанол-уксусная кислота порообразователей, таких, как галоидпроизводные углеводов (C-C₁₂). Полученный биокатализатор имел хитинолитическую активность 0,3-0,6 ед. активности на 1 г хитина, используя его мы получали низкомолекулярный водорастворимый при нейтральном значении pH хитозан [58].

ФЕРМЕНТЫ ДРУГИХ КЛАССОВ, ГИДРОЛИЗУЮЩИЕ ХИТИН И ХИТОЗАН

Отсутствие дешевых ферментных препаратов с высокой хитинолитической активностью, а также расширение производства глюкозоамина, N-ацетилглюкозамина и хитоолигосахаридов подталкивает к использованию коммерческих препаратов с неспецифической активностью для деполимеризации хитина/хитозана и их производных [59-61].

Была проведена большая работа по исследованию деполимеризации хитина/хитозана, водорастворимого хитина и его производных, а также α -(1 \rightarrow 4)-полигалактозамина рядом коммерческих ферментных препаратов (Cellulase TV, Hemicellulase, Lipase AIE, Papain) [62]. Неожиданным явилось то, что эти препараты деполимеризуют и с разной степенью аминополисахариды. Кроме того, некоторые из этих препаратов проявляют гидролитическую активность, такую же, как хитиназы и лизоцим, а ряд протеаз (пепсин, бромелаин, фицин) более эффективно деполимеризуют хитозан по сравнению с препаратом хитиназ, например, полученным при ферментации микроорганизма *Serratia marcescens*. Было показано, что при обработке уксусного раствора хитозана протеазами - бромелаином и пепсином фермент-субстратное соотношение на порядок меньше, чем при работе с хитиназами (*Serratia marcescens*) и лизоцимом.

Первоначально возникает предположение, что все эти препараты содержат примеси ферментов с хитинолитической активностью. Исследования показали, что это маловероятно по ряду причин. Во-первых, используемые ферментные препараты получены из разных источников - бактерий, грибов, млекопитающих, растений. Во-вторых, не все из исследованных препаратов (около 25%) проявляли гидролитическую активность. В-третьих, рН-оптимум препаратов целлюлаз (4,5), липазы (3,0), папаина (3,0-4,0), гемицеллюлазы (3,5) отличается от оптимального значения рН действия большинства известных хитиназ (4,0-6,5). В-четвертых, все препараты имеют разный температурный оптимум работы. В-пятых, последовательное или одновременное использование двух ферментных препаратов не дает синергичного (действующего совместно) эффекта при гидролизе хитозана.

Несомненным доказательством неспецифической активности к аминогликанам у названных ферментов было бы получение генноинженерного белка. Такая работа была проделана Музарелли с коллегами на примере липазы [63]. Исследовалась неспецифическая активность липазы (EC 3.1.1.3) из проростков пшеницы и рекомбинантной липазы из *Candida antarctica* к 1 %-ному раствору хитозана (ММ 700 кДа; СД 0,85). Из полученных результатов следовало, что липаза быстро деполимеризует субстрат (за 10 мин происходит снижение вязкости раствора на 90%), генноинженерная значительно хуже (в этом случае время гидролиза составляет несколько дней). Однако активность последней сильно возрастала при добавлении в буфер соли (CaCl_2). Поэтому можно предположить, что гидролиз хитина/хитозана с ферментными препаратами протекает по простому механизму кислотно-основного катализа, о котором говорилось выше.

Интересно отметить, что полисахарид - ксантан (не аминогликан) не гидролизуются ни одним из выше названных ферментных препаратов. С точки зрения механизма кислотно-основного катализа это можно объяснить тем, что при отсутствии второго кислого остатка (который действует как нуклеофил в первой части каталитического цикла), достаточно близко расположенного к каталитическому центру (Glu), эту роль выполняет карбонильный кислород N-ацетильной группы при C2 атоме в субстрате.

Применение коммерческих ферментных препаратов для деполимеризации аминогликанов имеет существенный недостаток - используемые количества, в большинстве случаев, соизмеримы с количествами взятого субстрата. Поэтому получаемый гидролизат нуждается в дополнительной очистке от примеси посторонних белков. Это можно преодолеть путем иммобилизации ферментных препаратов на доступном сорбенте.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ХИТИНОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ДРУГИХ КЛАССОВ НА ХИТИНСОДЕРЖАЩИХ НОСИТЕЛЯХ

Иммобилизованные ферменты обладают целым рядом преимуществ, при использовании их в прикладных целях. Основное заключается в том, что можно получить продукт не загрязненный ферментом, а это особенно важно в пищевом и фармацевтическом производствах. Немаловажным является и использование катализатора многократно, кроме того, гетерогенный катализатор позволяет проводить процесс непрерывно, например, в проточных колонках [64].

Широкое применение для иммобилизации ферментов нашли природные полисахариды: целлюлоза, декстран, агароза и их производные, что объясняется их доступностью и наличием реакционноспособных групп, легко вступающих в различные химические реакции и высокой гидрофильностью. Также перспективным может оказаться использование полиаминосахаридов, в частности, сшитого хитина [56, 65-68]. Несомненный интерес представляют работы связанные с иммобилизацией клеток, продуцирующих гидролазы во внешнюю среду [69-71]. Китайские исследователи показали возможность деградации хитозана в биореакторе заполненном пластинами пористого полиуретана, на которых иммобилизованы клетки *Trichoderma reesei*, продуцирующие хитозаназу. Степень полимеризации, получаемых олигосахаридов можно регулировать продолжительностью времени гидролиза. Выход по D-глюкозоамину составлял 73%. Процесс в биореакторе можно проводить многократно (10 циклов) без ощутимой потери активности фермента и выхода конечного продукта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Merz R.A., Horsch M., Nyhlen L.E. et al. // Exs. 1999. V. 87. P. 9-37.
2. Rulz-Herrers J., Martinez-Espinoza A.D. // Ibid. P. 39-53.
3. Adams D.J., Causier B.E., Mellor J. et al. // In: Chitin Enzymology. R.A.A. Muzzarelli, ed. Ancona. Eur. chitin Soc. 1993. V. 1. P. 15-25.
4. Bulawa C II Annu. Rev. Microbiol. 1993. V. 47. P. 503-534.
5. Sterner A., Waffenschmidt S., Schreier P.H. et al. // In: Chitin Enzymology / Ed. R.A.A. Muzzarelli. Italy. Atec Edizioni. 1996. V. 2. P. 429-437.
6. Henar V.M., Duran A., Romero C II Exs. 1999. V. 87. P. 55-69.
7. Rase D.M., Merz R.A., Jeanguenat A. et al. // In: Advan. Chitin Sci. M.R. Peter, A. Domard, R.A.A. Muzzarelli, eds. Potsdam. University of Potsdam. 2000. V. 4. P. 479-505.
8. Davis B., Eveleigh D.E. II In: Chitin, Chitosan and Related Enzymes. J.P. Zikakis ed. Orlando. Academic Press. 1984. P. 161-179.
9. Dinter S., Bunger U., Sieferer E. II In: Advan. Chitin Sci. M.G. Peter, A. Domard, R.A.A. Muzzarelli, eds. Potsdam. University of Potsdam. 2000. V. 4. P. 506-510.
10. Alfonso C., Nuero O.M., Santamaria E. et al. // Curr. Microbiol. 1995. V. 30. P. 49-54.
11. Копечный J., Ходрова B. II Folia Microbiol. 2000. V. 45. P. 465-468.
12. Gao X.D., Katsumoto T., Onodera K. // J. Biochem. 1995. V. 117. P. 257-263.

13. Tsigos I., Bouriotis V. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 26286-26291.
14. Kafetzopoulos D., Martinou A., Bouriotis V. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 2564-2568.
15. Vaude P., Vrum K.M., Domard A. et al. // Plant Physiol. 1998. V. 118. P. 1354-1359.
16. Васюкова Н.И., Зиновьева С.В., Ильинская Л.И. и др. // Прикладная биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. С. 115-122.
17. Tsigos I., Martinou A., Kafetzopoulos D. et al. // Trends Biotechnol. 2000. V. 18. P. 305-312.
18. Tokuyasu K., Ono H., Mitsutomi M. et al. // Carbohydr. Res. 2000. V. 325. P. 211-215.
19. Henrissat B., Bairoch A. // Biochem. J. 1993. V. 293. P. 781-788.
20. Perrakis A., Tews I., Wilson K.S. et al. // In: Chitin Enzymology. R.A.A. Muzzarelli, ed. Italy. Atec Edizioni. 1996. V. 2. P. 109-122.
21. Gooday G.W. // Exs. 1999. V. 87. P. 157-169.
22. Davies G., Henrissat B. // Structure. 1995. V. 3. P. 853-859.
23. Terwischa van Sceltinga, Armand S., A.C., Kalk K.H. et al. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 15619-15623.
24. Armand S., Tomita H., Heyraud A. et al. // FEBS Lett. 1994. V. 343. P. 177-180.
25. Synstad B., Gaseidnes S., Vriend G. et al. // In: Advan. Chitin Sci. M.G. Peter, A. Domard, R.A.A. Muzzarelli, eds. Potsdam. University of Potsdam. 2000. V. 4. P. 524-529.
26. Fukamizo T., Koga D., Goto S. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1995. V. 59. P. 311-313.
27. Koga D. // In: Advan. Chitin Sci. M.G. Peter, A. Domard, R.A.A. Muzzarelli, eds. Potsdam. University of Potsdam. 2000. V. 4. P. 511-516.
28. Brameld K.A., Shrader W.D., Imperiali B. et al. // J. Mol. Biol. 1998. V. 280. P. 913-923.
29. Brameld K.A., Goddard W.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 4276-4281.
30. Iseli B., Armand S., Boiler T. et al. // FEBS Lett. 1996. V. 382. P. 186-188.
31. Fukamizo T. // Chitin enzymology 2001. R.A.A. Muzzarelli, ed. Italy. Atec. 2001. P. 213-218.
32. Flach J., Pilet E., Jolles P. // Exp. 1992. V. 48. P. 701-716.
33. Bielka H., Dixon H.B.F., Karlson P. et al. // Enzyme Nomenclature. New York. Academic Press, Inc. 1984. 350 P.
34. Tronsmo A., Hjeljord L., Klemsdal S.S. et al. // In: Chitin Enzymology. R.A.A. Muzzarelli, ed. Italy. Atec. Edizioni. 1996. V. 2. P. 235-244.
35. Haran S., Schickler H., Oppenheim A. et al. // Phytopathology. 1996. V. 86. P. 980-985.
36. Haran S., Schickler H., Oppenheim A. et al. // Mycor. Res. 1995. V. 99. P. 441-446.
37. Lorito M., Woo S.L., Donzelli B. et al. // In: Chitin Enzymology. R.A.A. Muzzarelli, ed. Italy. Atec. Edizioni. 1996. V. 2. P. 157-164.
38. Ussui T., Hayashi Y., Nanjo F. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1987. V. 923. P. 302-309.
39. Cheng C., Li Y. // Biotechnol. Appl. Biochem. 2000. V. 3. P. 197-203.
40. Ashida H., Yamamoto K., Murata T. et al. // Arch. Biochem. Biophys. 2000. V. 373. P. 394-400.
41. Ussui T., Matsui H., Isobe K. // Carbohydr. Res. 1990. V. 203. P. 65-77.
42. Stoyachenko L.A., Varlamov V.P. // In: Chitin enzymology. R.A.A. Muzzarelli, ed. Ancona. Eur. Chitin Soc. 1993. P. 447-452.
43. Robertus J.D., Monzingo A.F. // Exs. 1999. V. 87. P. 125-135.
44. Koga D., Mitsutomi M., Kono M. et al. // Exs. 1999. V. 87. P. 111-123.
45. Yoon H.G., Kim H.Y., Hong B.S. et al. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2001. V. 65. P. 802-809.
46. Shahabuddin M., Vinetz J.M. // Exs. 1999. V. 87. P. 223-234.
47. Iseli B., Boiler T., Neuhaus J.-M. // In: Chitin Enzymology. R.A.A. Muzzarelli, ed. Italy. Atec Edizioni. 1996. V. 2. P. 135-142.
48. Rowena L., Cabib R., Cabib E. // Anal. biochem. 1982. V. 127. P. 402-412.
49. Порфирьева О.В., Юсупова Д.В., Зоткина Н.Л. и др. // Микробиология. 1997. Т. 66. С. 347-353.
50. Stoyachenko L.A., Varlamov V.P., Davankov V.A. // Carbohydr. Polym. 1994. V. 24. P. 47-54.
51. Мелентьев А.М., Актубанов Г.Э. // Прикладная биохимия и микробиология. 1999. Т. 35. С. 624-628.
52. Ивина А.В., Татаринова Н.Ю., Varlamov V.P. // Proc. Biochem. 1999. V. 34. P. 875-878.
53. Ивина А.В., Варламов В.П., Мелентьев А.И. и др. // Прикладная биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. С. 160-163.
54. Ивина А.В., Ткачева Ю.В., Варламов В.П. // Там же. 2002. Т. 38. С. 132-135.
55. Ивина А.В., Varlamov V.P., Gabdrakhmanova L.A. et al. // In: Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives. H. Struszczyk Poland, ed. Lodz. 2001. V. 7. P. 57-63.

56. *Ilyina A.V., Tikhonov V.E., Varlamov V.P.* et al. // *Biotechnol. Appl Biochem.* 1995. V. 21. P. 139-148.
57. *Hirano S., Matsumura T.* // *Carbohydr. Res.* 1987. V. 165. P. 12-122.
58. *Ilyina A.V., Tikhonov V.E., Albulov A.I.* et al. 33 *Process Biochemistry*. 2000. V. 35. P. 563-568.
59. *Pantaleone D., Yalpani M.* // In: *Carbohydrates and Carbohydrate Polymers, Analysis, Biotechnology, Modification, Antiviral, Biomedical and Other Applications*. M. Yalpani, ed. ATL Press. 1993. P. 44-51.
60. *Zhang Hu., Du Yu., Yu X., Mitsutomi M., Aiba S.* // *Carbohydr. Res.* 1999. V. 320. P. 257-260.
61. *Shin-ya Y., Lee M., Hinode H.* et al. // *Biochem. Eng. J.* 2001. V. 7. P. 85-88.
62. *Yalpani M., Pantaleone D.* // *Carbohydr. Res.* 1994. V. 256. P. 159-175.
63. *Muzzatelli R.A.A., Tetbojevich M., Cosani A.* // In: *Chitin Enzymology*. R.A.A. Muzzarelli, ed. Italy, Atec Edizioni. 1996. V. 2. P. 69-82.
64. *Liang J.F., Li Yt., Yang V.C.* // *J. Pharm. Sci.* 2000. V. 89. P. 879-890.
65. *Itoyama K., Tanibe H., Hayashi T.* et al. // *Biomaterials*. 1994. V. 15. P. 107-112.
66. *Vaillant F., Millan A., Millan P.* et al. // *Proc. Biochem.* 2000. V. 35. P. 989-996.
67. *Krajewska B.* // *Acta Biotechnol.* 1991. V. 11. P. 269-277.
68. *Yamasaki Y., Fukumoto I., Kumagai N.* et al. // *Biosci. Biotech. Biochem.* 1992. V. 56. P. 1546-1551.
69. *Lusta K.A., Chung I.K., Sul I.W.* et al. // *Proc. Biochem.* 2002. V. 35. P. 1177-1182.
70. *Vaillant F., Millan A., Millan P.* et al. // *Proc. Biochem.* 2000. V. 35. P. 989-996.
71. *Nidetzky B., Steiner W., Claeysens M.* // *Biochem. J.* 1994. V. 303. P. 817-823.

КЛЮЧЕВАЯ РОЛЬ ХИТИНА В ОБРАЗОВАНИИ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ГРИБОВ

Е.П. Теофилова

Институт микробиологии РАН, Москва
teresh@bcep.ru

Настоящий литературный обзор посвящен особой роли хитина в образовании и функционировании клеточной стенки (КС) мицелиальных грибов. Следует отметить, что с этих позиций значение хитина рассматривается впервые, и в связи с этим более подробно обсуждаются последние представления о строении, составе КС и связи хитина с другими биополимерами. Данные вопросы рассматриваются как необходимые для развития и совершенствования биотехнологий получения этого полиаминосахарида.

ПРЕИМУЩЕСТВА БИОТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИАМИНОСАХАРИДОВ ИЗ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ ПО СРАВНЕНИЮ С ДРУГИМИ СЫРЬЕВЫМИ ИСТОЧНИКАМИ

Вступление человечества в XXI век совпало с особым интересом к биотехнологии. Эта отрасль биологии стала ведущим направлением среди технологий нового столетия. А основными продуцентами, которые будут использоваться в новых биотехнологиях, оказались грибы. Особый интерес у биотехнологов к мицелиальным грибам можно объяснить следующими причинами. Мицелиальные грибы широко распространены в природе, их известно более 1,5 млн видов, т.е. по численности эти организмы уступают только насекомым и занимают второе место в мире. Эта группа эукариотных организмов очень гетерогенна по своему составу, что проявляется в физиолого-биохимических особенностях и химическом составе клеток, их морфологии и способах размножения [1,2]. Особенности биохимической активности грибов/дают возможность использовать их для получения ценных биологических соединений, продуцентами которых ранее служили растения в животные.

Интерес биотехнологов к грибам объясняется не только их способностью образовывать почти 70-80% БАВ, получаемых в настоящее время [3]. Грибные производства можно сделать высоко технологичными. Им свойственна полная контролируемость биотехнологического процесса, использование дешевого, неприщевого сырья, например, лигноцеллюлозных отходов, краткосрочность ферментации, процесс производства может быть замкнутым или полужамкнутым, что отвечает современным экологическим требованиям. Безотходность современных грибных биотехнологий означает многоцелевое использование мицелия и культуральной жидкости для получения нескольких (до 10) конечных продуктов, например, органических кислот, липидов, белков, пигментов, био-генных элиситоров и структурных компонентов КС грибов полисахаридной природы [1,4-6]. Получение последних, в частности полиаминосахаридов (хитина, хитозана и др.), представляет в настоящее время одну из перспективных областей биотехнологии.

Отметим, что интерес к хитину и особенно к хитозану постоянно растет, что объясняется их уникальными свойствами, позволяющими использовать эти полиаминосахариды в различных областях промышленности, в медицине и сельском хозяйстве. Основным источником получения хитина до сих пор является

панцирьсодержащее сырье (ПСС), получаемое как отход от производств, в которых используют представителей *Arthropoda*. Мировых запасов ПСС хватит для получения 150 тыс. т хитина в год [7]. Однако несмотря на то, что запасы ракообразных увеличиваются в последние годы за счет их искусственного разведения, все острее встает вопрос о новых источниках получения хитина. Ими могут быть некоторые водоросли, в частности, *Thalassiosira fluviatilis* и *Cyclotella cryptica*, насекомые, такие гидробионты, как, например, *Obelia longissima*, фараонова каракатица и грибы [8-10]. Из диатомовых водорослей получают высококристаллические хитиновые волокна, выход которых составляет 76-80%. Однако все попытки культивировать эти водоросли в искусственных условиях в виде периодических культур или путем проточного культивирования не являются экономически выгодными, так как выход биомассы водорослей оказывается очень незначительным. В этом отношении более перспективны гидроиды *O. long.*, которые легко культивируются в условиях моря. В настоящее время разработан способ получения хитина и хитозана из биомассы этих гидроидов [11, 12]. Источники получения хитина могут быть и более экзотическими: предложено получать хитин из надкрыльев тараканов, майских жуков, кораллов и термитов. Но, к сожалению, все эти методы получения полиаминосахаридов не пошли далее уровня кустарного производства. Учитывая достаточно низкую предполагаемую стоимость хитина, получаемого из грибов, именно этот источник должен стать одним из основных в биотехнологии XXI века [13].

В настоящее время не вызывает сомнений, что именно мицелиальные грибы, относящиеся к порядку *Eurotiales* и *Mucorales*, представят наибольший интерес для биотехнологов как продуценты полиаминосахаридов. Объясняется это следующими причинами. Из всех известных организмов, образующих хитин, грибы обладают самой высокой скоростью роста. Получение грибной биомассы происходит в ферментерах и не зависит от сезонности и капризов погоды. Содержание хитина в грибах достаточно высокое - до 60% от веса клеточной стенки [4]. Для выращивания грибной биомассы в качестве питательных сред можно использовать самые дешевые субстраты - жидкие отходы (сульфитные щелока) целлюлозно-бумажной промышленности, годовой объем которых превышает сотни миллионов тонн в год, а также крахмалсодержащие отходы пищевой промышленности, отходы от молочных производств, например, сыворотку и другие отходы.

Производство грибного хитина имеет ряд технологических преимуществ по сравнению с производством хитина крабов. Например, отпадает необходимость в размельчении получаемого конечного продукта, удаления из него карбоната кальция, производство становится экологически более чистым, так как при получении грибного хитина применяются разбавленные кислоты и щелочи, не требуется создания больших отстойников для агрессивных жидкостей.

Однако исследования в области изучения химического строения, биосинтеза, физико-химических свойств хитина грибов значительно меньше того вклада, который внесен в изучение хитина *Arthropoda* [14].

Данные последних лет свидетельствуют о том, что значительный прогресс в исследовании хитина *Fungi* может быть достигнут с расширением наших представлений о строении и химическом составе клеточной стенки грибов и особенно о комплексах полиаминосахаридов с белками, липидами и другими компонентами этой поверхностной структуры клетки. Эта задача поставлена в настоящей работе, где с этой целью используются как литературные, так и собственные данные автора и работающих с ним коллектива сотрудников.

СТРОЕНИЕ И СОСТАВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

КС имеет чрезвычайно важное значение для всей клетки: ею определяется размер клетки и ее форма в прошлом, настоящем и будущем [15]. Это не мертвая, неактивная структура, а живая, динамичная система, активно взаимодействующая с ниже лежащей протоплазмой и окружающей средой.

Сведения о структуре, составе и биосинтезе КС можно найти в обзорных работах [4, 13, 15-19]. Во всех исследованиях можно проследить ключевую роль метаболизма хитина в росте гифы и тот факт, что микрофибриллы хитина являются первичным "скелетом", на котором строится клетка.

Рост грибной клетки может быть либо сферическим, либо апикальным (поляризованным) [20]. Первый свойствен дрожжевым организмам, второй - мицелиальным грибам. Синтез КС у последних происходит в два этапа. Так называемая первичная КС синтезируется путем отложения новых слоев биополимеров на кончике гифы, вторичная КС образуется в дистальной части гифы, обычно отложением нового материала на наружной части первичной КС. Свойства этих двух типов КС различны. Так первичная КС более хрупкая и легко лизируется в гипотоническом растворе. При превращении во вторичную КС эта структура меняет свои свойства, становясь более прочной и более толстой.

Процесс увеличения прочности КС грибов включает следующие этапы: 1) поперечное связывание компонентов; 2) связывание индивидуальных полисахаридов в микрофибриллы; 3) отложение новых компонентов КС [15].

У мицелиальных грибов поперечно связанными компонентами микрофибрилл КС являются хитин и триплетный хеликс β -1,3-глюкановой цепи. Именно эти два биополимера придают прочность КС грибов, причем особую устойчивость придают хитиновые цепи. Это подтверждают следующие наблюдения. Установлено, что апикальная и дистальная части КС содержат разное количество хитина: в растущей части гифы хитина в 2-3 раза меньше, чем в зрелой КС. Особенно заметны отличия в содержании хитина в КС *Coprinus sterquilinus* (1,54 в апексе и 5,85% во вторичной КС), причем прочность возрастает соответственно [21].

В полярном росте гифы большое значение имеет биоэлектрический поток, что впервые было установлено у псевдогрибов с апикальным ростом. Так, для *Allomyces macrogynus* отмечен положительный поток электричества $0,16 \text{ мкА} \cdot \text{см}^{-2}$ на расстоянии 40 мкм от апекса, при этом гифы первоначально двигаются в направлении катода, а далее - к аноду [22].

Микрофибриллы хитина синтезируются комплексом ферментов, состоящих из полипептидов, локализованных в мембране. Этот комплекс состоит из полипептидов хитинсинтазы (хитинсинтазы), но в него могут входить и другие полипептиды - это хитиназа и уридиндифосфатаза. Хитинсинтаза состоит из четырех полипептидных субъединиц, которые локализованы в апексе гифы или в месте образования ветвлений гифы. Установлено, что стрессовые воздействия на мембрану вызывают конформационные изменения в хитинсинтазе или изменяют взаимодействия между этим ферментом и ассоциированными полипептидами, что способствует активации синтеза хитина. Подтверждением роли стресса может служить тот факт, что галотолерантный штамм *Zygosaccharomyces rouxii* имеет до 15% хитина в КС, но, если концентрация соли в среде снижается, то уровень хитина не превышает 2%.

Установлено, что в КС грибов, в частности у дрожжей, могут принимать участие две хитинсинтазы, одна из которых необходима для образования септ, а вторая является как бы аварийным ферментом. Обе хитинсинтазы могут участвовать в репаративных процессах восстановления хитиновых микро-

фибрилл при повреждении КС [23, 24]. В более поздних исследованиях, учитывая последовательность аминокислот, было установлено уже три типа хитинсинтетазы и было высказано предположение о различной роли этих ферментов в образовании хитина [25]. В ростовых процессах грибов, вероятно, участвуют и хитиназы, но роль этих ферментов пока не ясна [15]. Не вызывает сомнений тот факт, что эти хитиндеградирующие ферменты образуются на всех стадиях роста грибов. Создана модель [26] взаимодействия хитинсинтаз и хитиназ в процессе апикального роста, однако рост и ветвление гиф продолжают при добавлении ингибитора биосинтеза хитиназ - аллозамидина. Поэтому наиболее очевидной ролью хитиназ является их автолитическая функция, например, при отделении дочерней дрожжевой клетки от материнской [27]. У грибов *Aspergillus nidulans* идентифицирована эндохитиназа, которая также участвует в автолитических процессах. Синтез этого фермента регулируется продуктами деградации хитина, возможно, через механизм индукции [28].

В последние годы большое значение в морфогенезе КС грибов придают специальным образованиям - везикулам (их называют хитосомами). В этих специальных везикулах присутствуют стерины и зимоген-хитинсинтетазы. Хитосомы образуют *in vitro* в присутствии субстрата хитиновые микрофибриллы, неотличимые от тех, что образуются *in vivo*. Полагают, что активная хитинсинтетаза, локализованная в плазмемной мембране, является акцептором N-ацетилглюкозаминовых остатков из УДФ-N-ацетилглюкозамина и переносит их на хитиновые цепи [29]. Этот процесс координируется VS-центром (центром снабжения везикулами), из которого везикулы, содержащие ферменты, поступают к поверхности КС и участвуют в синтезе полимеров. Именно VS-центр, определяющий направление движения везикул, формирует форму КС грибов [30]. Полисахаридный состав клеточной стенки у различных представителей грибов может значительно различаться, но все же компоненты КС можно разделить на две группы. Это - структурные компоненты (I) и компоненты, заполняющие пространство между ними (II) [23, 24]. Первые компоненты представлены полиаминосахаридами (хитином, хитозаном) и глюканами, имеющими β -(1 \rightarrow 3), β -(1 \rightarrow 4), β -(1 \rightarrow 6)-связи. Вторые - являются маннопротеинами, галактоманнопротеинами, ксиломаннопротеинами, глюкурономаннопротеинами и α -(1 \rightarrow 3) - глюканами.

Химическое строение КС впервые наиболее подробно было изучено на примере гиф базидиомицета *Schizophyllum commune* [31]. Было показано, что в состав КС гиф входят глюкоза (67,6%), манноза (3,4%), ксилоза (0,2%), N-ацетил-D-глюкозамин (12,5%), аминокислоты (6,4%) и липиды (3,06%). На поверхности гиф базидиальных грибов локализован слизистый материал, состоящий из полисахаридов, представленных 1,3- β -глюканами, содержащими только глюкозные единицы, присоединенные β -1,6-связями к каждой третьей единице глюкозы по длине основной цепи. На внешней поверхности гифы присутствует также S-глюкан, состоящий исключительно из 1,3-связанных глюканых остатков.

В более глубоких слоях гиф содержится щелоченерастворимый R-глюкан, тесно связанный с хитином. Это сильно разветвленный глюкан, содержащий β -1,3 и β -1,6-связи. Интересно, что внутренняя часть этого нерастворимого в щелочах глюкана обнаруживает структурное сходство с глюканами, расположенными в слизистом слое на самой поверхности гифы.

Следует отметить, что глюканы, содержащие β -1,3 и β -1,6 связи, характерны для представителей всех таксономических классов грибов, за исключением зигомикетов. Интересно, что у дрожжей основным является также R-глюкан, но степень ветвления этого глюкана менее выражена, чем у базидиальных гри-

бов [31]. Глюканы, например 1,3-глюканы, образуют наиболее прочный комплекс с хитином, называемый хитин-глюкановым комплексом (ХГК), который составляет "скелет" грибной клетки. Кроме этих биополимеров в зависимости от видовой принадлежности грибов в их КС могут присутствовать специфические соединения. Например, в КС высших грибов, в частности *Schizophyllum commune* обнаружены гидрофобные белки (гидрофобины), богатые цистеином. Интересно, что гидрофобины присутствуют только в воздушных гифах и их нет в мицелии, растущем в погруженных условиях. Гидрофобины обнаружены во многих грибах, относящихся к *Eomycota* и *Neomycota*: *Pleurotus ostreatus*, *Coprinus cinereus*, *Agaricus bisporus* {*Basidiomycota*}, у *Ascomycota* {*Penicillium chrysogenum*, *Neurospora crassa*} и у зигомицета *Mucor mucedo* [32].

Гидрофобины относят к структурным белкам, участвующим в процессе появления воздушных гиф грибов. Это - небольшие секреторные белки, содержат семь остатков цистеина. Гидрофобины свойственны воздушным структурам грибов и, кроме воздушного мицелия, содержатся в спорах и плодовых телах. Эти соединения координируют закрепление гифов в твердом субстрате и перпендикулярное расположение относительно поверхности субстрата. Особенно велика роль гидрофобинов, когда гриб-паразит осуществляет первый этап паразитического сожительства - прикрепляется к хозяину [33]. Гидрофобины представляют новый класс белков и для их выделения используются методы, нетипичные для экстракции белков [34]. Интересным химическим свойством гидрофобинов является то, что они растворяются только в трихлоруксусной и муравьиной кислотах. Гидрофобины образуют пленку, которая покрывает поверхность КС гиф, имеет толщину около 10 мкм и представляет собой мозаику из параллельных палочек [35]. Полипептидные соединения, аналогичные по функциональной роли гидрофобинам, имеются и у актиномицетов. У последних наиболее распространен стрептофактин - амфипатический пептид, участвующий в формировании воздушных гиф у *Streptomyces coelicolor*.

Гидрофобины, располагающиеся между КС гифы и воздушной средой, влияют на морфогенные процессы, например, на образование спор, плодовых тел и структур, образующихся при инфицировании грибом растительных тканей. Гидрофобность поверхности КС грибов придает и другой тип грибных белков, называемых репеллентами. Последние обнаружены у грибов-патогенов, например, *Ustilago maydis*.

Образование гидрофобинов находится под контролем двух генов - *Le.hyd.1* и *Le.hyd.2*, изученных у *Lentinus edodes*. Определена нуклеотидная последовательность этих генов [36].

Поверхность КС грибов может быть покрыта высокомолекулярными пигментами фенольной природы (меланинами). Черный цвет меланина и его защитные функции связаны с тем, что в его молекуле присутствуют неспаренные электроны. Этот черный пигмент обладает выраженными антиоксидантными и генопротекторными свойствами [37] и, таким образом, КС имеет своеобразный "щит" от действия активных форм кислорода. Биосинтез меланина полностью не выяснен, но существенное значение имеет то, что в этом процессе участвуют аминокислота тирозин и фермент тирозиназа (меланингормонотропные гормоны). Реакция образования меланина протекает следующим образом: тирозин \rightarrow 3,4-дигидроксифенил-аланин (ДОФА) \rightarrow ДОФА-хинон \rightarrow полимеризация \rightarrow меланин [38]. Биосинтез меланина у грибов *Inonotus obliquus* стимулируется ионами меди, пирокатехином и тирозином [37].

Основной функцией меланина является защита от УФ-облучения, которое может внести серьезные нарушения в архитектуру мембран, т.е. влиять на со-

став липидов. При облучении изменяется ионная проницаемость мембраны, из-за чего клетки набухают и разрываются. Меланин является прекрасным фильтром, так как он задерживает более 90% УФ.

Предполагают, что меланин, связанный с хитином, чрезвычайно устойчив к воздействию ферментов. Особенно защищены в этом отношении грибные споры, у которых меланин всегда покрывает споровую оболочку, придавая особую устойчивость споры к бактериальному лизису.

Еще одним компонентом КС грибов является спорополленин [39]. Спорополленин подобно хитину и целлюлозе не имеет растворителей, способных его извлечь из КС, поэтому при выделении из природных объектов применяется сначала последовательная деградация, растворение и гидролиз соединений, входящих в состав КС. Спорополленин отличается еще большей устойчивостью к внешним воздействиям, чем хитин. Спорополленин устойчив к щелочам и сильным кислотам (серной, соляной, фтористой и фосфорной). Разрушить его можно только очень сильными окисляющими агентами, например, озоном с последовательной обработкой H_2O_2 , хромовой кислотой и азотной кислотой [40].

Как правило, спорополленин содержит природные объекты, способные синтезировать каротиноиды. Эта связь не случайна, так как спорополленин является продуктом окислительной полимеризации β -каротина. В зигоспорах каротинсинтезирующих грибов спорополленин располагается в наружном слое КС. Именно в этом слое располагаются хитин, хитозан, меланин и спорополленин. Цитохимические исследования позволяют заключить, что спорополленин выполняет структуральную функцию и поддерживает единство биополимеров этого слоя КС. Учитывая, что спорополленин является высоконенасыщенным соединением, а на поверхности клеток, (например, пылевых) могут образовываться активные формы кислорода [41], можно предположить, что спорополленин выполняет также и антиоксидантные функции.

В КС муковых грибов присутствует уникальный гетерополисахарид, в состав которого входят в основном уроновые кислоты, фукоза, галактоза, манноза, получивший название мукорана [4]. У гетерополисахаридов КС грибов класса *Urediniomycetes* основным компонентом является манноза, наряду с которой для базидиомицетных дрожжей характерно присутствие в КС таких минорных моносахаридов как глюкоза, галактоза, фукоза, рамноза и арабиноза [42]. У *S. commune* присутствует полисахарид шизофиллин, обладающий выраженной противораковой активностью [31].

Согласно последним данным, все перечисленные выше биополимеры тесно взаимосвязаны ионными и ковалентными связями с хитином, который с этих позиций осуществляет роль координатора ростовых процессов.

Отдельные компоненты КС могут быть связаны друг с другом ковалентными связями, например, β -глюкан с хитином, или Р-глюкан с маннопротеином [43]. У *Candida albicans* хитин так же связан ковалентной связью с β -(1,6)-глюканом, причем гликозидная связь занимает позицию 6 в N-ацетилглюкозамине и позицию 1 в глюкозе молекулы глюкана [44]. У дрожжей *S. cerevisiae* терминальный остаток восстановленной хитиновой цепи прикреплен β -(1 \rightarrow 4) связью к невосстановленному концу молекулы β -(1 \rightarrow 3)-глюкана [45]. У дрожжей 40-50% хитиновых цепей связаны с глюканом, а соотношение хитина и глюкана составляет 1:10. Возникает интересный вопрос, ответ на который свидетельствует об особых свойствах хитиновых цепей. Каким образом такое небольшое количество хитина влияет на сольubilизацию в горячей щелочи почти 70% глюкана? Оказалось, что это зависит от различной длины цепей хитина и глюкана, у последнего длина цепи около 1500, а у первого - около

100. Таким образом, относительно небольшое количество хитина может влиять на свойства глюкана, который в дрожжевой клетке превышает содержание хитина почти в 15 раз [45]. В процессе образования ковалентной связи между хитином и β -(1 \rightarrow 3)-глюканом принимает участие фермент *Chs3*, что молекула хитина первоначально связана с растворимым глюканом, который является предшественником нерастворимого глюкана, и что хитиновая цепь растет с восстановленной части полимера, и эта, только что синтезированная цепь, сразу переносится на глюкан [45].

Интересно, что у *Molusca* хитин связан ковалентной связью с белком и этот комплекс называют протеоглюканом. Помимо ковалентно связанных белков, часть их может быть ассоциирована с хитином в виде менее прочно связанного комплекса. У моллюсков хитин представлен, как и у грибов, β -хитином, однако, степень кристалличности хитина у *Cephalopodes* выше, чем у грибов. У последних также часть хитина, особенно у представителей *Neomycota*, связана ионными и ковалентными связями с белками. Недавно установлено, что у *Saccharomyces cerevisiae* β -1,6-гликозилированный маннопротеин связан поперечными связями с хитином, причем количество сшитых таким образом полиаминосахарида и маннопротеина увеличивается при снижении уровня β -1,3-глюкана [46].

У насекомых и других беспозвоночных хитин также всегда связан с белком либо ковалентными, либо ионными связями, образуя упорядоченную структуру [47]. Единственное исключение составляет в этом отношении β -хитин диатомовых водорослей [48]. Хитин может быть минерализован, в частности кальцинирован, или склеротизирован, благодаря связям с фенольными и липидными молекулами [49]. Отметим, что наиболее высокое содержание Ca^{2+} - в панцире краба *Cancer magister*, наименьшее - в КС муковых грибов. Хитин связан также с пигментами, присутствующими в КС грибов - с каротиноидами (β -каротином, ликопином). Химический состав КС в значительной степени определяет ее морфологию. Идеальной моделью для изучения этой зависимости может служить муковый диморфный гриб *Mucor rouxii*. При определенных условиях культивирования этот гриб образует мицелиальные или дрожжевые клетки, КС которых значительно отличаются по своему химическому составу [50]. Так, например, в КС мицелиальной формы было больше свободных и связанных липидов. Однако, в дрожжевой форме содержалось больше белка, пуринов, пиримидинов и особенно много маннозы (в пять раз больше, чем в мицелии *M. rouxii*). Обе формы клеток различались по толщине КС и содержанию в них хитозана, которого идентифицировано больше в мицелиальной форме *M. rouxii*. На ветвление гиф грибов оказывают влияние содержание в цитоплазме ионов кальция [51]. Медь и кобальт также влияют на состав КС грибов. Так, кобальт уменьшает содержание глюкозамина в КС *Cunninghamella blakesleana*, понижает количество щелочерастворимых нейтральных Сахаров, но увеличивает уровень белка. При этом меняется устойчивость КС к действию хитиназ и хитин мицелия легче гидролизуется этими ферментами [52].

Отложение хитина в КС грибов может изменяться под действием калкофлюора - флуоресцентной краски, которая используется как специфический краситель для хитина. Эта краска не влияет на биосинтез хитина, а только на его кристаллизацию, приводя к изменению КС и ее утолщению [53]. Интересно, что аналогичное явление отмечается при блокировке синтеза белка циклогексимидом. И в этом случае наблюдается утолщение КС *Blakeslea trispora* (приблизительно в два раза), причем увеличение размеров КС характерно для субапикальной части, однако, общее количество хитина практически не отличается от такового контрольного мицелия [54]. Следовательно, эти данные позволяют считать, что процесс образования микрофибрилл хитина не зависит от син-

теза белка. Аналогичные данные получены при изучении действия циклогексимида на архитектуру КС *Aspergillus niger* [55].

На образование хитина влияет также состав среды выращивания, возраст мицелия и фаза развития грибов. Наиболее подробно влияние этих факторов на уровень хитина было изучено у *A. niger* [56]. В данном случае хитин связан ковалентной связью с (3-глюканом и оба эти компонента КС образуют хитин-глюкановый комплекс. Проведенное исследование позволило установить три новых факта.

1. Состав сред является фактором, позволяющим влиять на выход хитина и глюкана. Усиленному образованию ХГК способствует наличие в средах сахарозы и аммонийного азота при сильном закислении среды до pH 2,0.

2. Установлено, что в процессе роста КС соотношение основных опорных биополимеров в ней практически не меняется, что свидетельствует о том, что структурные полисахариды формируются на самых ранних стадиях образования КС.

3. Содержание хитина и глюкана изменяется в процессе онтогенеза (от споры к мицелию), причем наиболее богаты хитином зрелые спороносы и мицелий в стадии идиофазы.

Изложенные выше данные, посвященные изучению состава и образования КС, представляют интерес для биотехнологии, так как позволяют получать мицелий, имеющий различный состав структурных полисахаридов и обладающий различной степенью прочности и толщиной КС. Это, в свою очередь, позволяет управлять морфологией мицелия. Например, показано, что рыхлый мицелий образуется в случае, если в КС преобладает глюкан. Если КС обогащены хитином, то мицелий имеет форму пеллетов [5]. А как установлено при производстве целого ряда БАВ, в том числе антибиотиков, морфология мицелия тесно коррелирует с его биосинтетической активностью. Следовательно, зная основные закономерности образования и строения КС грибов, мы получаем возможность управлять биосинтезом хитина и создавать биотехнологии, обеспечивающие наиболее высокий выход этого полиаминосахарида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Феофилова Е.Л., Немцев Д.В., Терешина В.М., Козлов В.П. // Прикл. биохим. микробиол. 1996. Т. 32. № 5. С. 483-492.
2. Феофилова Е.Л. // Там же. 2001. Т. 37. № 2. С. 141-155.
3. Феофилова Е.Л. // Там же. 1998. Т. 34. № 6. С. 597-608.
4. Феофилова Е.Л. Клеточная стенка грибов. М.: Наука, 1983. 315 с.
5. Немцев Д.В., Козлов В.П., Терешина В.М. и др. // Приклад. биохим. микробиол. 1998. Т. 34. № 1. С. 95-98.
6. Crestini C, Kamas B., Giovanozzi-Sermanni G. // Biotechnol. Bioeng. 1996. V. 50i P. 207-210.
7. Быков В.П. // Материалы III Всесоюз. конф. "Совершенствование производства хитина и хитозана из панцирьсодержащих отходов крыла и пути их использования". М.: ВНИРО, 1992. С. 3-7.
8. Феофилова Е.Л. // Приклад. биохим. микробиол. 1984. Т. 20. № 2. С. 147-160.
9. Дацун В.М. Технология переработки высокоминерализованных отходов рыбной промышленности // Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Калининград, 1996. 52 с.
10. Али Салем Омер. Разработка технологии получения хитина и хитозана из сепиона каракатицы // Автореф. дис. ... канд. технологии мясных, молочных и рыбных продуктов. М.: ВНИРО. 1995. 25 с.
11. 1190568 СССР. C12D3/60.
12. Феофилова Е.Л., Терешина В.М. // Материалы V конференции "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО. 1999. С. 76-78.
13. Farkas V. // Acta. Biotechnol. 1990. V. 10. P. 225-238.
14. Быков В.П. // Материалы V конференции "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. С. 15-18.

15. Gooday G.W. II J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. 1993. V. 74. P. 12S-20S.
16. Bartnicki-Garcia S. II Ann. Rev. Microbiol. 1968. V. 22. P. 87-108.
17. Wessels J.G.H., Sietsma J.H. II Encyclopedia of Plant Physiology New Series. 13 ed. 1981, Heidelberg: Springer-Verlag. P. 352-394.
18. Ruiz-Herrera J., Sentandreu R. // Current Topics of Medical Mycology. 1989. V. 3. P. 168-217.
19. Gooday G.W., Neil Gow, Brawn A., Shofield D., Muro C, McCeath K., Hunter L. II Proceedings of the international symposium of fungal cells in biodefense mechanism. Sendai Int. Center, Sendai, Miyagi, Japan. 1996. P. 239-245.
20. Gooday G.W., Trinci A.P.J. // The Eucaryotic Microbial Cell. Society for General Microbiology Symposium / Eds. Gooday G.W., Lloid D., Trinci A.P.J. Cambridge: Cambridge University Press. 1980. P. 207-257.
21. Kotecek P., Raclavsky V. // Folia Microbiol. 1999. V. 44. N 4. P. 397-400.
22. Yunat J., Gow N., Gooday G.W. II Ptotoplasma 1988. V. 146. P. 118-126.
23. Cabib E., Roberts R., Bover B. II Annu. Rev. Biochem. 1982. V. 52. P. 763-783.
24. Cabib E. // Adv. Enzymol. 1987. V. 59. P. 59-101.
25. Motoyama T., Kojima N., Horiuchi H., Ohta A. // Biosci. Biotech. Biochem. 1994. V. 58. N 12. P. 2254-2257.
26. Rast DM., Horssch M., Finer R., Gooday G.W. II J. Gen. Microbiol. 1991. V. 137. P. 2797-2810.
27. Gooday G.W., Zhu W.-Y., O'Donnel R.W. // FEMS Microbiol. Lett. 1992. V. 100. P. 367-392.
28. Reyes F., Calatagud J., Martinez M. // Ibid. 1989. V. 60. N 1. P. 119-124.
29. Kuhn P.J., Tricci A.P.J., Yung M.J., Gossey M.W. // Biochemistry of cell walls and membranes, L.-N.-Y.-Tokio: Springer-Verlag. 1990. 327 p.
30. Bartnicki-Garcia S., Bartnicki-Garcia D.D., Gierz G. II Can. J. Bot. 1995. V. 73 (Suppl. 1). P. 372-378.
31. Sietsma H., Wessels J.G. II Biochim. Biophys. Acta. 1977. V. 196, N 2. P. 225-239.
32. De Vries O.M.H., Fekkes M.P., Wosten H.A.B., Wessels J.G.H. II Arch. Microbiol. 1993. V. 159. P. 330-335.
33. Wosten H.A.B., Richter M., Willey J.M. II Fungal Genetics and Biology. 1999. V. 27. P. 153-160.
34. Белозерская Т.А. II Микология и фитопатология. 2001. Т. 35. В. 11. С. 3-11.
35. Wosten H.A.B., Ruardy T.G., Busscher U.J., Wessels J.G.H. // Colloids Surf. Biointerface 1995. V. 5. P. 189-195.
36. Ng W.L., Ng T.F., Rwan H.S. // FEMS Microbiol. Lett. 2000. V. 185, Iss 2. P. 139-145.
37. Бабицкая В.Г., Щерба ВВ., Иконников Н.В. // Прикл. биохим. и микробиол. 2000. Т. 36. № 4. С. 439-440.
38. Леенсон И.А. // Химия и жизнь. 2001. № 4. С. 30-39.
39. Brooks J., Shaw G. II Nature. 1968. V. 219. N 3. P. 532-533.
40. Gooday G.W., Green D., Fawcett W., Shaw S. II Arch. Microbiol. 1974. V. 101. P. 145-151.
41. Поцина В.В. II Усп. совр. биологии. 1999. Т. 119. № 6. С. 557-566.
42. Takashima M., Hammoto M., Nakase T. // System. Appl. Microbiol. 2000. V. 23. P. 69-70.
43. Zlotnik M., Fornander M.P., Bowers B., Cabib E. // J. Bacteriol. 1984. V. 159. N 3. P. 1018-1026.
44. Surarit R., Gopal P.K., Shepherd M.G. II J. Gen. Microbiol. 1988. V. 134. P. 1723-1730.
45. Kollar R., Petrakova E., Achwell C et al. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270, N 3. P. 1170-1178.
46. Kopteyn J.C., Ram A.F.G., Gross E.M. et al. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. N 20. P. 6279-6289.
47. Blackwell J., Weih M.A. Chitin in nature and technology / Eds. Muzzarelli R., Jeanaux C, Gooday G.W. N.Y.: Plenum Press, 1986. P. 23-28.
48. Gooday G.W. Inhibition on chitin metabolism / The biochemistry of cell wall and membrane in fungi Ed. P.J. Ruhn, A.P.J. Trinci, M.J. Jung, M.W. Goossey, L.G. Conning. Berlin: Springer-Verlag, 1990. P. 61-79.
49. Peter M.G., Kagel G., Keller R. Chitin in nature and technology / Eds. Muzzarelli R., Jeanaux C, Gooday G.W. N.Y.: Plenum Press, 1986. P. 20-22.
50. Bartnicki-Garcia S., Nickerson W.J. II Biochim. Biophys. Acta. 1962. V. 58. P. 102-119.
51. Grinberg A., Heath B. II Fungal Genetics and Biology. 1997. V. 22. P. 127-139.
52. Venkateswerlu G., Stotzky G. II Can. J. Microbiol. 1986. V. 32. N 8. P. 654-662.
53. Rico H., Miragall F., Sentandreu R. II Exp. Mycol. 1985. V. 9. P. 241-253.
54. Терешина В.М., Феофилова Е.Л. // Микробиология. 1981. Т. 50. № 3. С. 412-415.
55. Sternlicht E., Katz D., Rosenberg R.F. // J. Bacteriol. 1973. V. 114. P. 819-822.
56. Немец Д.В. Образование хитин-глюканового комплекса в процессе онтогенеза *Aspergillus niger* v. Tieghem // Дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 1998. 96 с.

ХИТИН ГРИБОВ: РАСПРОСТРАНЕНИЕ, БИОСИНТЕЗ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Е.П. Теофилова

Институт микробиологии РАН, Москва

teresh@beep.ru

Появление нового направления в биологии - науки о способности организмов выживать при действии неблагоприятных факторов, названной биохимической адаптацией к стрессу, вызвало новый интерес к хитину грибов. Было показано, что этот полиаминосахарид представляет собой первый "щит", спасающий клетку от наступления неблагоприятных условий. Накоплены данные, показывающие, что при изменении температуры, действии ядов, радиации и других отрицательных факторов происходит интенсивный синтез микрофибрилл хитина и утолщение клеточной стенки - "щита", защищающего клетку. Предполагают, что такую же роль хитин выполняет и у других эукариотов, и именно этим можно объяснить тот факт, что только грибы и беспозвоночные стали самыми многочисленными группами среди обитателей земного шара. Эта функциональная роль хитина в стратегии выживания делает понятной его уникальные физико-химические свойства, которые сейчас вызывают особый интерес у медиков.

О хитине грибов мы знаем мало, поэтому сводка данных о распространении этого полиаминосахарида, о его свойствах, биосинтезе и практической значимости представляется достаточно полезной и своевременной.

КРАТКИЕ ДАННЫЕ ОБ ОТКРЫТИИ ХИТИНА У ГРИБОВ

Первым исследователем, обнаружившим в 1799 г. хитин, был Хачетт [1], который, обрабатывая крабы, креветки и омары минеральными кислотами, получил желтоватого цвета хрящеподобное вещество. Название хитин было предложено Отье [2], который получил из майского жука рогоподобный материал. А несколько раньше Браконо [3] при обработке базидиомицетного гриба *Agaricus bisporus* разведенной теплой щелочью с последующей сухой перегонкой было получено соединение, представляющее собой неочищенный хитин, названный фунгином. После исследований Хакмана [4] хитином стали называть химически чистое вещество, полученное определенным методом и обладающее свойствами, приведенными ниже, а название "нативный хитин", часто употребляемое в литературе, предложили для природных комплексов хитина с различными клеточными веществами.

Строение хитина изучил Леддерхозе [5], который выделил из хитина *Arthropoda* аминсахар, названный глюкозамином, и уксусную кислоту, и показал, что эти соединения содержатся в хитине в эквимолекулярных количествах. В составе мицелия низших грибов (*Eomycota*) хитин был найден еще в 1895 г., а несколько позже Вислинг [6] с помощью специально разработанного микрохимического теста обнаружил этот биополимер не только у *Eomycota*, но и у представителей *Ascomycota* (*Aspergillus*, *Penicillium*).

В связи с тем, что выделение хитина из грибов представляет более сложный процесс по сравнению с хитином ракообразных, наши знания о хитине грибов или о микохитине, как его называют в последние годы, значительно ограничены. Однако с конца XX столетия в связи с обнаружением очень ценных медицинских свойств биополимеров клеточной стенки (КС) грибов, число исследований в этой области резко возросло, и наиболее ценный вклад в наши представления о динамике роста грибной гифы, регуляции в ней синтеза хитина и о роли этого полиаминосахарида в процессе морфогенеза внесли работы Гудея с соавторами [7, 8]. Основополагающее значение для развития представлений о роли хитина в КС грибов имели первые работы Бартински-Гарсия [9] и Весселс [10]. В СССР первая книга о биополимерах КС грибов, в том числе о хитине вышла в 1983 г. [11].

Исчерпывающая сводка данных о биосинтезе микрофибрилл хитина и о роли в этом процессе специальных везикул (хитосом) была опубликована в трудах симпозиума, посвященного КС и мембранам грибов [12]. Данные о наличии нескольких форм клеточных ферментов (хитиназ, деацетилаз, хитинсинтетаз), их роли в синтезе КС грибов, регенерации этой поверхностной структуры, об образовании грибных протопластов и гифальных взаимодействиях позволили к началу XXI столетия наиболее полно представить ключевую роль хитина в онтогенезе грибов [13-16]. На X Международном конгрессе по бактериологии и прикладной микробиологии, в Париже в 2002 г., в разделе, посвященном мицелиальным грибам, рассмотрены новые достижения полученные при изучении биосинтеза КС грибов.

ФУНКЦИЯ И БИОСИНТЕЗ ХИТИНА В КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ ГРИБОВ

Различная форма грибных клеток, таких как мицелий, дрожжи, почкующиеся клетки, плодовые тела, спорангиоспоры, зитоты, конидии, урединоспоры и др. зависит от их экзоскелета, представленного хитином. Следовательно, синтез хитина определяет внешний вид клетки, а также ее химический состав. Но кроме этих функций синтез хитина связан в КС с ее тургором, морфогенетическим развитием, синтезом липидов и активностью ряда ферментов, образующих КС грибов [16, 17], а также с ядерным аппаратом грибной клетки [18]. Наконец, роль хитина в КС вызвала в последние годы особый интерес в связи со способностью патогенных грибов контактировать с клетками растений и животных, нанося огромный вред сельскохозяйственным культурам и здоровью людей.

Мицелиальная форма грибной клетки определяется ее апикальным (поляризованным) ростом, причем рост КС происходит в два этапа и координируется синтезом хитина [19-24]. При этом показано, что при действии неблагоприятных температур количество хитина в КС *Cunninghamella japonica* увеличивается в 3-4 раза по сравнению с контрольным мицелием [24].

Установлено, что синтез хитина является ответвлением основного пути образования уридинфосфата-N-ацетил-D-глюкозамина (УДФАГА). Последний может использоваться как на синтез хитина, так и на образование долихола [26]. Первым соединением, которое используется на образование хитина, является трегалоза. Этот факт представляет собой интерес в связи с современными представлениями о роли трегалозы, которая образуется у грибов только в условиях стресса [27], что объясняет усиленный синтез хитина в дистальной части гифы при действии стрессоров.

Ранее предполагали, что биосинтез хитина у грибов после образования УДФАГА осуществляется по модели, предложенной еще в 1987 г. для клетки

дрожжей [19,20, 28]. В образовании УД ФАГА принимают участие два фермента: фосфоацетилглюкозаминмутаза и УДФ-ацетил-глюкозаминпирофосфорилаза. Дальнейшие этапы синтеза хитина осуществляются при участии фермента хитинсинтетазы (ХС) или хитинсинтазы (УДФ-2-ацетамидо-2-дезоксид-глюкоза:хитин 4-ацетамидодез-оксиглюкозилтрансфераза, КФ 2.4.1.16). Большим достижением было открытие двух фактов.

1. Хитинсинтетаза существует в виде зимогена и ее активация находится под контролем двух специальных факторов;

2. Наличие специальных клеточных структур - хитосом, содержащих и переносящих ХС, которая осуществляет синтез хитина.

Участие ХС в синтезе хитиновых нитей было подтверждено в опытах, в которых хитосомальная ХС, обработанная протеазой при добавлении УДФАГА и дивалентных катионов образовывала фибриллы хитина. Синтез хитина значительно стимулировался участием мембранного кофактора, содержащего липид (фосфолипид) [26]. Этот факт нашел объяснение в работах японских ученых [29], показавших, что активность ХС увеличивается в 2,7 раза при добавлении фосфатидилинозита. Активность фермента возрастает также в присутствии 1-пальмитоил-2-арахидоил- и 1-стеарил-2-арахидоил-фосфатидилхолина. В то же время ацильные цепи липидов, содержащие ненасыщенные жирные кислоты, ингибируют активность ХС.

Синтез хитина на модели Кабиба [28] пока удалось осуществить только *in vitro*, а как он происходит *in vivo* - пока не ясно. В последние годы возник ряд сомнений в привычной модели в связи с рядом новых факторов, полученных в опытах с *Arthropoda*. Возможно, у последних существует какая-то зависимость между катаболизмом гликогена и синтезом хитина. Кроме того, обнаружено, что ХС существует в нескольких формах, также как и хитиндеацетилаза, участвующая в образовании хитозана. Последний фермент у ржавчинных грибов существует в пяти различных формах [30].

В настоящее время считают, что в синтезе хитина значительная роль принадлежит еще одному ферменту - хитиназе (ХН). Ранее с наличием этого фермента связывали только деградацию молекулы хитина до N-ацетил-D-глюкозамина. Однако уже к 1990-м годам стало ясно, что ХС регулирует образование кристаллического α-хитина, так как в синтезе хитина его образование и кристаллизация являются процессами, отделенными временем и пространством. Вторая функция ХС - моделирование микрофибрилл хитина в зависимости от типа КС грибов. Третья - контроль процесса образования поперечных связей хитина с другими компонентами КС грибов и четвертая - контроль процессов автолиза, образования анастомозов и ветвлений [8].

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ХИТИНА В ПРИРОДЕ, МЕТОДЫ ЕГО ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ

Для различных организмов характерны четыре типа скелетных или опорных систем, отличающихся строением основного вещества, представленного целлюлозой, коллагеном, муреином и хитином. Целлюлоза в большей степени свойственна растениям, но встречается и составляет основную часть КС у псевдогрибов - оомицетов - которые относят теперь к новому ботаническому царству *Chromista* [31]. Опорные системы животных включают коллаген, а каркас КС бактерий (*Bacteria*, *Actinomycetes*) составляет глюколепид муреин - уникальный, свойственный только прокариотам гетерополимер, состоящий из последовательно соединенных 1,4-глюкозидными связями N-ацетил-муравовой

кислоты в N-ацетилглюкозамина. Несомненный интерес представляет наличие в муреине ацетилглюкозамина, который также входит в состав других, свойственных эукариотам, опорных систем - КС грибов, панцирей крабов, надкрыльев насекомых, построенных из хитина. О единстве в мире живой материи свидетельствует также тот факт, что деацетилированное производное хитина - хитозан, очень близок по структуре мукополисахаридам (МП) клеточных оболочек и внеклеточного вещества различных органов человека. Основным компонентом МП является гиалуроновая кислота, линейная цепь которой состоит из повторяющихся остатков N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкуроновой кислоты, соединенные $\beta(1\rightarrow4)$ -связью, а между собой - $\beta(1\rightarrow3)$ -связью [32].

В настоящее время в систематике Fungi в это царство относят только организмы, содержащие хитин. Поэтому в новой систематике в царство Fungi введены также хитинсодержащие *Microsporidia*, ранее относимые к *Animalia* [33].

Высокое содержание хитина отмечено в клеточной стенке *Allomyces* [34]. Грибы, принадлежащие к *Penicillium*, образуют значительно меньше хитина: *P. griseoflavus* - 5,5%, *P. notatum*, *P. terlikowskii*, *P. claviforme*, *P. digitatum* 24П - 4,5% [35]. У высших грибов, имеющих округлые плодовые тела, содержание хитина составляет 3-5%. Несколько больше хитина (6-7%) найдено в плодовых телах *Boletus edulis* [35]. Хитин является главным компонентом ножки *Coprinus cinereus* [36].

Содержание хитина значительно колеблется даже у грибов, принадлежащих к одному роду. Например, у *Agaricus bisporus* определяется только 5,7% хитина, а у *A. campestris* - 16,2% [37]. Среди грибов, принадлежащих к семейству Aspergillaceae, наблюдается такая же закономерность: *A. flavus*, например, содержит до 22,4% хитина, *A. niger* - 7,2%, *A. parasiticus* - 15,7% [38]. Количество хитина в составе некоторых грибов довольно значительно меняется и в пределах вида. Так у разных штаммов *A. niger* содержание хитина на восьмые сутки культивирования колеблется от 11,7 до 24% [38].

В дрожжах *Endomycopsis capsulata* и *Etemascus fertilis* хитин был обнаружен еще в 30-е годы [39]. В пекарских дрожжах глюкозамин был найден еще раньше [40]. Если предположить, что весь глюкозамин входит в состав только хитина, то пекарские дрожжи должны содержать около 0,5% хитина. Однако, когда для его идентификации применили метод рентгеноструктурного анализа, этот биополимер у *Saccharomycetes* обнаружить не смогли. В то же время при выделении хитина с помощью кислот и щелочей установили, что он содержится в 29 видах дрожжей, в том числе в пекарских и пивных. Более достоверные результаты были получены при сочетании химического метода выделения хитина с данными рентгеноструктурного анализа. Таким путем удалось идентифицировать хитин в составе ряда дрожжей, но не *Schizosaccharomyces* [41].

Необходимо отметить, что разные авторы использовали различные методы при определении содержания хитина у грибов. Это могло привести к значительному расхождению данных. Так, количество хитина можно учитывать либо по содержанию глюкозамина в клеточной стенке, либо выделяя его из мицелия последовательной обработкой кислотами и щелочами. В последнем случае выход хитина будет меньше из-за частичного его разрушения в процессе выделения.

Первое авторское свидетельство на получение хитина из грибов в СССР было выдано в 1976 г. [42]. В Германии интерес к грибному хитину возник еще в 1945 г., когда из *Fusarium sambucinum* попытались получать целлюлозоподобные волокна, состоящие из нативного хитина и одновременно грибные липиды [43]. В отличие от способов, предлагаемых ранее, в России был предложен метод получения хитина из мукоровых грибов, позволяющий благодаря использо-

ванию детергентов и растворителей получать высокие выхода хитина и в то же время не применять крепкие щелочи и кислоты, загрязняющие окружающую среду [44, 45].

Сущность способа выделения хитина из грибов, например, представителей *Mucorales* состоит в следующем. Отделенный от культуральной жидкости мицелий подвергали дезинтеграции, промывали водой и выдерживали в горячей воде (98° С) с добавлением 0,02-0,05% детергента и 1%-ного спирта. В качестве детергента использовали стиральные порошки (например "Лотос"), ЭДТА или додецилсульфата натрия (этап I). Процесс вели в течение 1 ч при постоянном перемешивании, используя 5-6 л воды на 1 кг сырой биомассы.

Эта операция, особенно в сочетании с предварительной дезинтеграцией, способствует повышению проницаемости клеточных стенок грибов и обеспечивает удаление компонентов протоплазмы (белков, липидов, углеводов), что дает возможность значительно сократить общепринятые процедуры по очистке хитина (в частности, число щелочных и кислотных обработок) и в то же время сохранить конечный продукт от деградации.

После отделения от реакционной смеси и промывки этап II очистки проводили при добавлении к осадку этанола с 1%-ной щелочью (10:1) при комнатной температуре в течение 30 мин при постоянном перемешивании. Далее реакционную смесь нагревали до 90-89° С и отделяли хитинсодержащий осадок. После отмывки в воде его нагревали далее с 1,5-2%-ной HCl в течение 25-30 мин при 95-98° С (этап III; очистка). После отмывки хитинсодержащего осадка водой его нагревали с 3%-ным NaOH при 95-98° С в течение 25-30 мин (этап IV; очистка). Полученный продукт обрабатывали спиртом для более быстрого подсушивания и лиофилизировали. Продолжительность процесса составляет 4-5 ч, выход хитинсодержащего осадка для аскомицетных грибов 10-16% от массы сухой биомассы. Для представителей семейства *Aspergillaceae* запатентован метод выделения так называемого хитин-глюканового комплекса (ХГК), позволяющий получать этот комплекс из отходов биомассы после получения лимонной кислоты [46].

Получаемый конечный продукт аскомицетных и базидиомицетных грибов представляет собой комплекс, содержащий до 60% глюкана, имеющего 1,3-α-связи (до 85-90%) и 1,4-α-связи, и только 23-25% хитина. Глюкан у этих грибов является щелоче- и кислотонерастворимым, т.е. соответствует свойствам хитина, и его отделение от хитина представляет большие трудности. При оптимизации выхода хитина из мицелиальных грибов существенное значение имеет способ выращивания мицелия, в частности, состав сред. Особое внимание следует уделить протеканию конечной стадии ферментации, которая должна проходить в отсутствие защелачивания среды, что может привести к автолизу клеточных стенок и резкому уменьшению выхода хитина. Как правило, более низкие значения pH среды в конце ферментации увеличивают содержание хитина в мицелии грибов. Положительное значение имеет и наличие в составе среды определенных источников углерода, например, такого источника углерода, как сахароза, на который выход хитина больше, чем на глюкозе (см. ниже).

Особый интерес представляет биомасса *Aspergillus niger*. В ряде европейских производств отход биомассы при получении лимонной кислоты составляет около 50 тыс. тонн, а хитина в такой биомассе содержится около 18-20%. Однако этот гриб, кроме хитина содержит еще щелочонерастворимый глюкан, который сложно отделять от хитина и выгоднее получать хитин-глюкановые и хитозан-глюкановые [47, 48] комплексы. Из ХГК можно получать хитозан, и в настоящее время по этому методу [49] хитозан выделяют из грибов родов

Allomyces, Aspergillus, Penicillium, Mucor, Choanephora, Zygorhynchus и др. Грибной хитозан получают в количестве до 10%, причем его выход определяется видом продуцента и условиями выращивания, степень деацетилирования (СД) составляет от 35 до 16%, молекулярная масса - от 100 до 450 кДа, т.е. значительно меньше, чем у хитозана, получаемого из панцирей крабов. Следует особо отметить, что из ХГК можно, наряду с хитином, получать глюкан.

В последние годы основное внимание уделяют получению хитозана из *Mucorales* - единственной группы грибов, способных образовать хитозан *in vivo*. Однако пока выход его невысок (5-10% от массы сухой биомассы), и поэтому выгоднее получать хитозан-подобный материал [50]. Его получают обработкой мицелия мукоровых грибов 0,5М NaOH и 2%-ной уксусной кислотой. Установлено, что сорбционная способность такого материала, например, в отношении ионов меди, значительно выше, чем хитина Crustaceae.

Разработан новый способ получения полисахаридных комплексов из грибов рода *Aspergillus*, учитывающий условия их выращивания. Получаемый ХГК содержит хитин с различной СД. Разработан также новый метод определения СД хитина, включающий определение D-глюкозамина методом Боаса, и ацетата методом ГЖХ [51]. Быстрый и упрощенный метод не полностью очищенного ХГК с целевым назначением как активный сорбент ионов кадмия разработан украинскими учеными [52].

Особый интерес вызывает в настоящее время способность грибов рода *Raecilomyces sp.* и *Aspergillus* образовывать полигексозамины, отличающиеся от хитина и содержащие как глюкозамин, так и галактозамин.

Низшие грибы, например мукоровые, имеют более "мягкий" хитин, который значительно быстрее, чем хитин аскомицетных и базидиомицетных грибов, деполимеризуется при обработке щелочами и кислотами. Поэтому используют 1%-ную щелочь и 0,5%-ную HCl. Кроме того, *Mucorales* содержат значительно больше липидов, вследствие чего целесообразно этап III указанной выше схемы провести при добавлении к 1%-ной щелочи 0,5% этанола. Выход хитина из мукоровых грибов составляет 4—5% от массы сухой биомассы.

Клеточная стенка мукоровых грибов не содержит глюкана, поэтому по указанной выше схеме можно получить высокоочищенный хитин, представляющий большую ценность для медицины. Выход хитина, полученного указанным выше методом, на 20-30% больше, чем при использовании общепринятых способов [53-55].

Полученный из грибов хитин анализируют на содержание D-глюкозамина, на содержание ацетильных групп и нейтральных сахаров. Необходимыми характеристиками являются также ИК-спектры и рентгенограммы выделенного продукта. Полезную информацию о свойствах грибного хитина дает изучение действия таких ферментов, как хитиназа (хитинглюканогидролаза) и хитобиаза (хитобиазацетиламинодезоксигидролаза). Предварительную оценку полученного хитина проводят по следующим критериям. Это должен быть белый продукт, не растворимый в воде, органических растворителях и сильных кислотах, но слаборастворимый в тиоцианате лития при температуре 60° С. Используют также данные электронной микроскопии, согласно которым хитиновый материал должен быть свободен от мембран, цитоплазмы, и после обработки уранилацетатом и реактивом Рейнольдса должен обнаруживать фибриллярную структуру.

Количественное определение хитина проводят либо прямым методом (путем взвешивания выделенного продукта), либо косвенно, измеряя содержание N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкозамина. В основе количественного опреде-

ления этих соединений лежат различные модификации метода Элсона-Моргана. Для определения глюкозамина применяют также метод щелочной дистилляции. Помимо химических методов используют методы определения хитина с помощью фермента хитиназы. О количественном содержании хитина судят также по числу N-ацетильных групп, определяя содержание либо уксусной кислоты методом дистилляции, либо глюкозамина и N-ацетиллов методом газо-жидкостной хроматографии. Следует отметить, что оценка содержания хитина путем учета N-ацетиллов более правильна, поскольку расчет по D-глюкозамину включает данные, соответствующие содержанию не только хитина, но и его деацетилированной формы - хитозана.

Хитин мицелиальных грибов отличается от хитина других биологических объектов по своим физико-химическим свойствам. У всех исследованных грибов хитин содержит меньше азота, чем хитин *Arthropoda*.

Хитины, полученные из грибов и других природных источников, отличаются и по степени кристалличности. Наиболее высококристалличной формой является хитин *Arthropoda* (краба *C. magister* и криля) и гидроидов [45]. Сравнение хитинов грибов показывает, что хитин плодовых тел *A. bisporus* имеет более кристаллическую форму, а наименее упорядоченную структуру и большее число аморфных областей имеет хитин муковых грибов.

Отличие хитина грибов от хитинов, полученных из других природных источников, проявляется и в составе его мономеров. Как отмечалось выше, из аскомицетных и базидиомицетных грибов получают трудноразделимый комплекс кислото- и щелоченерастворимых глюканов и хитина. Поэтому при кислотном гидролизе этого комплекса присутствует не только глюкозамин, но и глюкоза. Хитин низших грибов порядка *Mucorales* при жестком кислотном гидролизе деполимеризуется только до глюкозамина. Однако в кутикуле морских обитателей *Polamens* и в гребешке *Sepia*, а также у полизоана *Scrupocellaria berthelotti* конечным продуктом гидролиза являются галактозамин и рамнозамин [53, 54], т.е. и по составу мономеров имеются отличия в природных образцах хитина.

Хитины грибов различаются по СД. Наибольшее число ацетильных групп имеет хитин *Arthropoda*, хитинглюкановый комплекс аскомицетных грибов менее ацетилирован из-за наличия глюканов. Среди муковых грибов более высоким содержанием ацетильных групп отличается хитин *C. japonica*, а также *A. coerulea*, хитин насекомых, в частности рыжего таракана *Blattella orientalis*, ацетилирован более сильно, но меньше, чем хитин крабов [56].

Отличия в физических свойствах природных хитинов различного происхождения выявляются также при изучении их ИК-спектров. Характеристические полосы для хитина в ИК-спектре лежат в областях 3265, 3105, 1655 - 1620 (амид I) и 1550 см⁻¹ (амид II) [53]. Наиболее заметные отличия хитинов проявляются в области 1000-1100 см⁻¹ и в соотношении пиков амид I и амид II.

Установлено также, что хитин грибов не только отличается от хитина крабов, насекомых и водорослей, но и достаточно специфичен для определенного вида грибов. Особенно заметные различия отмечаются в физико-химических свойствах хитинов высших и низших грибов. Полученные данные представляют интерес с практических позиций, учитывая установленные корреляции между кристалличностью хитина и его сорбирующей способностью [56]. Как правило, хитин грибов лучше сорбирует ионы тяжелых и радиоактивных металлов [57], причем на активность сорбционных процессов большое влияние оказывает наличие в КС грибов глюкана и хитозана. Показано также, что сорбционная способность клеток грибов меняется в зависимости от стадий морфогенеза и зависит от возраста погруженно растущего мицелия [58].

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ХИТИНА ГРИБОВ

Хитин грибов находит пока ограниченное практическое использование по сравнению с хитином ракообразных. Последний уже давно применяется в разных областях хозяйственной деятельности человека, а в настоящее время наиболее интенсивно в технологии готовых лекарственных средств в качестве биологически активных веществ и вспомогательных материалов. Но именно в этой отрасли хитин грибов может стать активным конкурентом хитину *Arthropoda*. Объяснить этот факт можно следующими причинами.

Во-первых, открытием ценных лекарственных свойств биополимеров клеточной стенки грибов, а именно структурных полисахаридов и белков. Особый интерес в этой области представляет японский гриб *Lentinus edodes* (Shiitake), содержащий в шляпке и ножке 4- и 5% хитина соответственно. Особые лечебные свойства этого гриба связывают с наличием глюканов и особенно полиаминосахаридов, в том числе хитина. Указанные выше соединения обладают выраженной антираковой активностью и полученный в Японии на основе этих соединений препарат "Лентинан" используется для лечения онкозаболеваний. В настоящее время установлено, что и другие высшие грибы (*Neomycota*), принадлежащие к семействам *Polyporaceae*, *Tricholomataceae*, *Agaricales*, также содержат в КС высокомолекулярный гетерогликан и полиаминосахариды, обладающие выраженной антираковой активностью.

Во-вторых, к настоящему времени установлено наличие ранозаживляющей активности мицелия хитина низших грибов (*Eomycota*), в частности муконовых грибов. Сейчас в России имеется только один (разрешенный Минздравом в 1996 г.) препарат "Микоран", созданный на основе хитина мукового гриба *Blakeslea trispora*. "Микоран" рекомендован к использованию как ранозаживляющее средство с целевым противоожоговым назначением [59]. Работы по изучению ранозаживляющего действия мицелия низших грибов ведутся в настоящее время в Австралии и Великобритании, однако, в этих исследованиях используют другой продуцент *Mucorales* - *Phycornyces blakesleeanus*.

Благоприятный эффект мицелия низших грибов на заживление ран объясняют способностью стимулировать активность пролиферации фибробластов, которые располагаются на микрофибриллах хитина [60]. Кроме того, активному заживлению ран способствует также свойство хитина грибов генерировать микроколичества перекиси водорода. В зарубежных работах предлагается даже накладывать на раны в целях экономии стерильный, лиофильно высушенный мицелий, не выделяя полиаминосахариды. Предполагается, что использование мицелия *Mucorales* обеспечит одновременно и защиту от опасного микроорганизма, способствующего нагноению ран - синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*).

На основе ХГК высших грибов (*Basidiomycetes*) создан новый препарат, состоящий из хитина, глюкана и меланина. Этот препарат, названный "Микотон", предложено использовать для лечения ряда заболеваний, вызываемых бактериями и вирусами [61].

Особый интерес ХГК вызывает как аналог пищевых волокон. Эти волокна сорбируют в желудочно-кишечном тракте канцерогенные вещества, ионы тяжелых и радиоактивных металлов, активируют деятельность желудка. В последние годы пищевым волокнам придается особое значение в профилактической медицине в связи с их возможным антиканцерогенным и антимуtagenным эффектами [62].

Полиаминосахариды находят в последние годы все большее применение в сельском хозяйстве. Это обусловлено такими их свойствами, как биосовместимость, отсутствие токсичности, высокая способность к комплексообразованию. Препараты на основе хитина и хитозана крабов, а в последние годы и ХГК грибов применяют в сельском хозяйстве в США, Японии и Канаде. Ими проводят предпосевную обработку семян, что увеличивает урожайность сельскохозяйственных культур и устойчивость к грибковым заболеваниям. Аналогичные данные о хитозане *Arthropoda* получены в работе [63]. Показано, что устойчивость к корневой гнили и головне у ячменя значительно возрастает при применении препарата "Микосан", содержащего глюканы базидиомицетных грибов и хитозан [64].

В Японии специальные фирмы ("Taiyo Chemical Industry Co.", "Nisshia Ksei Co.") разработали стимулятор роста растений, состоящий из хитозана, органических кислот и аминокислот. Хитозан действует на *Fusarium solani*, останавливая рост этих патогенных для растений грибов. Органические кислоты способствуют тому, что почвенные бактерии быстрее растворяют фосфорные соединения почвы, облегчая тем самым корням растений сорбцию фосфорной кислоты. Аминокислоты генерируют этилен, служащий растительным гормоном, что также стимулирует рост растений [65].

Еще одним направлением в практическом использовании хитина или ХГК грибов является получение на его основе сорбирующих средств, которые могут быть более эффективными, чем такие промышленно доступные сорбенты, как, например, ХИТОПЕРЛ(ы) (Hitoperl, Япония). Хитин и хитозан грибов хорошо комплексируются с гипсом [66], целлюлозой, торфом, асбестом [67], что закладывает основу для создания более дешевых и доступных сорбирующих средств. Высокая сорбирующая способность ХГК *A. niger*, зависящая от условий культивирования [68].

Наконец, учитывая, что мукоровые грибы содержат природный хитозан, планируется использовать их мицелий для создания "нетканых" материалов. Эти мицелиальные материалы обладают ценными свойствами - токсическим действием в отношении ряда патогенных грибов, вызывающих кожные микозы, а также ранозаживляющей активностью, что позволяет применять их для создания специального лечебного белья и как прокладочные материалы в обувной промышленности.

Возможно, что "мицелиальные нити", как называют такой материал, могут быть использованы и для получения "вечных" сортов бумаги. В настоящее время метод получения бумаги на основе хитозана разработан в США и находит уже практическое использование. ХГК грибов имеет положительный заряд в интервале pH выше трех и ниже девяти, что позволяет использовать этот грибной комплекс вместо асбеста в фильтровальных материалах. Эти свойства ХГК дают возможность снизить аэродинамическое сопротивление, увеличить пыле- и грязеемкость, придать бумаге и картону адсорбционные свойства, позволяющие использовать эти материалы в качестве фильтров для очистки жидких и газообразных сред от аэро- и гидрозолей.

Созданные на основе ХГК грибов в ВНИИИБП в г. Щелково опытные образцы картона не уступают по свойствам импортным фильтрам марки EKS и позволяют заменить канцерогенный асбест [69].

Предложено использовать ХГК *A. niger* в виде пищевой добавки к хлебным и кондитерским изделиям [70]. Такие добавки удлиняют сроки хранения хлеба и препятствуют процессу его черствления. Тем самым, отчасти решается проблема утилизации отходов от производства лимонной кислоты, которые составляют от 1,0 до 1,2 тыс. т. в год.

В заключение следует особо подчеркнуть, что перспективность практического использования полиаминосахаридов грибов может оказаться в ближайшие годы столь же значимой, как и хитина *Arthropoda*. Однако это затруднено недостаточным знанием физико-химических свойств, методов выделения и видовым разнообразием грибного хитина. Не следует забывать, что по химическим характеристикам хитин грибов значительно отличается от такового ракообразных, гидроидов и насекомых, подобно тому, как целлюлоза растений отличается от целлюлозы бактерий *Acetobacter xylinum* и псевдогрибов *Chromista*, принадлежащих к *Oomycetes* (*Phytophthora*, *Pythium*).

В КС грибов хитин находится не в свободном состоянии, а связан ионными или водородными связями с полисахаридами, липидами, белками и микроэлементами, причем эти комплексы, например, ХГК или в мукоране низших грибов, связанные с белком, являются более прочными и специфичными, чем природные белковые комплексы хитина в кутикуле беспозвоночных. Наш опыт показывает, что грибной хитин менее устойчив к действию кислот и щелочей, чем хитин *Arthropoda*. Все это создает определенные трудности при выделении хитина грибов и требует создания специальных методов, зависящих от источника.

Интересно, что один из первых исследователей, пытавшихся создать метод выделения грибного хитина для практических целей [39], писал о том, что при получении хитина из грибов теряется значительное количество (до 30-40%) полимера, особенно при жесткой обработке кислотами и щелочами. Следует учитывать, что легче получать хитин из грибов *Mucorales*, чем из ХГК *Aspergillaceae*. Кроме того, на процесс выделения хитина, особенно на его конечный выход сильно влияют условия выращивания, а именно состав среды и фаза роста гриба. Основным условием получения высоких выходов хитина и его комплексов является создание в процессе ферментации определенных (более "кислых") pH среды и недопустимость автолитических процессов, ведущих к лизису КС и резкому уменьшению количества полиаминосахаридов. На содержание хитина в КС ряда *Aspergilli* влияет уровень кислорода в среде и свет [71], однако, процесс образования хитина является более устойчивым к действию внешних факторов, чем других структурных полисахаридов КС, например, нигерина (1-3)- α , (1-4)- α -глюкана. Показано, что на содержание в КС грибов хитина и глюкана влияет также соотношение углерода и азота в среде [72].

Таким образом, отработка методов выделения хитина является задачей номер один в биотехнологических процессах его получения. Возможно, что более перспективными и дешевыми могут оказаться методы, направленные на получение неочищенного, нативного хитина. Особое значение это будет иметь при создании на базе хитина новых медицинских средств, так как грибы содержат в комплексе с хитином вещества, очень ценные для лечения онкозаболеваний, и антиоксиданты, входящие в состав медицинских препаратов, направленных на "омолаживание" пациентов.

В целом хитин грибов более, чем хитин ракообразных, привлекателен не только для медицины, но и в создании новых, "нетканых" материалов и сорбирующих средств. Ценность хитина грибов состоит также и в том, что его продуценты обеспечивают при биотехнологическом методе получения экологически чистый конечный продукт, что особенно важно для медицинского применения хитина. Именно в этой области, на наш взгляд, должно быть основное и перспективное использование грибного хитина и его комплексов с другими структурными полисахаридами КС грибов. Поэтому и возникла новая область медицины - микологическая фармакопея, продукты которой успешно завоевывают свое место на медицинском рынке.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hachett C.* // Phil. Trans. Roy. Soc. London. 1799. P. 315-334.
2. *Odier A.* // Mem. Soc. Hist. Nat. Paris. 1823. V. 1. P. 29.
3. *Braconnot H.* Sur la nature des champignons // Ann. Chim. Phys. 1811. V. 79. P. 263.
4. *Hackman R.H.* // Austral. Journ. Biol. Sci. 1960. V. 13. P. 569.
5. *Ledderhose G.* // Hoppe-Seilers Z. Physiol. Chem. 1878. Bd. 2. S. 213.
6. *Wisselingh G.* // Jahrb. Wiss. Bot. 1898. Bd. 31. S. 619.
7. *Gooday G.W.* // Mycol. Res. 1995. V. 99. N 4. P. 385-394.
8. *Gooday G.W., Wei-Yun Zhu, O'Donnel R.* // FEMS Microbiol. Letters. 1992. V. 100. P. 387-392.
9. *Bartnicki-Garcia S.* // Phytochem. Phytochemistry. N.Y., London, 1970. P. 155-194.
10. *Wessels J.G.H., Freger D.R.* // Biochem. Biophys. Acta. 1972. V. 273. P. 346.
11. *Феофилова Е.П.* Клеточная стенка грибов. М.: Наука. 1983. 320 с.
12. *Kuhn P.J., Trinci A., Jung M.J.* // Biochemistry of cell walls and membranes of fungi. 1990. Berlin, Heidelberg, Tokyo: Springer-Verlag. P. 327.
13. *Феофилова Е.П., Немцев Д.В., Терешина В.М., Козлов В.П.* // Прикл. биохим. микробиол. 1996. Т. 32. № 5. С. 483-490.
14. *Peberdy J.F.* Fungal cell wall - a review // Biochemistry of cell walls and membranes of fungi. 1990. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Tokyo. P. 327.
15. *Kollar R., Reihold B.B., Petrakova E.* et al. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 17762-17775.
16. *Kopcecek P., Raclavsky V.* // Folia Microbiol. 1999. V. 44. N 4. P. 397-400.
17. *Cabib E.B., Bowers B., Sburlati A., Silvermann S.J.* // Microbiol. Sci. 1988. V. 5. N 12. P. 370-375.
18. *Камзолкина О.В.* // Микробиология. 1996. Т. 65. № 2. С. 228-234.
19. *Феофилова Е.П.* // Биол. науки. 1981a. № 6. С. 5-20.
20. *Феофилова Е.П.* // Там же. № 11. С. 5-25.
21. *Gooday G.W.* // J. Gen. Microbiol. 1977. V. 99. P. 1-15.
22. *Gooday G.W.* // J. Appl. Bacter. (Suppl). 1993. V. 74. P. 12S-20S.
23. *Gow N.A.R.* // Microbiology. 1994. V. 140. P. 3193-3205.
24. *Gooday G.W., Cow N., Brown J.P.* et al. // Proc. Int. Symp. On Fungal Cells in Biodefense Mechanisms. Japan. 1997. P. 239-245.
25. *Кузнецова Л.С., Феофилова Е.П., Григорян Г.Л., Пивоварова Т.А.* // Микробиология. 1987. Т. 56. № 6. С. 995-1000.
26. *Lezica R., Quesada-Allue L.* // Methods Plant Biochem. 1990. V. 1. P. 443-474.
27. *Феофилова Е.П.* // Микробиология. 1994. Т. 63. № 5. С. 757-776.
28. *Cabib E.B.* // Adv. Enzymol. 1987. V. 59. P. 59-100.
29. *Machida S., Todoriki S., Yamamatsu S., Saito M.* // FEMS Microbiol. Letters. 1994. V. 115. P. 235-240.
30. *Deising H., Siegrist J., Kafetzopoulos D.* // 6-th Int. Fungal Spore Conf. UNJ Konstanz. Germany. 1996. P. 36.
31. *Cavalier-Smith T.* // Biol. Rev. 1998. V. 73. P. 203-266.
32. *Комаров Б.А.* // Материалы VI Междунар. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО. 2001. С. 187-198.
33. *Феофилова Е.П.* // Приклад. биохим. микробиол. 2001. Т. 37. № 2. С. 141-155.
34. *Aronson J.M., Machlis L.* // Amer. J. Bot. 1959. V. 46. P. 297.
35. *Беккер З.Э.* Физиология грибов и их практическое использование. М.: Наука. 1963. 163 с.
36. *Gooday G.W.* // Rept. Tottory. Mycol. Inst. (Japan). 1975. V. 12. P. 151-160.
37. *Mendoza G.C., Leab A., Novaes-Lediea M.* // Canad. J. Microbiol. 1979. V. 25. P. 32-41.
38. *Blumental H.J., Roseman S.* // J. Bacteriol. 1957. V. 74. P. 222-225.
39. *Schmidt M.* // Arch. Mikrobiol. 1936. Bd. 7. S. 241-268.
40. *Meisenheimer J.* // Chem. Zbl. 1915. Bd. 2. S. 1259.
41. *Kreger D.R.* // Biochim. Biophys. Acta. 1970. V. 3. P. 1-14.
42. А.с. 54105 СССР. А61К35/66.
43. *Ratlidge C.* // Progress Industrial Microbiol. 1983. V. 16. P. 119-206.
44. А.с. 626700 СССР. А61К 35/10.
45. А.с. 1190568 СССР. C12D 3/60.
46. Пат. 2121505 РФ. C08B37/02; C12N 1/14.
47. *Muzzarelli R.A.A.* Chitosan-Glucan-Komplex und Verfahren zu dieser Herstellung // Pat. 293802 FRG. C 08B37/08.
48. Pat. 4368322 US. C08 B 37/08.

49. Velichkov A.D., Niholova S.F., Veljanov B.K. // Докл. Болг. АН. 1990. Т. 43. № 10. С. 69-71.
50. Vermeulen C.A.A., Wessels J.G.U. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 158, N 1. P. 411-415.
51. Терешина В.М., Меморская А.С., Феофилова Е.П. и др. // Микробиология. 1997. Т. 66. N 1. С. 84-89.
52. Унрод В.И., Лега Ю.Г., Солодовник Т.В. // Докл. VI Междунар. конф. "Новые достижения в исследованиях хитина и хитозана". М.-Щелково: Изд-во ВНИРО. 2001. С. 58-60.
53. Jeuniaux C. // Comprehensive Biochemistry. Amsterdam Elsevier Press. 1971. P. 105-118.
54. Muzzarelli R.A.A. Chitin. London, N.-Y., Pergamon Press. 1977. 375 p.
55. Smucker R.A. // Biochem. System Ecology. 1991. V. 19. N 5. P. 357.
56. Феофилова Е.П., Марьин А.П., Ушанова А.Е. и др. // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1982. № 3. С. 361-369.
57. Пат. 1823397 РФ. C02B 1/32
58. Feofilova E.P., Mar'in A.P., Tereshina V.M. et al. // Res. Envir. Biotechnology. 2000. V. 3. P. 61-69.
59. Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С. и др. // Микробиология. 1999. Т. 68. № 6. С. 834-837.
60. Chang L.Y., Schmidt R.J., Hamlyn P.F. et al. // J. Biomed. Material Res. 1994. V. 28. P. 120-121.
61. Gorovoj L., Burdukova L. // Abstracts Book. 1st Int. Conf. European Chitin Soc. 1995, Brest, France, P. 22.
62. Kogan G., Machova E., Chorvatovicova D., Sandula J. // Proc 3rd Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symp. 1998. P. 372-379.
63. Мигушева Р.Ю., Воропаева Н.Л., Рубан И.Н. и др. // Химия природных соединений. 2000. Т. 2. С. 97-99.
64. Канарская З.А., Гамаюрова В.С., Канарский А.В., Гуславский А.И. // Докл. VI Междунар. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана" М. ВНИРО. 2001. С. 25-26.
65. Набауллин А.А., Строилова Ф.А., Ванюшкин В.А. // Совершенствование производства хитина и хитозана из панцирьсодержащих отходов. Тр. III Всесоюз. конф. М.: ВНИРО. 1991. С. 75-77.
66. Феофилова Е.П., Марьин А.П., Шляпников Ю.А. // Фундаментальные науки - народному хозяйству. М.: Наука. 1990. С. 270-271.
67. Nyoshi H., Shimuda R., Watanabe K., Onodera K. // Biosci. Biotech. Biochem. 1992. V. 56. N. 12. P. 1901-1905.
68. Нудьга Л.А., Ганичева С.И., Петрова В.А. и др. // ЖПХ. 1997. Т. 70. № 2. С. 242-246.
69. Горовой А.Ф., Кошевский И.И., Теслюк В.В., Трутнева И.А. // Материалы VI Междунар. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО. 2001. С. 78-81.
70. Кулев Д.Х., Львова Е.Б. // Там же. С. 204-207.
71. Feima J. // Acta Physiol. Plant. 1983. V. 5. P. 123-128.
72. Немцев Д.В., Козлов В.П., Терешина В.М. и др. // Прикл. биохим. и микробиол. 1998. Т. 34. N 1. С. 95-98.

СТРУКТУРНАЯ НЕОДНОРОДНОСТЬ КАК ФАКТОР ИЗМЕНЧИВОСТИ СВОЙСТВ ХИТИНА И ХИТОЗАНА

А.И. Гамзазаде

Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН,
agamzazade@ineos.as.ru

Хитин и, особенно, хитозан в силу специфики их получения в гетерогенных условиях не являются и практически не могут быть однородными по химическому строению полимерными соединениями или гомополимерами, поэтому обобществленное обозначение "хитин/хитозан" вполне отражает их строение как нерегулярных сополимеров. Подобная структурная неоднородность соответственно усиливается в случае производных хитина/хитозана, поскольку они также образуются в результате незавершенных полимераналогичных реакций этих биополимеров. Это обстоятельство крайне затрудняет идентификацию полученных структур, однако возникающая при этом "разнозвенность" в цепях данных полимеров придает им большее многообразие в виде новых структурных "изомеров", что позволяет в случае контролируемого процесса расширить рамки соотношения структура-свойства производных хитина/хитозана. В связи с этим важное значение имеет возможность оценки структурных факторов, обуславливающих композиционную или структурно-молекулярную неоднородность хитина/хитозана и их производных.

КОМПОЗИЦИОННАЯ НЕОДНОРОДНОСТЬ ХИТИНА

Известно, что хитин в свободном состоянии в природе не встречается, а находится в виде комплекса с различными соединениями (гликанами, белками и др.). Он практически не растворяется в большинстве растворителей, что не позволяет экстрагировать его из природного сырья в промышленных масштабах. Единственным практическим способом его выделения остается удаление сопутствующих ему в природе веществ. Поэтому конечный продукт в реальных условиях содержит, как правило, остаточные или примесные количества этих веществ.

Для хитинов, получаемых из ракообразных с "жестким" панцирем (например, крабы), наиболее трудно удаляемым компонентом являются фрагменты ковалентно связанного белка. В этом убеждает также проведенный анализ об-

разцов хитина на содержание белка после различной продолжительности депротенинирования полимера. Методом исчерпывающего кислотного гидролиза полимера с последующим хроматографированием полученной смеси на наличие в ней аминокислот было показано, что щелочная обработка декальцинированного хитина с содержанием белка около 22% приводит к снижению белка за первый час примерно до 4% и лишь за 5 ч - до 0,3-0,4%. Обычно же содержание остаточного белка в хитине, полученном в неспециальных условиях, чаще всего составляет не менее 0,5%, следовательно, хитин представляет собой, по существу, гликопротеин.

Для максимально возможной очистки хитина от белка следует, очевидно, повысить эффективность применяемых обработок, например, за счет разрушения кристаллической структуры полимера. Одним из таких способов является перевод хитина в коллоидное состояние [1], согласно которому щелочную суспензию хитина подвергают замораживанию-размораживанию и получают достаточно однородную гомогенную фазу. При этом, варьируя концентрацией щелочи в системе, например в 19%-ном NaOH (эвтектическая связь) или в 25%-ном NaOH с объемной гидратной оболочкой ($7 \text{ H}_2\text{O}$), можно получать коллоидные растворы с различной степенью дисперсности и соответствующие им продукты с различной надмолекулярной структурой. При длительном хранении в комнатных условиях полученные растворы постепенно желеют вследствие деацетилирования хитина, в результате чего в конечном счете образуется хитозан. Для предотвращения этого процесса концентрации щелочи в системе должна быть снижена до 5-10%, что в дальнейшем позволяет за счет активации системы или введения в нее специальных добавок (например, ПАВ) провести дополнительное более эффективное депротенинирование хитина. Как видно, проблема получения максимально очищенного от белка или "безбелкового" хитина весьма сложна, так как связана с необходимостью введения дополнительных стадий обработки и соответствующего технологического оборудования в традиционную промышленную технологию и, следовательно, удорожанием конечного продукта.

Хитин в качестве гликопротеина может представлять самостоятельный интерес благодаря его особым биологическим, сорбционным и другим физико-химическим свойствам. Так, хитин-белковый комплекс (ХБК), содержащий около 10% белка, обнаруживает, в отличие от хитина, повышенное набухание и приемлемую растворимость в водных средах, в том числе, и в присутствии альгината натрия [2]. Это обусловлено тем, что такой ХБК, благодаря наличию в нем определенного числа аминокислотных остатков, обладает в достаточной степени одновременно гидрофильной и разветвленной структурой. Полученные коллоидные системы такого ХБК в водных растворах альгината натрия вполне текучи и устойчивы во времени, что позволяет формировать на их основе сферически гранулированные или иные его препаративные формы. Важно отметить при этом, что эти сорбенты также проявляют существенно более высокую сорбционную активность, чем хитин, при извлечении ряда тяжелых и радиоактивных металлов из технологических растворов.

Известно, что в панцирьсодержащем сырье (ПСС) общее содержание структурного и мышечного белка часто превышает 20%, поэтому основная задача при выделении ХБК заключается в получении комплекса, в котором хитин ковалентно связан с белком. Это достигается обработкой ПСС протеолитическими ферментами, которые гидролизуют в основном мышечный белок и практически не затрагивают из-за своей высокомолекулярной природы структурный белок, находящийся в малодоступных для ферментов межцепных слоях ПСС.

Несмотря на достаточную изученность ХБК, в том числе, в отношении его структуры и природы связи между хитином и белком [3], имеется крайне мало данных относительно влияния белковых (пептидных) фрагментов в хитине на его биологические свойства. Установлено лишь наличие нематоцидальной активности ХБК [4], что подтверждает необходимость изучения его других возможных биологических свойств, связанных, например, с рострегулирующей (гормональной) или иммуногенной активностью. Между тем отсутствие интерпретации и учета подобных данных может быть источником ошибки в оценке природы наблюдаемого эффекта и невоспроизводимости свойств испытуемого хитина.

Таким образом, одним из важных условий успешного применения хитина могут быть знание композиционного состава полимера, в частности, доли его белковой составляющей и анализ ее влияния на функциональные свойства.

СТРУКТУРНО-МОЛЕКУЛЯРНАЯ НЕОДНОРОДНОСТЬ ХИТОЗАНА

Композиционная неоднородность, присущая хитину, сохраняется и в хитозане. Несмотря на жесткие условия обработки хитина крепкой щелочью, в полученном хитозане, как правило, имеются остатки белка, которые существенно влияют на физико-химические свойства образующегося хитозана [5]. Так, было показано, что процесс деацетилирования образцов хитина с 5,9% и 13,7% белка в обоих случаях сопровождается немонотонным снижением молекулярно-массовых характеристик. Хотя кривые изменения этих характеристик в процессе реакции имеют идентичную форму, однако они сдвинуты по времени для каждого образца, что может явиться одной из причин невоспроизводимости свойств хитозанов.

В отличие от хитина, хитозану свойственна также и структурная неоднородность, обусловленная неполной завершенностью реакции деацетилирования хитина. Причем в результате этого содержание остаточных ацетильных групп в хитозане может достигать 30%, и характер распределения этих групп по цепи полимера может заметно влиять на некоторые физико-химические свойства хитозана. Вообще говоря, распределение ацетильных групп в хитозане, очевидно, будет зависеть от степени кристалличности или соотношения кристаллических и аморфных областей используемого хитина, так как реакция деацетилирования последнего легче протекает именно в аморфных областях. Вследствие этого распределение остаточных ацетильных групп в хитозане может иметь преимущественно блочный характер, а длина блоков, очевидно, будет зависеть от размера и расположения аморфных областей хитина.

Влияние блочного распределения ацетильных групп на гидродинамические и реологические свойства растворов хитозана практически не изучалось, однако можно предположить, что неустойчивость разбавленных растворов хитозана во времени, выражающаяся в снижении их вязкости, обусловлена, главным образом, блочным строением полимера. Действительно, последнее может способствовать компактизации (сегрегации) макромолекул хитозана в растворе за счет образования внутримолекулярных водородных связей, в результате чего наблюдается понижение вязкости его растворов. Тот факт, что рассматриваемый эффект обусловлен структурной перестройкой и не связан с деструкционными процессами подтверждается тем, что в присутствии акцепторов водородной связи таких, как мочевины или дихлоруксусная кислота, вязкостные свойства исследуемых растворов хитозана остаются неизменными в течение длительного времени [6].

Блочное строение хитозана может влиять и на реологическое поведение его умеренно концентрированных растворов. В отличие от регулярных полимеров, на кривых течения растворов хитозана практически нет областей наибольшей и наименьшей ньютоновской вязкости, что не позволяет характеризовать эти растворы по величине динамической вязкости при одной скорости сдвига. Другими словами, для реологического поведения хитозана, характерно псевдопластичное течение его растворов [7], при котором падение вязкости происходит уже при малых напряжениях сдвига. Можно предположить, что это обусловлено разрушением различных по устойчивости ассоциатов макромолекул хитозана с ацетильными блоками различной длины. Как и для разбавленных растворов, стабильное поведение растворов хитозана достигается в результате разрушения внутримолекулярных водородных связей, при этом одновременно повышается вязкость системы за счет усиления межцепных контактов в полимере.

¹³C ЯМР анализ распределения ацетильных групп в хитозанах показал, что между образцами полимера, полученными гомогенным и гетерогенным способами, практически нет различий [8], однако это не свидетельствует об отсутствии отличий и в свойствах этих хитозанов. Более того, обнаруженные различия в свойствах рассматриваемых полимеров могут быть обусловлены прежде всего структурными факторами. Так хитозан, полученный в нетрадиционных гомогенных условиях [1], характеризуется повышенной растворимостью и сравнительно низкой вязкостью, а также отсутствием электризуемости, что может свидетельствовать о его меньшей структурной неоднородности по сравнению с обычным хитозаном. Полученные данные подтверждаются тем, что процесс осаждения такого хитозана из кислых растворов осуществляется при более высоких значениях pH среды, чем для "гетерогенного" хитозана (при pH 5,5). При этом на фоне пониженных значений вязкости "гомогенного" хитозана, кривые зависимости вязкости его растворов от скорости сдвига могут быть описаны поведением ньютоновских жидкостей, характерным для полимеров регулярного строения.

В известной мере о существовании структурных различий между образцами хитозана с различным содержанием остаточных ацетильных групп и их влиянии на молекулярные характеристики свидетельствует зависимость корреляционных параметров в уравнениях Марка-Хаувинка для этих образцов от степени их деацетилирования.

Из анализа литературных данных можно заключить, что степень структурной неоднородности хитозана обуславливается одновременно несколькими трудно контролируемыми факторами - предисторией исходного хитина, его надмолекулярной структурой, а также параметрами весьма жесткого режима деацетилирования хитина. В качестве косвенной характеристики структурной идентичности хитозана может быть использована, в частности, оценка его надмолекулярной структуры по характеристическому рефлексу на рентгенограмме образца [9]. Несмотря на отсутствие стандартизованных образцов хитозана, изучение особенностей первичной структуры различных хитозанов тем не менее вызывает большой интерес. Однако, применимость общепринятых подходов, например, по ступенчатому расщеплению макромолекул с анализом их фрагментов методом ЯМР, не очевидна из-за конфигурационных особенностей макромолекул хитозана.

РАЗНОЗВЕННОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА

Оценка структурной неоднородности особенно затруднена при анализе продуктов химической модификации хитозана, так как они являются, как правило, результатом незавершенных реакций и поэтому содержат структурные элемен-

ты как исходного, так и модифицированного полимера. По существу, полученный в результате модификации хитозана продукт является тройным сополимером, содержащим звенья N-ацетил-D-глюкозамина, D-глюкозамина и модифицированного D-глюкозамина. Между тем от характера последовательности звеньев в модифицированном полимере может существенно зависеть специфичность полученного соединения, а также особенности его некоторых брутто-характеристик.

Реакции химической модификации хитозана часто сопровождаются деструкционными процессами, приводящими к изменению молекулярной массы и полидисперсности полимера. Для снижения влияния данного фактора следует проводить предварительную подготовку исходного хитозана. Целью такой обработки является достижение равновесного молекулярно-массового распределения с $M_w/M_n = 2$, которое может оставаться неизменным при последующей модификации хитозана. Этого можно достичь, в частности, путем частичного кислотного гидролиза хитозана [10].

Поскольку в реальных условиях полная модификация хитина или хитозана практически не достижима, а структурный анализ промежуточных продуктов (интермедиатов) крайне затруднен, то, очевидно, правильно было бы характеризовать эти продукты не по индивидуальным, но по типовым параметрам. Таковыми, например, могут быть небольшой фрагмент первичной структуры полимера или его короткая последовательность звеньев (КПЗ) как носитель функциональной специфичности полученного продукта.

Для подобной оценки необходимым условием является получение, прежде всего, стандартизованных продуктов, поэтому крайне важно добиться устойчивой воспроизводимости условий получения таких продуктов модификации хитозана. Это предполагает поиск модельных или гомогенных условий для проведения этих реакций, что может обеспечить также реальную возможность для контролируемого ступенчатого изменения степени модификации конечного продукта. В результате подобной модификации может быть получен набор "стандартизованных" интермедиатов с различной микроструктурой, но общей брутто-формулой полученных продуктов. Между тем, лишь конкретный образец с фиксированной микроструктурой может, вероятно, быть ответственным за искомую активность модифицированного хитозана.

Иными словами, получение стандартизованных интермедиатов в пределах какой-либо одной реакции модификации тем не менее может существенно расширить спектр получаемых соединений с различными оттенками их основных свойств, но при этом, очевидно, потребуются детализированная идентификация структуры этих соединений. При таком рассмотрении макромолекулярной специфичности можно предположить, что КПЗ полимера вносит существенный вклад в эффективную региоспецифичность некоторых избирательных реакций в цепях хитозана. Особенно высока вероятность реализации вклада КПЗ в случае гомофазных реакций хитозана. При этом возрастает также роль стерических и ионизационных факторов.

Так, региоспецифичность реакции ацилирования хитозана ангидридами кислот преимущественно по аминогруппам поддерживается вследствие того, что другое возможное направление замещения по экваториальным ОН-группам практически не реализуется из-за экранирования этих групп с тыльной стороны плоскостью пиранозного кольца и объемной сольватной оболочкой ацилирующего агента. Для обеспечения этих условий реакцию проводят в растворе хитозана в ацетатном буфере с pH 5,4, вводя в реакционную среду ацилирующий агент в полярном растворителе [11]. Однако при данном значении pH лишь ме-

нее половины аминогрупп хитозана остается непротонированной, поэтому степень замещения продукта не превышает 50%. Дальнейшее повышение степени замещения оказывается возможным при $\text{pH} = 8$, когда частично модифицированный продукт переходит в раствор, а его аминогруппы находятся преимущественно в основной форме. Другой пример: региоспецифичность реакции сульфатирования хитозана преимущественно по ОН-группам обеспечивается тем, что аминогруппы полимера в условиях реакции полностью протонированы, что делает их крайне инертными к электрофильным атакам сульфатирующего агента. Для обеспечения этих условий реакцию проводят в гомогенной среде, представляющей собой раствор хитозана в безводном растворителе с добавкой сильной органической кислоты [12]. Использование различных сульфатирующих агентов приводит к изменению вязкости среды. Так, при применении хлорсульфоновой кислоты (ХСК) система стремится к желированию, тогда как в случае комплекса ХСК-ДМФА она остается практически неизменной в ходе реакции. Вследствие этого полученные продукты имели различные соотношения их антивирусной/антикоагулянтной активности, вероятно, из-за различий в их первичных структурах. Несомненно, что использование данного эффекта даст возможность в определенных пределах контролировать соотношение структура-свойства этих продуктов.

Таким образом, гомофазный характер выше рассмотренных реакций ацилирования и сульфатирования хитозана позволяет варьированием степени ионизации аминогрупп или вязкости реакционной среды получать продукты с различной первичной структурой или степенью структурной неоднородности, по крайней мере, в пределах небольшого числа звеньев цепи.

Подобные рассуждения по поводу КПЗ более всего обоснованы, по-видимому, для межмакромолекулярных взаимодействий, происходящих за счет контактов на коротких участках цепей. Принято считать, что такие реакции между противоположно заряженными полимерами не являются избирательными и поэтому не обладают региоспецифичностью. Но если представить, что взаимодействие между полимерами происходит в пределах КПЗ, то проявление региоспецифичности для этих реакций вполне предсказуемо. Вероятность таких контактов между макромолекулами, естественно, повышается в случае гомофазных реакций. При этом возрастает роль конфигурационных и ионизационных факторов. Так при получении нестехиометрических полиэлектролитных комплексов декстрансульфата натрия и хлоргидрата хитозана использование растворов последнего с различным pH 5 (или 6,5) приводит к образованию равновесной системы лишь при более высоком pH . Эта разница хорошо видна на кривых турбидиметрического титрования полученных растворов комплексов при изменении их pH , когда в первом случае образуется гистерезисная петля, а во втором - кривые прямого и обратного титрования полностью совпадают [13]. Другими словами, эффективное взаимодействие макромолекул происходит в случае, когда аминогруппы хитозана протонированы только наполовину, т.е. при pH , равном $\text{pK}_a = 6,5$. При регулярном чередовании этих групп в хитозане их заряженные аналоги, по крайней мере, на коротком участке, могут оказаться преимущественно по одну сторону полимерной цепи, так как каждое звено полимера повернуто друг к другу на 180° . Таким образом, образуется своеобразная структура полужаряженного полимера, одна сторона плоскости пиранозных колец которого заряжена положительно, другая же сторона - практически неионизованна. Между тем, электростатическое взаимодействие такой макромолекулы хитозана с другими молекулами, очевидно, происхо-

дит также на уровне КПЗ, благодаря чему поддерживается региоспецифичность подобных реакций.

Косвенным подтверждением такого межмолекулярного взаимодействия в пределах КПЗ может служить специфичность одного из испытуемых сульфатом хитозана к определенному пептиду из ряда возможных пептидных фрагментов активного центра вирусного белка [14]. Из четырех различных комбинаций аминокислот - лизина (лиз) и аргинина наибольший эффект связывания с полимером наблюдается в случае пары лиз-лиз. Это, в частности, является свидетельством того, что контакт между этим сульфатом хитозана и данным пептидом происходит также на уровне КПЗ полимера. Достоверность результатов данного модельного теста была подтверждена тем, что испытуемый сульфат хитозана выделялся своей наибольшей противовирусной активностью также и в случае других независимых тестов.

В заключение можно сказать следующее. С одной стороны, усиление структурной неоднородности хитина/хитозана по мере их модификации может иметь положительное значение, так как связано с расширением спектра новых структур, а также возможностью осмысленного поиска желаемых соединений с требуемыми свойствами. С другой стороны, повышенная структурная неоднородность производных хитина/хитозана, очевидно, вносит неопределенность в оценку структуры этих соединений и требует большей формализации существующих и ввода новых стандартов на исходные биополимеры и их производные.

Тем не менее, при этом появляется возможность направленного синтеза стандартизованных интермедиатов, которые могут стать конечной целью превращений как в цепях хитина/хитозана, так и в результате их межцепных реакций с другими полимерами. Изучение интермедиатов хитина/хитозана и их производных одновременно представляет особый интерес в контексте исследования этих биополимеров в качестве экологически безопасных полимерных материалов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Способ получения хитозана. А.с. 1363831 СССР. С 08В 37/08.
2. А.с. 1610844 СССР. С 08В 37/08.
3. Brine C.J., Austin P.R. // *Contr. Biochem. Physiol.* 1981. V. B70. P. 173-178.
4. Pat. 4536207 US. 1985. С 07G 007/00.
5. Гамзададе А.М., Скляр А.М., Рогожин СВ. // *Высокомол. соед.* 1985. Т. А27. № 6. С. 1179-1183.
6. Гамзададе А.М., Скляр А.М., Павлова С.А., Рогожин СВ. // *Там же.* 1981. Т. А23. № 3. С. 594-597.
7. Скляр А.М., Гамзададе А.И., Роговина Л.З. и др. // *Там же.* 1981. Т. А23. № 6. С. 1396-1403.
8. Varum K.M., Anthonsen M.W., Grasdalen H., Smidsrod O. // *Carbohydrate Research.* 1991. V. 217. P. 19-27.
9. Muzzarelli R.A.A., Tanfany F., Emanuelli M. et al. // *J. Appl. Biochem.* 1981. V. 3. P. 316-321.
10. Рогожин СВ., Гамзададе А.М., Членов М.А. и др. // *Высокомол. соед.* 1988. Т. А30. № 3. С. 610-616.
11. Рогожин СВ., Гамзададе А.И., Скляр А.М. и др. // *Материалы I Всесоюз. конф. по хитину/хитозану* / Под ред. Т.М. Сафроновой. Владивосток: МРХ СССР, 1985. С. 58-68.
12. Gamzazade A., Sklyar A., Nasibov S. et al. // *Carbohydrate Polymers.* 1997. V. 34. P. 113-116.
13. Gamzazade A.I., Nasibov S.M. // *Carbohydrate Polymers.* 2002. V. 50. P339-343.
14. Мецзякова Д.В., Андреев СМ., Тарасова С.С. и др. // *Иммунология.* 1993. № 3. С. 9-16.

ТЕРМОДИНАМИКА ХИТИНА И ХИТОЗАНА

В.Ф. Урьяш

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского
Нижегород, zelen@ichem.unn.runnet.ru

Определение термодинамических характеристик (энтальпии, энтропии, функции Гиббса) аминокислот, белков, полисахаридов и других биологически активных веществ (БАВ) необходимо как при изучении процессов их получения, так и превращения в живых организмах, например, в ферментативных реакциях или при конформационных изменениях белков и нуклеиновых кислот [1, 2]. Ввиду того, что процессы в организмах протекают в водной среде, для их физиологии и биохимии весьма важно изучение физических состояний воды в различных БАВ, а также влияния воды на температуры их физических переходов. Ценную информацию об этом дают диаграммы физических состояний систем БАВ-вода [3, 4]. Они позволяют определить температурные и концентрационные границы образования гомогенных смесей, т.е. истинных растворов воды в БАВ и БАВ в воде, а также двухфазных студней, в которых один из этих растворов микрокапельно распределен в матрице другого. Для построения и анализа таких диаграмм необходимы, в частности, данные о температурах стеклования смесей БАВ с водой, а также плавления фазы избытка воды над ее растворимостью в БАВ. Такие данные можно получить при измерении теплоемкости (C_p°) смесей БАВ с водой и методом дифференциального термического анализа (ДТА). По кривым $C_p^\circ - f(T)$ рассчитывают также энтальпию, энтропию и функцию Гиббса нагревания веществ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЕЩЕСТВ

Теплоемкость от 80 до 320 К измеряли в вакуумном адиабатическом калориметре конструкции Харьковского физико-технического института низких температур АН Украины [5, 6]. Установлено, что использованная аппаратура и методика позволяют измерять C_p° веществ с погрешностью 0,3% в области 80-330К.

Теплоемкость в интервале 6-80К измеряли в адиабатическом вакуумном калориметре (ТАУ-1) с автоматизированной системой поддержания адиабатичности условий измерения [7, 8]. Калориметр позволяет получать значения C_p° веществ в твердом и жидком состояниях с погрешностью 1,5% при $T < 10$ К, 0,5% - в интервале 10-40К и 0,3% - в интервале 40-80К.

ДТА в области 80-450К проводили на установке, конструкция которой и методика работы описаны в работе [9]. Эталон служил кварц. Температуру образца и разность температур между образцом и эталоном измеряли хромель-копелевой термопарой с погрешностью 0,5 К. Эксперимент проводили в атмосфере гелия. Скорость нагрева в опытах была 5 К/мин. Запись ДТА-кривых (термограмм) осуществляли двухкоординатным самописцем.

Термодинамические функции веществ $H^\circ(T) - H^\circ(0)$ и $S^\circ(T) - S^\circ(0)$ рассчитывали на ПЭВМ интегрированием кривых $C_p^\circ = f(T)$ и $C_p^\circ = f(\ln T)$ соот-

ветственно, а функцию Гиббса $G^\circ(T) - G^\circ(0)$ - по уравнению Гиббса-Гельмгольца.

Если теплоемкость образцов измеряли от 80 К, то для расчета термодинамических функций полученную зависимость $C_p^\circ = f(T)$ вещества экстраполировали от 80 до 0 К по методу Келли-Паркса-Хаффмана [10]. Коэффициенты A и B в уравнении (1)

$$C_p^0 = C_{p,\varepsilon}^0 (A + B \cdot T) \quad (1)$$

подбирались таким образом, чтобы решение его совпадало с экспериментально определенными значениями C_p° вещества в интервале 80-100 К с погрешностью не менее 0,3%. В уравнении (1) $C_{p,\varepsilon}^\circ$ - измеренная в области 6-80 К теплоемкость эталонного вещества, родственному изучаемому; T - температура по Кельвину. В качестве эталонного вещества использовали хитин из грибов вешенка.

Температуру релаксационных переходов в хитине (стеклования (T_σ) и β -перехода (T_β)) определяли из зависимости $C_p^\circ / T = f(T)$ с погрешностью ± 1 К. За температуру плавления ($T_{пл}$) фазы кристаллической воды в образцах смесей хитин-вода, содержащих ее избыток над растворимостью в полимере, принимали среднее значение температуры в интервале минимального подъема ее в процессе непрерывного нагрева образца в области плавления фазы свободной воды. Воспроизводимость результатов составляла 0,1 К.

Энтальпию плавления фазы свободной воды измеряли методом непрерывного ввода энергии в калориметр. Она составляла среднее значение в двух, трех опытах. Погрешность определения энтальпии плавления равнялась 0,3%.

При обработке результатов ДТА за T_c и T_β принимали среднюю температуру интервала, в котором происходил переход, так как по данным International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry (ICTAC) [11, 12] именно эта температура обладает наилучшей воспроизводимостью. Последняя в наших экспериментах составляла 2 К.

Растворимость воды в хитине, другими словами, концентрацию насыщенного при 273 К раствора воды в нем (ω , мас.%) определяли методом, разработанным в лаборатории термохимии НИИ химии ННГУ [3, 4], по энтальпии плавления фазы свободной воды в образце смеси хитин-вода, содержащем ее избыток над растворимостью в полимере, при измерении теплоемкости образца в области 80-320 К. На кривой $C_p^\circ = f(T)$ такого образца проявляется эндотермический эффект (разрыв на кривой теплоемкости) при 273 К, который относится к плавлению фазы избытка воды над ее растворимостью в полимере, т.е. в образце присутствует вода, растворенная в полисахариде (связанная вода) и фаза свободной воды.

Стеклование фазы насыщенного раствора воды в полимере может проявиться, если избыток воды небольшой, или не проявиться вследствие армирующего эффекта, которой оказывают кристаллы фазы свободной воды.

При непрерывном вводе энергии в калориметр определяли количество теплоты (q , Дж), необходимое для плавления кристаллов фазы свободной воды. По отношению этой величины к удельной энтальпии плавления воды $\{(\Delta h) = 333,79 \text{ Дж/г} [13]\}$ рассчитывали массу кристаллов воды $[m(\text{H}_2\text{O}) = q/\Delta h]$. Зная массу образца (m , г) и массовую долю воды в нем (C_1 , %), вычисляли растворимость воды в хитине при 273 К в массовых долях (ω) по формуле (2):

$$\omega = \frac{mC_1 - 100 \cdot q/\Delta h}{m - q/\Delta h} \quad (2)$$

Погрешность определения растворимости этим методом составляет 0,5-2% (выражена доверительным интервалом с вероятностью 95%).

Массовую долю воды в насыщенном при 273К растворе ее в полимере можно определять также по данным ДТА другим методом, разработанным в лаборатории термохимии НИИ химии ННГУ [14]. При этом экстраполируют прямую зависимости удельной площади эндотермического пика плавления фазы свободной воды ($\delta = m_k/m_{обр}$, где m_k - масса капельки, соответствующая площади пика плавления, $m_{обр}$ - масса образца) от концентрации H_2O на нулевое значение δ . Погрешность определения растворимости этим методом составляет 2-3%.

Энтальпию сгорания (A_cH°) хитина определяли в усовершенствованном калориметре В-08Ма со статистической калориметрической бомбой [15]. Реакция сгорания хитина описывается уравнением



Калибровку калориметрической системы проводили по эталонной бензойной кислоте марки К-2 (AU_C - -26460,0 Дж/г при взвешивании в воздухе). Энергетический эквивалент системы (W) был 1484713 Дж/К с удвоенным квадратичным отклонением от среднего результата 0,02%. Хитин сжигали в виде таблеток вместе с таблетками бензойной кислоты при давлении кислорода $3 \cdot 10^6$ Па. По данным хроматографического анализа используемый кислород содержал примеси, мол.-%: N_2 - 0,8; CO и CO_2 - 0,002; углеводородов - 0,001.

Для выделения хитина из грибов вешенка их сушили и измельчали. Затем проводили деминерализацию раствором HCl и депротенинирование раствором $NaOH$. После этого его промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции и сушили при 343 К в течение четырех часов. Полученный хитин представлял собой светло-бежевый порошок. Проведенный элементный анализ показал, что качественный и количественный составы повторяющегося звена его макромолекулы ($C_8H_{13}O_5N$) соответствуют формульному (С - 47,3%, Н - 6,4%, N - 6,9%, О - 39,4%). Относительное отклонение массовых долей углерода, водорода, азота и кислорода от среднего значения по данным трех опытов не превышало 0,5%.

Исследуемые образцы хитина и хитозана из панциря крабов были получены и очищены по методике, описанной в [16]. Содержание каждого элемента в исследованных образцах указанных соединений в пределах точности элементного анализа (0,5% мас.%) совпадало с его содержанием, рассчитанным по соответствующей химической формуле. Промышленный образец хитина из арктического криля имел степень деацетилирования $DA = 0,85$ и $M_n = 60000$.

Проведенные нами эксперименты показали, что в воздушно-сухих хитине и хитозане содержится 6-11 мас.% воды. Полное обезвоживание хитина по данным ДТА происходит при 428 ± 4 К, а хитозана при 400 ± 4 К. Поэтому образцы хитина и хитозана перед опытами сушили в течение часа в вакууме (0,6 Па) при 430К и 400К соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальные результаты по измерению теплоемкости хитина и хитозана из панциря крабов [17] и хитина из молодых грибов вешенка [18] представлены на рис. 1. Как видно из рисунка, теплоемкость хитина, выделенного из различных источников, монотонно возрастает в изученном интервале температур. То, что C_p грибного хитина ниже чем у крабового, может указывать на большую упорядоченность структуры грибного хитина по сравнению с крабо-

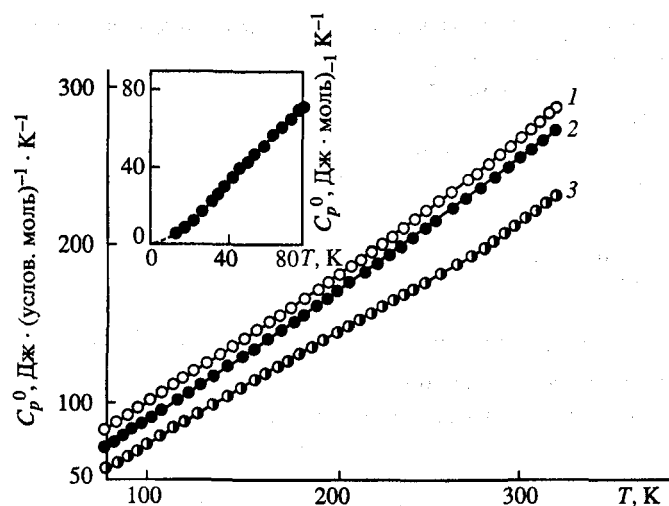


Рис. 1. Теплоемкость крабового хитина (1) и хитозана (3), а также хитина из грибов вешенка (2)

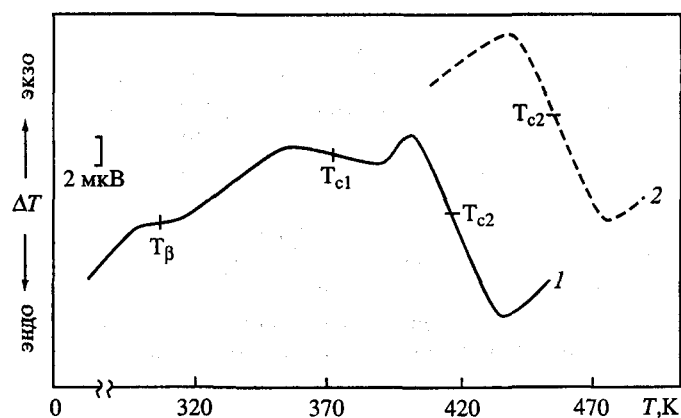


Рис. 2. Термограммы образцов хитина из молодых (1) и старых (2) грибов вешенка

вым. Как отмечается в [19], свойства хитина и его молекулярная масса заметно различаются в зависимости от сырья, из которого он выделяется, а также способа выделения и очистки. Усредненные значения теплоемкости и термодинамические функции изученных образцов хитина и хитозана приведены в табл. 1.

На термограмме обезвоженного хитина из молодых грибов (рис. 2, кривая 1) проявляется три релаксационных перехода эндотермического характера. Первый из них в интервале 300-330K со средней температурой (T_β) 316K представляет собой вторичный переход (β -переход). Два других 350-390K ($T_{c1} = 376K$) и 405-470K ($T_{c2} = 437K$) относятся к расстеклованию.

Причем амплитуда первого (T_{c1}) меньше чем второго (T_{c2}). Температуры этих переходов у крабового хитина близки к хитину грибному (табл. 2), а для крабового хитозана ниже. В табл. 2 приведены также температуры физических переходов в хитозане из арктического криля [20]. Как видно из табл. 2, температуры переходов у последнего выше чем у хитозана из крабов. Несколько фи-

Таблица 1. Усредненные значения теплоемкости и термодинамические функции

T, K	$C_p^0, \text{Дж/(усл. моль)} \cdot K$	$H^0(T) - H^0(0),$ кДж/усл. моль	$S^0(T) - S^0(0),$ Дж/(усл. моль) · K	$-[G^0(T) - G^0(0)],$ кДж/усл. моль
Хитин из молодых грибов вешенка*				
10	3,441	0,0124	1,89	0,006469
20	10,51	0,0797	6,275	0,0458
60	51,45	1,323	35,33	0,8564
100	85,89	4,088	70,89	3,001
140	119,2	8,188	105,1	6,525
180	151,9	13,61	139	11,4
220	183,7	20,32	172,5	17,64
260	217,1	28,33	205,9	25,20
298,15	251,9	37,27	237,9	33,67
320	273,2	43,01	256,5	39,07
Крабовый хитин				
10	5,194	0,01922	2,96	0,01039
20	14,73	0,1165	9,318	0,06983
60	61,07	1,652	46,88	1,160
100	98,55	4,847	86,87	3,84
140	131,2	9,444	125,3	8,092
180	162	15,31	161,9	13,84
220	183,7	22,44	197,6	21,03
260	194,8	30,92	232,9	29,65
298,15	267,5	40,39	266,9	39,19
320	299,2	46,44	286,4	45,22
Крабовый хитозан**				
10	3,472	0,01281	1,994	0,007121
20	9,945	0,07823	6,276	0,04728
60	42,94	1,141	32,22	0,7926
100	72,36	3,437	60,92	2,655
140	99,59	6,896	89,76	5,670
180	128,5	11,43	118,1	9,828
220	154,3	17,06	146,3	15,12
260	182,7	23,80	174,4	21,53
298,15	213,6	31,34	201,3	28,69
320	235,5	36,28	217,3	33,27

* Функции приведены в расчете на мол. массу повторяющегося звена хитина (усл. моль), которая равна 203,195 г/моль.

** Функции приведены в расчете на мол. массу повторяющегося звена хитозана (усл. моль), которая равна 161,158 г/моль.

Таблица 2. Температуры физических переходов в высушенных хитине и хитозане

Образец, K	Хитин		Хитозан	
	крабовый	грибной	крабовый	крыля
T	315	316	309	317
T_{c1}	370	376	364	442
T_{c2}	430	437	410	461

зических переходов у хитозана обнаружил Кайминып с сотр. [21, 22]. Подобный характер релаксаций наблюдается также у таких полисахаридов, как нитраты и ацетаты целлюлозы [3, 4, 23, 24], агара [14], агарозы, амилозы и амилопектина [25, 36]. β -переход можно объяснить либрацией пиранозных колец вокруг глюкозидной связи [5, 11], а два температурных интервала расстеклования - неоднородной структурой хитина, который как и целлюлоза состоит из аморфных и высокоупорядоченных областей [27, 28]. Причем макромолекулярная спираль хитина представляет собой более лабильную систему, чем у целлюлозы [28]. На меньшую упорядоченность хитина по сравнению с целлюлозой указывают результаты исследования энтальпий их взаимодействия с водой и другими растворителями [29].

Нами была замечена особенность грибного хитина - зависимость температур его релаксационных переходов (T_β , T_{c1} , T_{c2}) от возраста грибов. У хитина из старых грибов T_β и T_{c1} повышалась на -10 К, а T_{c2} - на 30-40% (рис. 2, кривая 2). Т.е. при старении грибов структура хитина становится более упорядоченной.

Как отмечается в работах [30, 31], у полимеров наблюдается целый спектр релаксационных переходов, которые характеризуют размораживание (при нагревании) или замораживание (при охлаждении) различных форм движения макромолекул полимера. При каждом релаксационном переходе при температурных зависимостях таких термодинамических функций, как энтропия или энтальпия, наблюдается излом. По точке излома можно определить температуру релаксационного перехода. Первая производная энтальпии по температуре есть теплоемкость при постоянном давлении, которая претерпевает скачок в температурном интервале перехода. По предложенной в работах [30, 31] классификации главный релаксационный переход, обозначаемый как α -переход, относят к стеклованию полимера. В стеклообразном аморфном полимере отсутствует дальний порядок в структуре, а его вязкость выше 10^{13} Пуаз. Стеклообразное состояние аморфного полимера является метастабильным. При стекловании замораживаются колебания кинетических сегментов полимерной цепи. Под кинетическим сегментом понимают последовательность из звеньев цепи, на протяжении которой утрачивается корреляция между ориентацией первого (i -го) и последнего ($i + n$)-го звена [30, 32, 33]. Когда полимер находится в стеклообразном состоянии в нем могут проявляться, так называемые, маломасштабные релаксационные переходы, называемые β - и γ -переходами. β -Релаксация относится к движениям участков полимерной цепи, меньших чем сегмент и связана с внутренним вращением в боковых привесках. Если полимерная цепь имеет несколько типов привесков, то может наблюдаться несколько γ -переходов [25, 26].

После второго расстеклования на термограммах хитина и хитозана наблюдалось разложение. Причем у хитина этот процесс (в атмосфере гелия) эндотермический, а у хитозана - экзотермический. Так у крабового хитина разложение начиналось при 490К, а температура пика соответствовала 547К. По данным работы [34] разложение хитина начиналось при 500К. У крабового хитозана начало разложения соответствовало 450К, а пик наблюдался при 507К. Хитозан из криля начинал разлагаться при 465 К, экзотермический пик наблюдался при 517К.

Исследование влияния воды на температуры физических переходов хитина из грибов вешенка показало, что она оказывает на него пластифицирующее действие, понижая температуры стеклования (табл. 3) [18]. При этом T_{c1} и T_{c2} понижаются на десятки градусов, а T_β практически не изменяется (см. табл. 3). Аналогичным образом действуют пластификаторы на другие полисахариды [3, 4, 14, 25, 26]. Как видно из табл. 3, понижение температур стеклования хитина

Таблица 3. Температуры физических переходов в системе грибной хитин-вода

Содержание воды в образце, мас. %	0	8,1	13,5	25,5	37
T_{c2} , К	437	388	361	341	333
T_{c1}	376	332,5	271	236	215
T'_{c1}	—	—	—	—	200
T_{β}	316	317	320	320	319
$T_{пл}(H_2O)$	—	—	—	—	268,5
Содержание воды в образце, мас. %	41	46,2	48,3	64,5	100
T_{c2} , К	331	330	331	329	—
T_{c1}	212	210	208	210	—
T'_{c1}	193	187	186	—	—
T_{β}	319	317	318	—	—
$T_{пл}(H_2O)$	232	273	273	273	273

происходит до тех пор, пока вода растворяется в хитине. После достижения предела растворимости воды в полимере (∞) температуры стеклования (T_{c1} и T_{c2}) остаются практически постоянными с увеличением содержания воды в системе.

При этом система становится двухфазной. Она состоит из насыщенного раствора воды в хитине и фазы свободной воды. В зависимости от термической предыстории двухфазная система может вести себя по-разному. При быстром (-20 К/мин) охлаждении двухфазных смесей застекловывается как насыщенный раствор воды в хитине, так и фаза свободной воды. Эта смесь расстекловывается в одном температурном интервале. Температура стеклования ее (T_{c1i}) ниже, чем насыщенного раствора E_{c1} (табл. 3). После расстеклования на термограмме таких смесей проявляется кристаллизация фазы свободной воды из состояния переохлажденной жидкости. При дальнейшем нагревании кристаллы воды плавятся ($T_{пл}(H_2O)$). Вычислив удельную площадь эндотермического пика плавления фазы свободной воды (8) для нескольких образцов, экстраполировали ее на нулевую площадь пика (рис. 3). Определили таким образом концентрацию насыщенного при 273К раствора воды в хитине. Она оказалась равной 32 ± 2 мас. % воды.

Более точно растворимость воды в хитине можно определить калориметрическим методом. Для этого приготовили непосредственно в калориметрической ампуле смесь хитина с 89,6 мас. % воды. Температурная зависимость теплоемкости указанного образца представлена на рис. 4. Как видно из рис. 4, на кривой $C_p = f(T)$ данного образца проявляется эндотермический эффект при 273К, который можно отнести к плавлению фазы избытка воды над ее растворимостью в полимере, т.е. в образце присутствует вода, растворенная в хитине (связанная вода), и фаза свободной воды. Стеклование фазы насыщенного раствора воды в хитине не проявляется вследствие армирующего эффекта, который оказывают кристаллы фазы свободной воды на насыщенный раствор. Методом непрерывного ввода энергии в калориметр определили количество теплоты (q , Дж), необходимое для плавления кристаллов фазы свободной воды. По формуле (2) рассчитали растворимость воды в хитине при 273К в массовых долях (∞).

Данные опытов определения растворимости воды в хитине из грибов вешенка калориметрическим методом приведены в табл. 4.

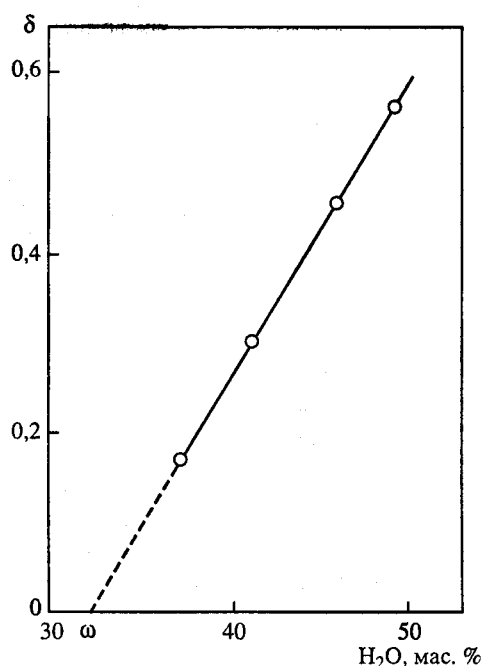
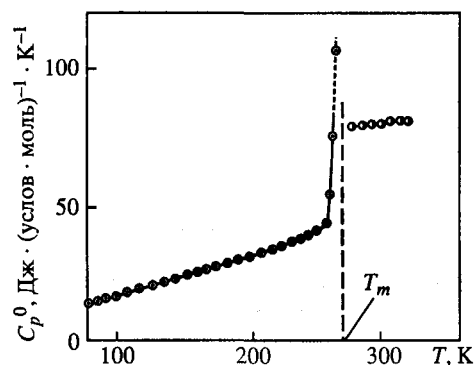


Рис. 3. Удельная площадь пика плавления фазы избытка воды (δ) в зависимости от общего содержания ее в смесях

Рис. 4. Теплоемкость образца смеси грибного хитина с 89,6 мас.% воды



Как видно из табл. 4 и рис. 3, результаты по растворимости воды в хитине, полученные обоими методами, хорошо согласуются друг с другом. Следует отметить, что растворимость воды в целлюлозе [35] меньше чем в хитине и составляет $26,2 \pm 0,2$ мас.% H₂O. То же самое отмечается и в работе [34]. Все это указывает на менее упорядоченную структуру хитина по сравнению с целлюлозой [27-29].

По полученным данным о температурах релаксационных и фазовых переходов в смесях хитина с водой и растворимости ее в полимере построили диаграмму физических состояний системы хитин-вода (рис. 5), которая позволяет определить температурные и концентрационные области высокоэластичного и стеклообразного состояния смесей, гомогенности и гетерогенности системы. На диаграмме кривые *AB* и *CD* - концентрационные зависимости температур стеклования растворов воды в упорядоченных и аморфных микрообластях хитина, соответственно; *DE* - линия температур стеклования насыщенного раствора воды в хитине (из диаграммы видно, что насыщение водой более упорядоченных и менее упорядоченных областей хитина достигается практически при одинаковой концентрации воды в системе). Дальнейшее увеличение содержания H₂O в смесях практически не влияет на *T_{c1}* и *T_{c2}*. *MN* - линия температур β -перехода хитина (*T_β*). Вода практически не влияет на температуру этого перехода. *KL* - концентрационная зависимость температуры плавления фазы сво-

Таблица 4. Данные опытов по определению растворимости воды (ω , мас.%) в хитине из грибов при 273,15K для образца хитина с 89,6 мас.% воды

№ опыта	Масса образца, г	Энтальпия плавления кристаллов свободной воды, Дж	Масса фазы избытка воды, г	ω , мас.%
1	2,7452	772,42	2,3141	33,7
2	2,7452	770,31	2,3078	34,6
Средняя величина				$34 \pm 0,5$

бодной (не растворяющейся в хитине) воды. Как видно из диаграммы, двухфазная смесь, состоящая из насыщенного раствора воды в хитине и фазы свободной воды, ведет себя поразному в зависимости от термической предыстории. При быстром ($\sim 20\text{K}/\text{мин}$) охлаждении двухфазных смесей, содержащих от 34 до 50 мас.% воды, застекловывается как насыщенный раствор воды в хитине, так и фаза свободной воды. Эта смесь расстекловывается в одном температурном интервале (кривая DE'). Температура стеклования ее (T_{c1}) ниже, чем насыщенного раствора T_{c1} . После расстеклования на термограмме таких смесей проявляется кристаллизационная фаза свободной воды из состояния переохлажденной жидкости. При дальнейшем нагревании кристаллы воды плавятся (линия KL). Когда содержание воды увеличивается до 60 мас.%, избыток воды кристаллизуется уже при первоначальном охлаждении независимо от скорости охлаждения. При этом мы еще наблюдаем расстеклование насыщенного раствора воды в хитине (точка E). Увеличение общей концентрации воды приводит к тому, что большое количество образовавшихся кристаллов фазы свободной воды армирует гидратированные макромолекулы хитина и не позволяет расстекловываться насыщенному раствору воды в хитине.

Вертикаль $GKDF$ (см. рис. 5) отделяет область гомогенных растворов воды в хитине - слева, от двухфазной (гетерогенной) области - справа. Строго говоря, определенная нами концентрация насыщенного раствора воды в хитине относится к 273K - температуре плавления воды. Однако в работах [3, 4] нами было показано, что при температурах ниже 273K растворимость низкомолекулярных пластификаторов в полимерах практически не зависит от температуры и кристаллизуется только то количество пластификатора, которое находится в избытке.

Нами была также определена энтальпия сгорания (A_cH^0 (точка $298,15\text{K}$), $\text{kJ}/\text{моль}$) и образования (A_fH^0 (точка $298,15\text{K}$), $\text{Дж}/\text{моль}$) хитина их грибов. Вещество в кварцевом тигле поджигали с помощью разряда конденсатора на платиновую проволоку, соединенную с веществом хлопчатобумажной нитью. Для измерения подъема температуры использовали два платиновых термометра сопротивления и цифровой вольтметр, включенные в мостовую схему. Массу образца исследуемого соединения определяли по количеству CO_2 , образующегося при его сгорании.

В табл. 5 приведены результаты опытов по определению энергии сгорания хитина из грибов. Используются следующие обозначения: $m(x)$ - масса сгоревшего вещества; ΔT - подъем температуры с поправкой на теплообмен; $q_{б.к.}$ и q_H - поправка соответственно на сгорание бензойной кислоты и нити; q_{HNO_3} - поправка на образование родного раствора азотной кислоты; DJJ - энергия сгорания исследуемого вещества в условиях, калориметрической бомбы. Исхода

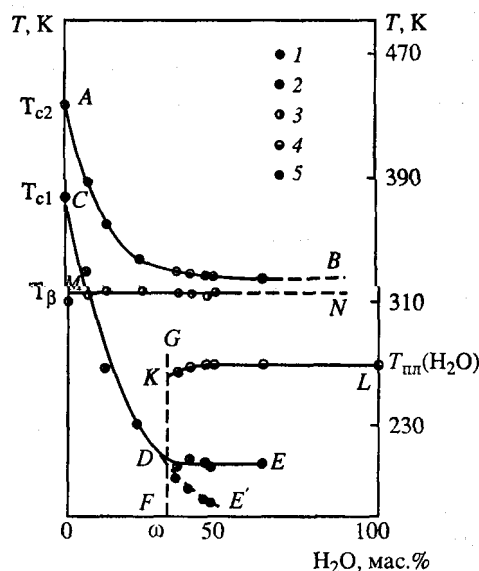


Рис. 5. Диаграмма физических состояний системы грибной хитин-вода (обозначения кривых в тексте)

Таблица 5. К определению энергии сгорания хитина из грибов при 298,15К

$m(x)$, г	ΔT , К	$q_{б.к.}$, Дж	q_n , Дж	q_{HNO_3} , Дж	$-\Delta_c U$, Дж/г
0,2983	2,25923	27615,9	36,3	26,4	19656
0,2124	2,1178	27167,7	30,1	30,5	19803,7
0,2145	2,0499	26146,1	27,6	29,3	19728
Средняя величина					19729,2

из среднего значения $A_c U$, молекулярной массы (М), с учетом поправки Уошберна и поправки, обусловленной изменением числа молей газов, рассчитаны стандартные величины $A_c U^0$ и $A_c H^0$ для реакции сгорания хитина.

Они оказались равными:

$$A_c U^0 (т, 298,15) = -4005,81 + 16,7 \text{ кДж/моль},$$

$$A_c H^0 (т, 298,15) = -4006,4 + 116,7 \text{ кДж/моль}.$$

Энтальпия образования хитина из грибов в твердом состоянии рассчитана при 298,15К $A_f H^0$ (хитин, т) = $-999,6 + 16,7 \text{ кДж/моль}$ с использованием $A_f H^0_{H_2O, ж} = -285,831 + 0,042 \text{ Дж/моль}$ и $A_f H^0_{CO_2, г} = -393,511 + 0,13 \text{ Дж/моль}$.

Близкие к нашим значения $A_c H^0 = -4011 \text{ кДж/моль}$ и $A_f H^0 = -994,5 \text{ кДж/моль}$ были получены для хитина из панциря крабов авторами работы [36].

Проведенные нами исследования и анализ литературных данных показал, что полисахариды и, в частности, хитин и хитозан обладают сложной молекулярной и надмолекулярной структурой. При этом строение полисахарида тесно связано с его физико-химическими свойствами. Поэтому необходимо исследовать указанные характеристики полисахаридов в широкой области температур.

Сложная структура хитина и хитозана проявляется и в наличии у них нескольких температурных областей стеклования и β -перехода. Кроме того температуры физических переходов хитина из грибов зависят от их возраста. У хитина из старых грибов они выше, т.е. при старении грибов структура хитина становится более упорядоченной.

Изучено влияние воды на температуры физических переходов грибного хитина. Определены физические состояния воды в смесях с ним в широкой области температур, а также концентрационные и температурные области существования гомогенных и гетерогенных смесей хитин-вода. Показано существование "свободной" и "связанной" воды в системе хитин-вода. Растворимость воды в хитине (34+0,5 мас.%) выше чем в целлюлозе [35] (26,2+0,2 мас.%). В обобщенном виде это можно представить в виде диаграммы физических состояний системы хитин-вода.

В заключении хочу выразить благодарность сотрудникам лаборатории термодинамики Научно-исследовательского института Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, принимавшим участие в экспериментальной работе и обсуждении полученных результатов: В.Г. Цветкову, В.А. Масловой, Л.Я. Цветковой, Н.В. Новоселовой, Н.Ю. Кокуриной и В.Н. Лариной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимическая термодинамика / Под ред. М. Джоунса. М.: Мир, 1982. 440 с.
2. Калоус В., Павличек З. Биофизическая химия. М.: Мир, 1985. 446 с.
3. Rabinovich I.B., Mochalov A.N., Tsvetkova L.Ya. et al. // Acta Polym. 1983. Bd. 34. N. 8. S. 482-488.

4. Uryash V., Rabinovich I.B., Mochalov A.N., Khlyustova T.B. // *Thermochim. Acta*. 1985. V. 93. P. 409-412.
5. Рабинович И.Б., Шейман М.С., Нистратов В.П. и др. // *ЖФХ*. 1985. Т. 59. № 10. С. 2414-2417.
6. Рыбкин Н.Г., Орлова М.П., Баранюк А.К. и др. // *Измерит. техн.* 1974. № 7. С. 29-32.
7. Мальшиев В.М., Мильнер Г.А., Соркин Е.Л., Шibaкин В.Ф. // *Приборы и техн. эксперим.* 1985. № 6. С. 195-197.
8. Косов В.И., Мальшиев В.М., Мильнер Г.А. и др. // *Измерит. техн.* 1985. № 11. С. 56-58.
9. Урьяш В.Ф., Мочалов А.Н., Покровский В.А. // *Термодинамика органических соединений: Межвуз. сб.* / Горький: Изд-во ГГУ. 1978. Вып. 7. С. 88-92.
10. Паркс Г., Хаффман Г. *Свободная энергия органических соединений*. М.: ГИХЛ. 1936. 214 с.
11. Garn P.D., Menis O. // *Amer. Chem. Soc: Polym. Prepr.* 1976. V. 17. P. 151-156.
12. Garn P.D., Menis O. // *J. Macromol. Chem.* 1977. V. B13. P. 611-629.
13. Вода и водные растворы при температуре ниже 0 °C / Под ред. Ф. Франкса. Киев: Наук. думка. 1985. С. 25-29.
14. Uryash V.F., Maslova V.A., Chizikova V.A. // *Biomater.-Liv. Syst. Inter.* 1994. V. 2. N 2. P. 71-77.
15. Кирьянов К.В., Тельной В.И. // *Тр. по химии и хим. технологии: Межвуз. сб.* / Горький: Изд-во ГГУ. 1975. Вып. 4. С. 109-110.
16. Гамзазаде А.И., Скляр А.М., Рогожин С.В. // *Высокомолекуляр. соедин. Сер. А*. 1985. Т. 27. № 6. С. 1179-1184.
17. Цветкова Л.Я., Новоселова Н.В., Голицын В.П. и др. // *Журн. химич. термодинамики и термохимии*. 1993. Т. 2. № 1. С. 88-93.
18. Урьяш В.Ф., Кокурина Н.Ю., Маслова В.А. и др. // *Вестн. Нижегородского госун-та. Сер. химия*. Нижний Новгород: Изд-во ННГУ. 1998. Вып. 1. С. 165-170.
19. Плиско Е.А., Нудьга Л.А., Данилов С.Н. // *Усп. химии*. 1977. Т. 46. № 8. С. 1470-1487.
20. Mukhina V.R., Smirnova L.A., Semchikov Yu.D., Uryash V.F. // *Int. Conf. on Calorimetry, Experimental Thermodynamics and Thermal Analysis: Abstracts / Zakopane*: 1997. P. 150.
21. Кайминь И.Ф., Озолина Г.А., Плиско Е.А. // *Высокомолекуляр. соедин. Сер. А*. 1980. Т. 22. № 1. С. 151-156.
22. Каймины И.Ф. // *Тез. докл. V Всерос. конф. Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана*. М.: ВНИРО. 1999. С. 230-231.
23. Мочалов А.Н., Рабинович И.Б., Урьяш В.Ф. и др. // *Термодинамика органич. соедин.: Межвуз. сб.* / Горький: Изд-во ГГУ. 1981. С. 16-19.
24. Мочалов А.Н., Хлюстова Т.Б., Калинин Л.Н. // *Физико-химические основы синтеза и перераб. полимеров: Межвуз. сб.* Горький: Изд-во ГГУ. 1982. С. 59-63.
25. Груздева А.Е., Урьяш В.Ф., Корякин Н.В. и др. // *Вестн. Нижегородского госун-та. Сер. химия*. Нижний Новгород: Изд-во ННГУ. 2000. Вып. 1(2). С. 139-145.
26. Груздева А.Е. *Термодинамические свойства некоторых полисахаридов и их смесей с водой*. Дис. ... канд. хим. наук. Нижний Новгород: ННГУ. 2000. 184 с.
27. Генин Я.В., Скляр А.М., Цванкин Д.Я. и др. // *Высокомолек. соедин. Сер. А*. 1984. Т. 26. № 11. С. 2411-2416.
28. Елагин А.Л., Перцин А.М. // *Там же*. 1983. Т. 25. № 4. С. 804-811.
29. Марченко Г.Н., Цветков В.Т., Маршова В.Н. и др. // *Термодинамические свойства растворов: Межвуз. сб.* Иваново: Изд-во Химико-технол. ин-та. 1984. С. 37-39.
30. Бартенев Г.М., Сандитов Д.С. *Релаксационные процессы в стеклообразных системах*. Новосибирск: Наука, 1986. 238 с.
31. Гоффман Дж.Д., Вилльямс Г., Пассаглиа Е. В кн. // *Переходы и релаксационные явления в полимерах* / Сост. Р. Бойер. М.: Мир, 1968. 384 с.
32. Каргин В.А., Слонимский Г.Л. *Краткие очерки по физико-химии полимеров*. М.: Химия, 1967. 232 с.
33. Рафигов С.Р., Будтов В.П., Монаков Ю.Б. *Введение в физико-химию растворов полимеров*. М.: Наука, 1978. 328 с.
34. Марьин А.П., Шляпников Ю.А. // *Высокомолек. соедин. Сер. А*. 1980. Т. 22. № 3. С. 589-594.
35. Рабинович И.Б., Хлюстова Т.Б., Мочалов А.Н., Кокурина Н.Ю. // *ЖОХ*. 1989. Т. 59. № 6. С. 1240-1244.
36. Иванов А.В., Цветкова Л. Я., Гартман О.Р. и др. // *Тез. докл. VI Междунар. конф. по проблемам сольватации и комплексообразования в растворах*. Иваново: Изд-во ИГХТА. 1995. С. L19.

Таблица 1. Усредненные значения теплоемкости и термодинамические функции

T, K	$C_p^0, \text{Дж/(усл. моль)} \cdot K$	$H^0(T) - H^0(0),$ кДж/усл. моль	$S^0(T) - S^0(0),$ Дж/(усл. моль) · K	$-[G^0(T) - G^0(0)],$ кДж/усл. моль
Хитин из молодых грибов вешенка*				
10	3,441	0,0124	1,89	0,006469
20	10,51	0,0797	6,275	0,0458
60	51,45	1,323	35,33	0,8564
100	85,89	4,088	70,89	3,001
140	119,2	8,188	105,1	6,525
180	151,9	13,61	139	11,4
220	183,7	20,32	172,5	17,64
260	217,1	28,33	205,9	25,20
298,15	251,9	37,27	237,9	33,67
320	273,2	43,01	256,5	39,07
Крабовый хитин				
10	5,194	0,01922	2,96	0,01039
20	14,73	0,1165	9,318	0,06983
60	61,07	1,652	46,88	1,160
100	98,55	4,847	86,87	3,84
140	131,2	9,444	125,3	8,092
180	162	15,31	161,9	13,84
220	183,7	22,44	197,6	21,03
260	194,8	30,92	232,9	29,65
298,15	267,5	40,39	266,9	39,19
320	299,2	46,44	286,4	45,22
Крабовый хитозан**				
10	3,472	0,01281	1,994	0,007121
20	9,945	0,07823	6,276	0,04728
60	42,94	1,141	32,22	0,7926
100	72,36	3,437	60,92	2,655
140	99,59	6,896	89,76	5,670
180	128,5	11,43	118,1	9,828
220	154,3	17,06	146,3	15,12
260	182,7	23,80	174,4	21,53
298,15	213,6	31,34	201,3	28,69
320	235,5	36,28	217,3	33,27

* Функции приведены в расчете на мол. массу повторяющегося звена хитина (усл. моль), которая равна 203,195 г/моль.

** Функции приведены в расчете на мол. массу повторяющегося звена хитозана (усл. моль), которая равна 161,158 г/моль.

Таблица 2. Температуры физических переходов в высушенных хитине и хитозане

Образец, K	Хитин		Хитозан	
	крабовый	грибной	крабовый	крыля
T	315	316	309	317
T_{c1}	370	376	364	442
T_{c2}	430	437	410	461

ТЕРМОХИМИЯ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ СОЛЕЙ ХИТОЗАНА: СУПЕРПОЗИЦИЯ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ И СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ПОЛИМЕРА

А.П. Сафронов

Уральский государственный университет, Екатеринбург
alexander.safronov@usu.ru

При обсуждении термохимического поведения любых растворов полимеров следует иметь в виду несколько обстоятельств.

Во-первых, термохимические измерения традиционно составляют фундамент физико-химического рассмотрения любых систем. Измеряемые с помощью калориметрических методов изменения энтальпии ΔH или внутренней энергии ΔU являются функциями состояния системы, анализ изменения которых необходим как для корректной интерпретации результатов, полученных структурными методами, так и для теоретического описания рассматриваемых объектов. Все это обуславливает особую ценность прямых термодинамических данных о поведении физико-химических систем.

Во-вторых, фундаментальный характер измеряемых величин имеет и обратную сторону. Энтальпия и внутренняя энергия системы являются интегральными величинами, включающими в себя большое число отдельных вкладов, каждый из которых обусловлен конкретными видами межмолекулярных взаимодействий, присущих системе и зависящих от ее химического строения и надмолекулярной структуры. В еще большей степени сказанное относится к изменениям энтальпии и внутренней энергии в ходе различных процессов. Эти величины несут информацию о межмолекулярных взаимодействиях и структуре не только конечного, но и начального состояния системы. В этой связи, содержательный анализ экспериментально измеренных величин ΔH и ΔU существенно усложняется. Так значения энтальпии смешения растворов ΔH^m только в очень простых случаях, например в растворах эластомеров, полностью определяются балансом энергии когезии однородных молекул и энергии адгезии разнородных молекул $\epsilon_{1,2} - (\epsilon_{11} - \epsilon_{22})/2$. В более сложных системах этот вклад уже не является решающим. Большое значение имеют и особенности надмолекулярной структуры полимера – его стеклообразность, частичная кристалличность и т.д., а для водных растворов – особенности структуры воды. Растворы природных полимеров и, в частности, хитозана и его производных с этой точки зрения представляют собой пример наиболее сложных для термодинамического анализа систем.

В-третьих, термохимические измерения в растворах полимеров с чисто методической точки зрения представляют собой непростую задачу. В силу больших размеров макромолекул процесс их растворения кинетически заторможен, и требуются специальные экспериментальные методики для определения величин ΔH^m , которые для низкомолекулярных растворов могут быть измерены при непосредственном смешении компонентов.

Указанные обстоятельства обуславливают тот факт, что несмотря на большую научную ценность термохимических исследований, последние весьма немногочисленны и охватывают небольшой круг полимерных растворов. В течение ряда последних лет такие измерения были проведены и для водных растворов некоторых производных хитозана. Результаты этих исследований будут представлены ниже.

ОСОБЕННОСТИ ТЕРМОХИМИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ В РАСТВОРАХ ПОЛИМЕРОВ

Как известно, экспериментальному измерению доступны не сами функции состояния системы, а их изменения в ходе различных процессов. Для характеристики растворов в основном используют процесс смешения – т.е. процесс образования раствора заданного состава из чистых индивидуальных компонентов. Если смешение раствора проводят при постоянном давлении, то измеряемая при этом теплота равна приращению энтальпии системы. Формально она может быть определена по следующему уравнению:

$$\Delta H^m = H_p - \sum H_k, \quad (1)$$

из которого следует, что изменение энтальпии при смешении раствора с неизбежностью включает в себя величины, относящиеся к состоянию чистых индивидуальных компонентов.

Время самопроизвольного смешения полимера с низкомолекулярными компонентами очень велико и может существенно превышать допустимое время калориметрического опыта. В этом случае прямые калориметрические измерения энтальпии смешения в полимерных растворах невозможны и ее определение проводится с использованием термодимических циклов. Так энтальпия смешения полимера с растворителем во всей области составов определяется по следующему циклу, который был впервые использован в работах А.А. Тагер [1, 2], и иногда называется методом Тагер–Домбек (рис. 1).

Согласно этому циклу измеряемыми величинами являются энтальпия растворения ΔH_p навески чистого полимера в большом избытке растворителя и энтальпия разбавленных растворов требуемой концентрации ω_2 . Калориметрический эксперимент обычно проводят с малыми навесками полимера, не превышающими 0,1 г, что позволяет сократить время растворения и разбавления. Однако, применение микроколичества вещества требует использования калориметров с высокой чувствительностью. Наилучшим образом этим требованиям отвечают калориметры типа Кальве [3, 4]. Средняя удельная энтальпия смешения 1 г раствора рассчитывается по формуле

$$\Delta H^m(\omega_2) = \omega_2 [\Delta H_p - \Delta H_{\text{разб}}(\omega_2)].$$

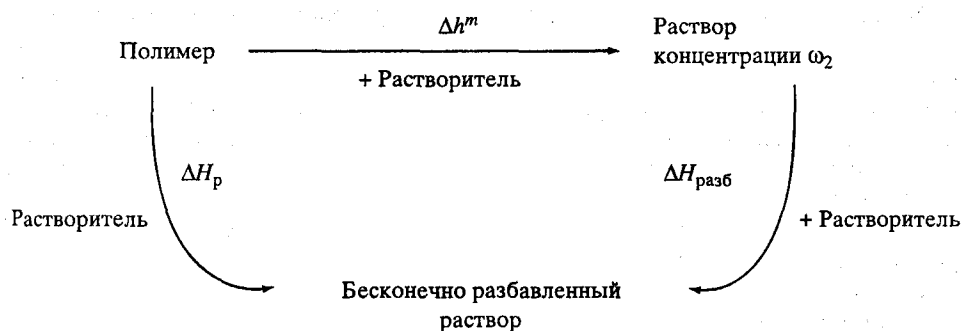
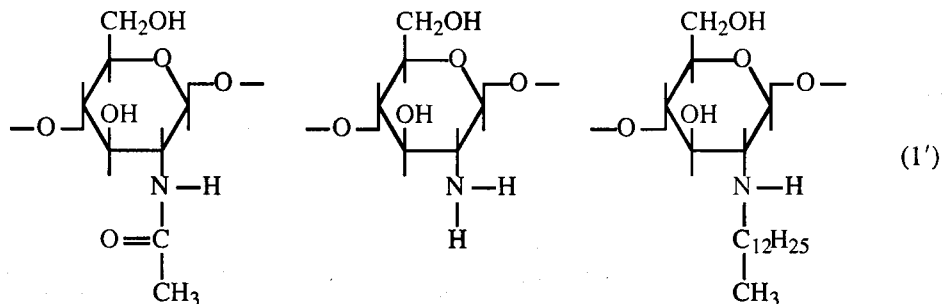


Рис. 1. Цикл Тагер–Домбек

ЭНТАЛЬПИИ РАЗБАВЛЕНИЯ И СМЕШЕНИЯ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ СОЛЕЙ ХИТОЗАНА

Были исследованы образцы хитозана и его алкилированного производного алкилхитозана. Эти полимеры содержат в своем составе звенья трех видов:



Образец хитозана содержал 12% звеньев типа (I) с ацетамидной группой и 88% звеньев типа (II) с аминогруппой. Образец алкилированного хитозана содержал 12% звеньев типа (I), 82% звеньев типа (II) и 6% звеньев типа (III) с додецильным радикалом. Образцы были представлены институтом CERMAV-CNRS (Франция) в рамках выполнения совместного гранта INTAS 96-1193. Молекулярная масса образцов составляла $2 \cdot 10^5$. Сами полимеры нерастворимы в воде. Для получения их водных растворов их необходимо перевести в солевую форму по реакции:



Нейтральные полимеры в водном растворе представляют собой катионные полиэлектролиты, на макромолекулах которых локализованы положительные заряды, а противоионами служат ионы кислотного остатка использованной кислоты. Нейтрализацию хитозана проводили уксусной и соляной кислотой, получая соответствующие соли. Необходимые для термодимических исследований образцы солей хитозана получали в виде пленок на ПЭ подложке испарением растворов в 1 М кислотах. Полученные образцы сушили в вакууме до постоянной массы.

Ацетат хитозана. На рис. 2 представлена концентрационная зависимость энтальпии разбавления растворов ацетатов хитозана и алкилхитозана в воде при 298 К в отсутствии и в присутствии низкомолекулярной соли – 0,2 М ацетата Na. По оси абсцисс отложена концентрация разбавляемого раствора, так что каждая точка на кривой представляет собой количество теплоты, сопровождающее разбавление раствора заданной концентрации ω_2 до очень малой конечной концентрации. Следует отметить, что для растворов полимерных электролитов существенное значение имеет точное поддержание конечной концентрации во всех опытах. Во всех случаях, рассмотренных ниже, разбавление раствора проводили до концентрации 1 г/л.

Видно, что величины $\Delta H_{\text{разб}}$ отрицательны во всей области составов, что указывает на энергетически выгодное взаимодействие полимеров с водой. Кривые концентрационных зависимостей состоят из трех участков: вогнутого участка при малых концентрациях, практически прямолинейного участка при средних концентрациях и выпуклого участка при высоких концентрациях полимера. По своей форме кривые сильно отличаются от аналогичных зависимостей для

растворов синтетических полимеров в органических жидкостях [5] и полимерных неэлектролитов в воде [6]. Сложный вид зависимостей $\Delta H_{\text{разб}}$ является следствием наличия различных вкладов в энтальпию разбавления водных растворов солей хитозана и алкилхлорида.

В работах [7, 8] было показано, что такой ход зависимости можно описать суперпозицией следующих вкладов в энтальпию смешения.

1. Вклад межмолекулярных взаимодействий звеньев полимера и молекул растворителя, который в простейшем случае можно рассчитать по теории Флори-Хаггинса

$$\Delta H_{\text{разб. в.}} = \chi RT \Phi_2, \quad (2)$$

где χ – параметр взаимодействия Флори-Хаггинса, Φ_2 – объемная доля полимера в разбавляемом растворе, R – газовая постоянная.

2. Вклад, обусловленного разрушением рыхлой метастабильной стеклообразной структуры полимера (ацетата хитозана) в процессе растворения

$$\Delta H_{\text{разб. с}} = \epsilon_{22} \Phi_2^0 \Phi_2^{1/\Phi_2^0 - 2}, \quad (3)$$

где ϵ_{22} – энергия когезии полимера, Φ_2^0 – параметр, характеризующий объемную долю метастабильных вакансий в исходной структуре стеклообразного полимера.

3. Вклад дальнедействующих электростатических взаимодействий между заряженными звеньями полимера и образующимися при диссоциации противоионами. Для системы перекрывающихся заряженных цепей в растворе, что на практике соответствует концентрации полиэлектролита более 1 г/л, в работе [8] в рамках скейлингового подхода было получено выражение для энергии раствора, учитывающее следующие виды электростатических взаимодействий:

4. Энергия противоионов, “конденсированных” на полиионе:

$$E_1 = \frac{e^2 N_a}{2b\epsilon} (1 - \beta^2) \ln \Phi_2,$$

где e – элементарный заряд, N_a – число Авогадро, ϵ – диэлектрическая проницаемость среды, b – среднее расстояние между зарядами в цепи, β – средняя концентрация “свободных” противоионов в растворе, которая может быть найдена как решение следующего уравнения [9]:

$$\ln \frac{1 - \beta}{\beta} = \ln \frac{\Phi_2^{1-u\beta}}{1 - \Phi_2},$$

где u – параметр плотности заряда цепи полиэлектролита [10]

$$u = \frac{e^2}{\epsilon k T b},$$

где k – постоянная Больцмана.

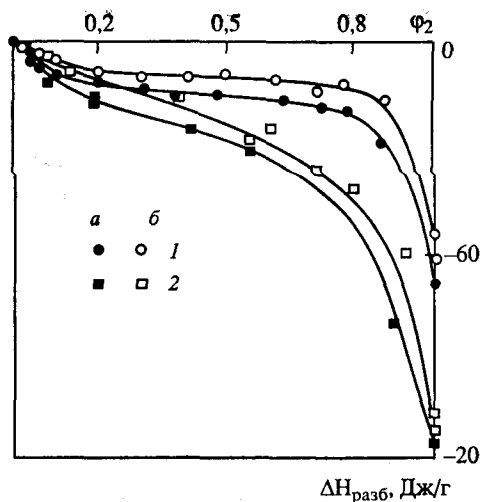


Рис. 2. Концентрационная зависимость энтальпии разбавления водных растворов ацетатов хитозана (1) и алкилхитозана (2) при 298K в отсутствие (а) и в присутствии (б) низкомолекулярной соли 0,2М NaCH₃COO

5. Энергия выпрямленной конформации макромолекулы, обусловленной отталкиванием заряженных звеньев полииона.

$$E_2 = \frac{e^2 N_a}{b} \left(\frac{\beta}{\varepsilon} \right)^{\frac{10}{7}} u^{-\frac{2}{7}}.$$

6. Энергия “свободных” противоионов в растворе в приближении Дебая-Хюккеля.

$$E_3 = -\frac{e^2 N_a}{b} \left(\frac{\beta}{\varepsilon} \right)^{\frac{3}{8}} \sqrt{8\pi i \Phi}.$$

Общая энергия раствора полиэлектролита представляет собой сумму:

$$E_{p. \text{эл.}} = E_1 + E_2 + E_3,$$

а энтальпия разбавления рассчитывается по формуле:

$$\Delta H_{\text{разб. эл.}} = E_{p. \text{эл.}}(\Phi_{2 \text{ кон}}) - E_{p. \text{эл.}}(\Phi_{2 \text{ нач}}), \quad (4)$$

где $\Phi_{2 \text{ нач}}$ и $\Phi_{2 \text{ кон}}$ – концентрация раствора до и после разбавления. Суммарная энтальпия разбавления представляет собой сумму вкладов (2)–(4).

$$\Delta H_{\text{разб}} = \Delta H_{\text{разб. в.з.}} + \Delta H_{\text{разб. с.}} + \Delta H_{\text{разб. эл.}} \quad (5)$$

На рис. 3 представлена концентрационная зависимость трех вкладов в энтальпию разбавления для модельного раствора, рассчитанных по формулам (2)–(4). Видно, что все они характеризуются отрицательными значениями энтальпии разбавления, но имеют разный ход концентрационной зависимости.

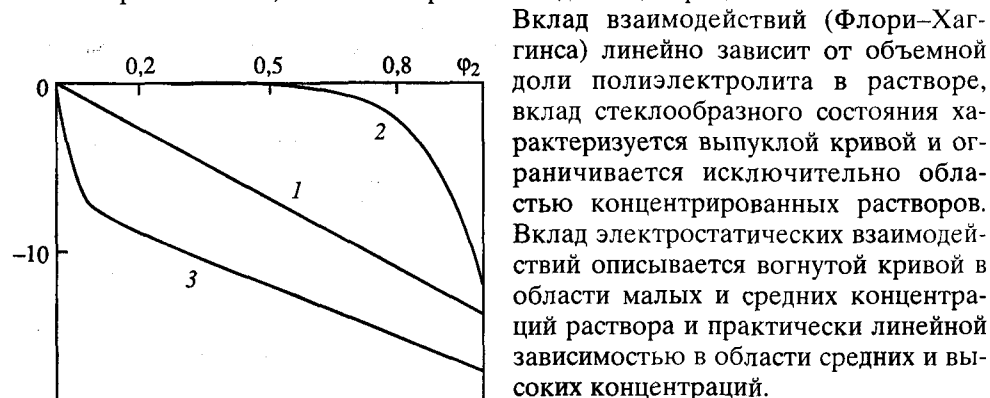


Рис. 3. Теоретические концентрационные зависимости вкладов в энтальпию разбавления для модельной системы

1 – вклад взаимодействия при $\chi = -0,1$; 2 – вклад стеклообразности при $\varepsilon_{22} = -120$ Дж/г, $\Phi_v^0 = 0,1$; 3 – вклад электростатических взаимодействий полиионов и противоионов при $u = 1$

Вклад взаимодействий (Флори-Хаггинса) линейно зависит от объемной доли полиэлектролита в растворе, вклад стеклообразного состояния характеризуется выпуклой кривой и ограничивается исключительно областью концентрированных растворов. Вклад электростатических взаимодействий описывается вогнутой кривой в области малых и средних концентраций раствора и практически линейной зависимостью в области средних и высоких концентраций.

Экспериментальные зависимости $\Delta H_{\text{разб}}$, представленные на рис. 2, были интерполированы суммой (5). Среднее отклонение интерполированных значений от экспериментальных не превышало 2%, что меньше суммарной погрешности экспериментальных измерений, которая составляла 5% (включая расчет по термохимическому циклу). Рассчитанные значения параметров, характеризующих структуру хитозана и межмолекулярные взаи-

Таблица. Энергетические и структурные параметры, определяющие энтальпию разбавления водных растворов ацетатов хитозана и алкилхитозана при 298 К

Полимер	χ	ϵ_{22} , Дж/г	ϕ_v^0	u	b , Å
Хитозан (бессолевогой раствор)	-0,01	-746	0,063	1,05	7
Алкилхитозан (бессолевогой раствор)	-0,21	-685	0,091	1,05	7
Хитозан в присутствии соли (0,2 М NaCH ₃ COO)	-0,01	-746	0,063	0,95*	7,3*
Алкилхитозан в присутствии соли (0,2 М NaCH ₃ COO)	-0,21	-685	0,091	0,95*	7,3*

* Эффективные значения.

модействия в растворе в рамках описанной модели, приведены в таблице. Данные в таблице показывают, что структурные параметры, характеризующие влияние стеклообразной природы и наличие заряженных групп в цепи полимера, изменяются незначительно (в пределах 10%) при переходе от хитозана к алкилхитозану и от бессолевого к солевому раствору. Так параметры ϵ_{22} и ϕ_v^0 не зависят от присутствия соли в растворе, но переход от хитозана к алкилхитозану несколько увеличивает рыхлость упаковки ϕ_v^0 и уменьшает энергию когезии ϵ_{22} полимера. Это вполне объяснимо, учитывая введение в макромолекулу длинных алкильных радикалов с малой энергией когезии. Параметр плотности заряда u и среднее расстояние между зарядами b одинаковы для хитозана и алкилхитозана, но несколько изменяются при переходе от бессолевого к солевому раствору, что связано с возникающим экранированием электростатических взаимодействий.

Что касается параметра межмолекулярных взаимодействий χ , то он не зависит от присутствия низкомолекулярной соли в растворе, но сильно зависит от наличия даже небольшого (6%) количества гидрофобных алкильных радикалов в главной цепи. В водном растворе хитозана параметр χ близок к нулю, т.е. выигрыш в энергии от взаимодействия полярных групп хитозана с молекулами воды практически полностью компенсируется проигрышем в энергии от разрушения связей между молекулами индивидуальных компонентов. Введение гидрофобных заместителей приводит, на первый взгляд, к неожиданному эффекту: взаимодействие с водой не ухудшается, а улучшается (!), параметр χ принимает большие отрицательные значения. Этот эффект связан со специфическими свойствами растворителя – воды, с изменением ее структуры под действием растворенного вещества [11].

Известно, что в водных растворах органических веществ могут наблюдаться два типа гидратации – гидрофильная и гидрофобная [12, 13]. Гидрофильная гидратация связана с возникновением сильных водородных связей между молекулами воды и полярными группами растворенного вещества. При этом исходная сетка водородных связей в структуре воды разрушается. При гидрофобной гидратации, которая в чистом виде наблюдается в растворах инертных газов, взаимодействие между молекулами самой воды и растворенного вещества отсутствует, но это приводит к усилению водородных связей между молекулами воды и упрочнению ее структуры. Оба типа гидратации сопровождаются выделением

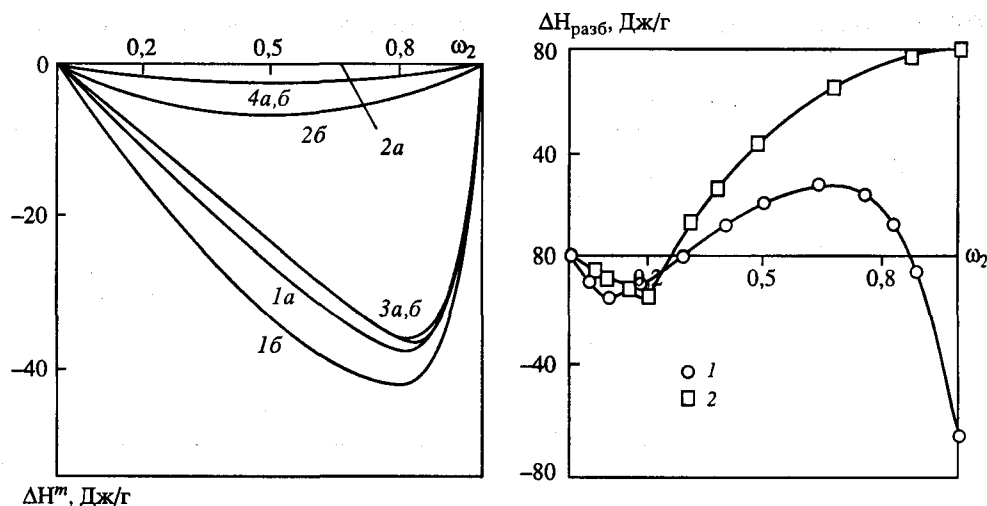


Рис. 4. Концентрационные зависимости энтальпии смешения

1 – водные растворы ацетатов хитозана (а) и алкилхитозана (б) при 298К; а также ее составляющих: 2 – межмолекулярное взаимодействие; 3 – стеклообразность; 4 – электростатические взаимодействия

Рис. 5. Концентрационные зависимости энтальпии разбавления водных растворов хлорида хитозана (1) и хлорида глюкозамина (2) при 298К

ем тепла и уменьшением энтропии [12]. Наличие двух типов гидратации было показано для водных растворов ряда синтетических полимеров [14–16]. По-видимому, введение в макромолекулу хитозана алкильных групп способствует дополнительной гидрофобной гидратации и увеличивает экзотермический эффект смешения с водой.

Проведенный анализ концентрационных зависимостей $\Delta H_{\text{разб}}$ для растворов ацетата хитозана позволяет рассчитать концентрационные зависимости отдельных вкладов в энтальпию смешения. Эти данные представлены на рис. 4. Все они имеют вид кривых с минимумом, полностью лежащих в области отрицательных значений. Видно, что как для ацетата хитозана, так и для ацетата алкилхитозана преобладающим является вклад стеклообразной структуры этих полимеров.

Хлорид хитозана. На рис. 5 представлена концентрационная зависимость энтальпии разбавления водного раствора хлорида хитозана при 298К. По характеру она резко отличается от представленной на рис. 2 аналогичной зависимости для ацетата хитозана. На кривой $\Delta H_{\text{разб}}$ для хлорида хитозана также имеются три участка, однако средний участок имеет положительный наклон и на нем наблюдаются эндотермические эффекты разбавления. Подобный ход концентрационной зависимости $\Delta H_{\text{разб}}$ характерен для растворов частично-кристаллических полимеров, аморфная часть которых находится в стеклообразном состоянии [7, 17]. Это позволяет предположить, что в отличие от ацетата, хлорид хитозана содержит существенную долю кристаллических участков. В пользу этого предположения также свидетельствует сходство концентрационной зависимости $\Delta H_{\text{разб}}$ для хлорида хитозана и аналогичной зависимости для хлорида глюкозамина – кристаллического низкомолекулярного аналога звена хитозана, которая также представлена на рис. 5.

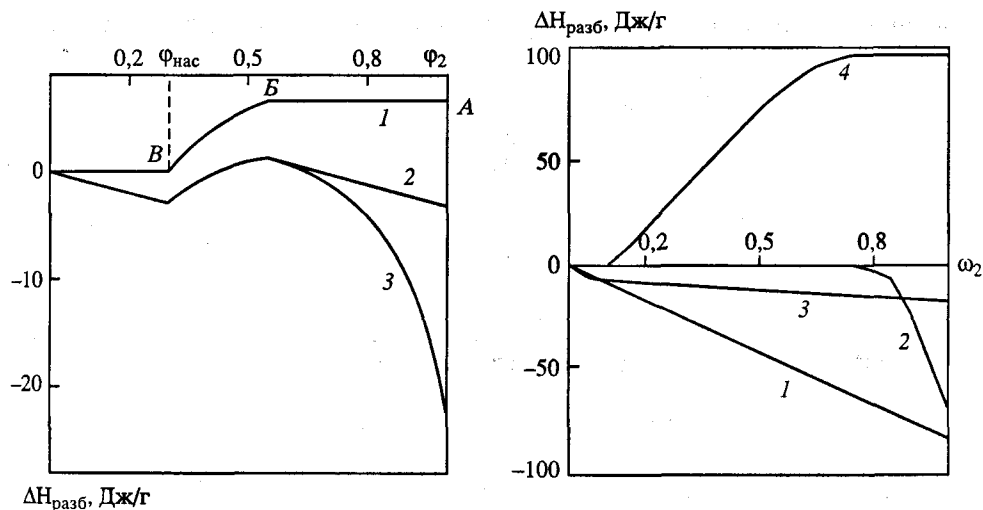


Рис. 6. Теоретические концентрационные зависимости энтальпии разбавления растворов частично-кристаллического полимера

1 – в атермическом растворителе; 2 – в неатермическом растворителе; 3 – с учетом стеклообразности аморфной части полимера

Рис. 7. Рассчитанные вклады в энтальпию разбавления водного раствора хлорида хитозана при 298K

1 – межмолекулярные взаимодействия; 2 – стеклообразность аморфной части; 3 – электростатические взаимодействия; 4 – плавление кристаллитов (4)

С учетом этого, концентрационная зависимость $\Delta H_{\text{разб}}$ для хлорида хитозана по сравнению с выражением (5) включает дополнительный вклад $\Delta H_{\text{разбл, пл}}$, обусловленный разрушением кристаллитов при растворении:

$$\Delta H_{\text{разб}} = \Delta H_{\text{разб, вэ}} + \Delta H_{\text{разб, с}} + \Delta H_{\text{разб, эл}} + \Delta H_{\text{разб, пл}} \quad (5)$$

Способ оценки этого вклада подробно описан в работах [7, 17, 18]. Рассмотрим схематичную зависимость энтальпии разбавления раствора частично-кристаллического полимера, представленную на рис. 6. Кривая 1 отвечает случаю, когда растворитель является атермическим, а аморфная часть полимера находится в высокоэластическом состоянии. Ордината точки А на кривой 1 (рис. 6) соответствует энтальпии растворения ΔH_p , которая равна $\Delta H_{\text{пл}}$ кристаллических областей. При добавлении в систему растворителя он вначале распределяется в аморфной части полимера, количество кристаллитов остается неизменным, и $\Delta H_{\text{разб}}$ не изменяется с составом вплоть до точки В, где раствор в аморфной фазе становится насыщенным относительно кристаллитов при данной температуре. В смесях, где концентрация полимера меньше, чем в точке В, количество кристаллитов пропорционально уменьшается и $\Delta H_{\text{разб}}$ также соответственно понижается вплоть до точки В, которая соответствует пределу растворимости частично кристаллического полимера $\phi_{2, \text{нас}}$ – его насыщенному раствору. Зависимость $\Delta H_{\text{разб}}$ от количества предварительно добавленного растворителя является линейной, однако концентрация раствора, выраженная в массовых, мольных или объемных долях – нелинейная функция количества компонента в растворе, поэтому участок ВВ на рис. 6 представляет собой не прямую, а кри-

вую линию, подчиняющуюся простому уравнению

$$\Delta H_{\text{разб}}(\varphi_2) = \Delta H_p \frac{\varphi_2 - \varphi_{2,\text{нас}}}{\varphi_2(1 - \varphi_{2,\text{нас}})}.$$

Абсцисса точки Б на рис. 6 зависит от концентрации насыщенного раствора $\varphi_{2,\text{нас}}$ и степени кристалличности полимера k . Несложные рассуждения приводят к следующей взаимосвязи:

$$\varphi_{2,\text{Б}} = \frac{\varphi_{2,\text{нас}}}{1 - k(1 - \varphi_{2,\text{нас}})}.$$

Кривая 1 на рис. 6 соответствует следующему набору параметров

$$\Delta H_{\text{пл}} = 10 \text{ Дж/г}, \quad \varphi_{2,\text{нас}} = 0,3, \quad k = 0,6.$$

Концентрационная зависимость $\Delta H_{\text{разб}}$ в неатермическом растворе частично кристаллического полимера будет представлять собой комбинацию зависимости, изображенной кривой 1 на рис. 6, и линейной зависимости 2, которая описывает этот случай при $\chi = -1$. Видно, что “включение” энергетически сильных межмолекулярных взаимодействий при растворении кристаллического полимера приводит к появлению трех наклонных участков на кривой $\Delta H_{\text{разб}}$. Кривая 3 на рис. 6 представляет собой концентрационную зависимость $\Delta H_{\text{разб}}$ для той же модельной системы, что и кривые 1, 2, но с добавлением вклада (3) при следующих значениях параметров: $\epsilon_{22} = -80 \text{ КДж/моль}$, $\varphi_0^0 = 0,1$. Видно, что концентрационная зависимость $\Delta H_{\text{разб}}$ в этом случае имеет те же особенности, что и наблюдаемые на опыте для растворов хлорида хитозана (см. рис. 5).

Для растворов хлорида хитозана дополнительно следует учесть вклад электростатических взаимодействий, задаваемый выражением (4). Можно считать, что по величине он равен аналогичному вкладу для растворов ацетата хитозана, поскольку степень ионизации обеих солей одинакова. Вычитая его из экспериментальной зависимости $\Delta H_{\text{разб}}$ для хлорида хитозана (см. рис. 5), получим зависимость, подобную представленной на рис. 6 для модельной системы. Обратим внимание на то, что в этом случае наклон зависимости $\Delta H_{\text{разб}}$ на начальном участке в области разбавленных растворов определяется только вкладом межмолекулярных взаимодействий (Флори–Хаггинса) по уравнению (2), что позволяет найти параметр Флори–Хаггинса для водного раствора хитозана. Он равен $\chi = -0,61$. Далее, вычленив этот вклад из $\Delta H_{\text{разб}}$, последовательно находим вклады кристалличности и стеклообразности.

Концентрационные зависимости всех вкладов в $\Delta H_{\text{разб}}$ представлены на рис. 7. Видно, что в отличие от трех других, вклад кристалличности $\Delta H_{\text{разб,пл}}$ положителен, поскольку связан с разрушением кристаллической решетки. Положение точек перегиба на концентрационной зависимости $\Delta H_{\text{разб,пл}}$ и ее кривизна позволяют оценить параметры кристаллической фазы для хлорида хитозана. Они составляют:

$$\Delta H_p = 102 \text{ Дж/г} = \Delta H_{\text{пл}}^* \quad k = 0,91.$$

Полученное значение $\Delta H_{\text{пл}}^*$, конечно, имеет эффективный характер, так как в данном случае речь идет об “изотермическом плавлении” кристаллитов под действием растворителя при 298К. Тем не менее, поскольку температура плавления хитозана находится выше его температуры разложения, и истинная теплота плавления кристаллитов не доступна калориметрическому измерению,

сделанная оценка этой величины представляет несомненный интерес. Полученная величина $\Delta H_{\text{пл}}^*$ по порядку близка к значениям для сложных полиэфиров и полиамидов [19, 20]. Также обращает на себя внимание высокая степень кристалличности хлорида хитозана. По-видимому, малые размеры иона Cl^- не мешают образованию кристаллитов, а межионные взаимодействия способствуют регулярной упаковке цепей. В отличие от хлорида, ацетат хитозана не обнаруживает признаков кристалличности по данным термохимических измерений. Возможно кристаллизации в этом случае препятствует большой объем и сложная форма ацетатных ионов.

Параметры стеклообразной упаковки аморфной части хлорида хитозана, рассчитанные из анализа концентрационной зависимости $\Delta H_{\text{разб}}$ составляют

$$\epsilon_{22} = -980 \text{ Дж/г}; \quad \varphi_v^0 = 0,076. \text{ Эти ве-}$$

личины достаточно близки к представленным в таблице данным для ацетатов. Несколько большее значение энергии когезии, по-видимому, обусловлено тем, что хлоридный ион, имея малые размеры, не препятствует более тесному сближению цепей хитозана при их взаимодействии в растворе. Энергия когезии приблизительно на порядок выше, чем $\Delta H_{\text{пл}}^*$. Данное соотношение отражает тот факт, что при плавлении кристаллитов разрушаются лишь некоторые межцепные связи, а большая их часть сохраняется в расплаве или концентрированном растворе.

На рис. 8 представлены концентрационные зависимости всех вкладов в энтальпию смешения хлорида хитозана с водой при 298 К, рассчитанные с использованием указанных значений параметров. Видно, что вклады межмолекулярных и межионных взаимодействий, а также стеклообразности аморфной части отрицательны, а вклад плавления кристаллитов положителен. Преобладающее влияние на величину суммарной энтальпии смешения оказывают два последних вклада.

В целом можно отметить, что концентрационная зависимость энтальпии смешения менее информативна, чем зависимость энтальпии разбавления. Основными вкладами в ΔH^m являются структурные, которые маскируют проявление различных видов взаимодействий в растворе. Это является прямым следствием уравнения (1), из которого видно, что величины энтальпии смешения при любом составе раствора включают в себя энтальпию разрушения структуры чистых компонентов. Напротив, величины энтальпии разбавления несут информацию только о состоянии растворов разной концентрации и поэтому оказываются более информативными при анализе сложных случаев суперпозиции разных видов взаимодействия в растворах полимеров.

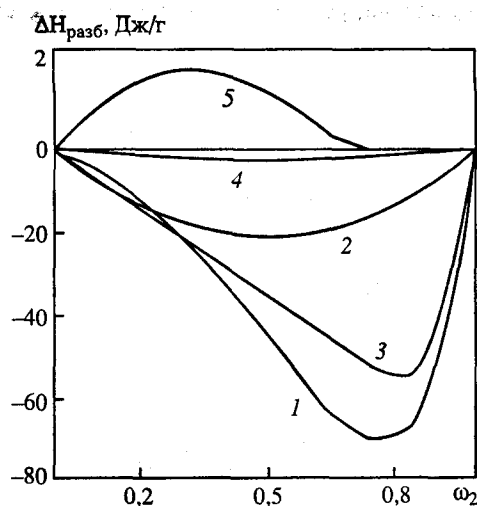


Рис. 8. Концентрационные зависимости водного раствора хлорида хитозана 298К

1 — энтальпия смешения; вклады в энтальпию: 2 — межмолекулярное взаимодействие; 3 — стеклообразность; 4 — электростатическое взаимодействие; 5 — плавление кристаллитов

ВЫВОДЫ

1. Энтальпия разбавления и смешения водных растворов солей хитозана имеет сложный интегральный характер и определяется суперпозицией межмолекулярных взаимодействий звеньев полимера и молекул воды, электростатических взаимодействий ионов, наличием кристаллических и стеклообразных аморфных участков в структуре полимера.

2. Для ацетата хитозана термохимически не обнаруживаются признаков кристалличности. Энтальпия смешения с водой отрицательна, основной вклад в нее вносит энтальпия разрушения метастабильной стеклообразной структуры полимера. Параметр взаимодействия Флори–Хаггинса практически равен нулю. Введение в хитозан небольшого числа гидрофобных алкильных заместителей увеличивает экзотермический эффект взаимодействия с водой за счет усиления гидрофобной гидратации. Параметр взаимодействия Флори–Хаггинса становится равен: $-0,21$.

3. Хлорид хитозана при растворении ведет на себя как полимер с высокой, порядка 90%, степенью кристалличности. Поэтому, несмотря на более экзотермическое смешение с водой и более отрицательные значения параметра взаимодействия: $-0,61$, в отличие от ацетата хитозана его смеси с водой в области высоких и средних концентраций являются гетерогенными.

4. Полиэлектролитная природа солей хитозана вносит лишь небольшой вклад в интегральные значения энтальпии смешения их с водой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тагер А.А., Домбек Ж.С. // Колл. журн. 1953. Т. 15, № 1. С. 69–80.
2. Тагер А.А. Физикохимия полимеров. М.: Химия, 1978. 544 с.
3. Кальве Э., Прат А. Микрокалориметрия / Перев. с фр. М.: Издательство, 1963. 477 с.
4. Хеммингер В., Хене Г. Калориметрия, теория и практика. М.: Химия, 1989. 176 с.
5. Тагер А.А. // Высокомолекулярное соединение. А. 1971. Т. 13, № 2. С. 467–484.
6. Тагер А.А., Сафронов А.П., Лопырев В.А. и др. // Там же. 1987. Т. А29. № 11. С. 2421–2425.
7. Сафронов А.П. Термодинамика смешения нерегулярных растворов полимеров. Дис. ... докт. физ.-мат. наук. Екатеринбург: УрГУ, 2000. 373 с.
8. Safronov A.P., Zubarev A.Yu. // Polymer 2002. V. 43. P. 743–748.
9. Гросберг А.Ю., Хохлов А.Р. Статистическая физика макромолекул. М.: Наука, 1989. 344 с.
10. Моравец Г. Макромолекулы в растворе. М.: Мир, 1967. 398 с.
11. Water: A comprehensive treatise V. 1–6 / Ed. Franks F. N.Y.: Plenum. 1972–1979.
12. Белоусов В.П., Панов М.Ю. Термодинамика водных растворов неэлектролитов. Л.: Химия, 1983. 264 с.
13. Кесслер Ю.М., Зайцев А.Л. Сольвофобные эффекты. Л.: Химия, 1989. 312 с.
14. Тагер А.А., Сафронов А.П., Шарина С.В., Галаев И.Ю. // Высокомолекулярное соединение. А. 1990. Т. 32, № 3. С. 529–534.
15. Tager A.A., Safronov A.P., Sharina S.V., Galaev I.Yu. // Colloid Polym Sci. 1993. V. 271, N 9. P. 868–872.
16. Tager A.A., Safronov A.P., Berezyuk E.A., Galaev I.Yu. // Ibid, 1994. V. 272, N 10. P. 1234–1239.
17. Сафронов А.П., Суворова А.И., Королева Е.В. // Высокомолекулярное соединение. 2000. Т. 44, № 2. С. 275–281.
18. Сафронов А.П., Ковалев А.А. // Там же. 1999. Т. 41, № 6. С. 1008–1014.
19. Коршак В.В. Химическое строение и температурные характеристики полимеров. М.: Наука, 1970. 412 с.
20. Ван Кревелен Д.В. Свойства и химическое строение полимеров. М.: Химия. 1976. 415 с.

ПРОИЗВОДНЫЕ ХИТИНА И ХИТОЗАНА И ИХ СВОЙСТВА

Л.А. Нудьга

Институт высокомолекулярных соединений РАН Санкт-Петербург
noudga@imc.macro.ru

Хитин и его дезацетилированное производное хитозан привлекли внимание широкого круга исследователей и практиков благодаря комплексу химических, физико-химических и биологических свойств и неограниченной воспроизводимой сырьевой базой. Полисахаридная природа этих полимеров обуславливает их сродство к живым организмам, а наличие реакционноспособных функциональных групп обеспечивает возможность разнообразных химических модификаций, позволяющих усиливать присущие им свойства или придавать новые в соответствии с предъявляемыми требованиями.

С середины XX в. синтезировано и исследовано большое количество производных хитина и хитозана, многие из которых нашли практическое применение. Состояние исследований отражено в многочисленных обзорах [1-4] и нескольких монографиях [5-7]. На русском языке опубликовано значительно меньше обобщающей литературы [8—10], а монографии отсутствуют. Настоящий обзор посвящен современному состоянию в области химии хитина и хитозана.

Хитин, имеющий химическое строение поли-1 \rightarrow 4, β -D(N-ацетил-2-амино-2-дезоксиглюкопиранозы) обладает двумя гидроксильными группами, одна из которых у C-3 - вторичная, а вторая у C-6 - первичная. По этим функциональным группам может быть осуществлено получение простых и сложных эфиров. Ацетамидная группа хитина, расположенная у C-2, химически инертна, но в сильно щелочной среде при высокой температуре она превращается в первичную аминогруппу с отщеплением уксусной кислоты. Образующееся при этом производное хитина - хитозан - приобретает дополнительную реакционноспособную функциональную группу, поэтому кроме простых и сложных эфиров на хитозане возможно получение N-производных различного типа. Кроме того, на обоих полисахаридах возможно проведение привитой полимеризации с получением как гибридных сополимеров, сочетающих полисахаридную основную цепь с синтетическими привитыми цепями, так и разветвленных полисахаридов, у которых боковые цепи образованы за счет полимеризации моносахаридов другого строения.

Для синтеза производных используют различные технологические приемы. Синтез может быть проведен в гомогенных или в гетерогенных условиях с при-

менением растворителей или разбавителей, или же в твердой фазе при механической активации.

Каждый из способов получения имеет свои преимущества и недостатки. В гомогенных условиях удастся получить наиболее высокозамещенные и однородные продукты. Недостаток способа - необходимость применения дорогостоящих и иногда технологически неудобных растворителей или дополнительных энергетических затрат для замораживания. В гетерогенных условиях в твердой фазе при сочетании механических и тепловых воздействий продукты получают неоднородными и сильно деструктурированными, но время, затраченное на синтез, сокращается до нескольких минут. Дисперсионный метод обеспечивает более однородное распределение заместителей, но для высокого замещения, как правило, необходимо длительное время реакции, а также использование разбавителей, регенерация которых часто невозможна или требует значительных дополнительных затрат. Некоторые реакции начинаются как гетерогенные в среде разбавителя, а заканчиваются в гомогенных условиях, так как продукт с высоким замещением приобретает растворимость в реакционной среде.

Учитывая низкую реакционную способность хитина и хитозана вследствие их высококристаллической надмолекулярной организации, часто используют предварительную активацию полимеров путем переосаждения, механических обработок, воздействий ультразвукового или микроволнового облучения. Эти обработки разрушают межмолекулярные водородные связи, аморфизируют структуру, тем самым облегчая доступ реагентов к реакционноспособным группам. Однако, такие воздействия одновременно вызывают снижение молекулярной массы полисахаридов. Резкое увеличение реакционной способности хитина наблюдается при замораживании его в концентрированных растворах едкого натра. Происходящее при этом беспорядочное частичное дезацетилирование вызывает аморфизацию хитина и переход в гелеобразное состояние. В таких условиях удобно проводить реакции алкилирования, а для реакций ацилирования используются выделенный при разбавлении водой порошкообразный высокоактивный хитин.

Все эти способы успешно применяются для синтеза производных хитина и хитозана. Выбор способа получения обусловлен применяемыми реагентами и желаемыми свойствами продукта.

ПРОИЗВОДНЫЕ ХИТИНА

Сложные эфиры хитина и неорганических кислот. Работы по синтезу эфиров хитина и неорганических кислот были начаты в начале XX в. и касались хорошо известных на целлюлозе производных, получивших практическое применение. Одним из первых производных хитина был получен нитрохитин, представлявший в то время интерес как основа для получения взрывчатого вещества - нитрошелка. Нитраты хитина были синтезированы обработкой хитина дымящей азотной кислотой [11]. Кинетика этого процесса была исследована в [12] и было установлено, что степень замещения ($СЗ$), равная 1,5 ед., достигается за час. Полученный нитрат воспламенялся при 163 °С и имел рентгенограмму, идентичную рентгенограмме хитина. В более поздней работе Марченко [13] было показано, что при нитровании воздушно-сухого хитина при 20 °С азотной кислотой с $d = 1,5 \text{ г/см}^3$ и модуле ванны 1 : 50 можно получить нитрохитин со $СЗ = 1,94$. Осажденный водой продукт растворялся в диметилформамиде и его смеси с ацетоном. Накопление нитратного азота в хитине приводит к конфор-

мационной перестройке макроцепей хитина, увеличению их подвижности, переходу от фибриллярной структуры, характерной для хитина, к гранулярной.

Сульфаты хитина были получены действием хлорсульфоновой кислоты в различных средах: в пиридине в течение 7 ч было введено 14,4% серы [14], в среде дихлорэтана за 2 ч содержание серы составляло 13-15% [15]. Эти продукты растворялись в воде и имели молекулярную массу 14000-170000, определенную методом осмометрии. Антикоагуляционное действие сульфата хитина по отношению к крови было обнаружено еще в 1935 г., но одновременно была показана токсичность этого производного [16], поэтому дальнейшие исследования проводились на сульфатах хитозана. В последнее время наблюдается возврат интереса к сульфатам хитина в связи с обнаружением новых видов их биологической активности. В работе [17] отмечено ингибирование опухолевых метастаз сульфированными производными хитина. Анти-ВИЧ -активность показана японскими исследователями [18]. Противовоспалительное действие обнаружено при изучении сульфатов, фосфатов и смешанных фосфатов-сульфатов хитина [19].

Фосфаты хитина были синтезированы действием хлорокиси фосфора на хитин при 40 °С в течение 5 ч [14]. Фосфаты хитина, полученные действием 70%-ной фосфорной кислоты при 2 °С в течение 48 ч, были использованы для прядения волокна после растворения в водно-этанольной смеси при охлаждении [20]. Высокофосфорилированный хитин был приготовлен реакцией с пятиокисью фосфора в метансульфокислоте при охлаждении до 0-5 °С в течение 2 ч. Далее к реакционной смеси добавляли хлорангидрид адипиновой кислоты для сшивания макромолекул. Конечный продукт представлял собой соединение, нерастворимое в воде, содержащее 7,4% Р, что соответствует монозамещению, со степенью сшивания 0,9. Исследование сорбции щелочно-земельных металлов показало 5-6-кратное увеличение сорбционной емкости продукта по сравнению с исходным хитином [21]. В дальнейшем были получены фосфорсодержащие производные хитина типа фосфинатов по реакции конденсации с гидроксиметилфосфином при комнатной температуре. Содержание фосфора составляло 5,1% [22].

Ксантогенирование хитина было предпринято с целью получения волокон и пленок из хитина по аналогии с вискозным процессом на целлюлозе. Мерсеризацию хитина проводили 43%-ным раствором NaOH при 25 °С в течение 2 ч, затем алкалехитин смешивали со льдом и вводили сероуглерод, при этом наблюдалась желатинизация хитина с последующим растворением [23]. Ксантогенаты хитина были использованы как промежуточные соединения при синтезе других серусодержащих производных хитина: О-бензилтиокарбонил- и О-алкилтиокарбонилхитина [24], а также при синтезе О-алкильных производных хитина путем действия на щелочной раствор ксантогената хитина соответствующего галоидного алкила [25]. Благодаря такому приему реакции проходили в гомогенных условиях, что обеспечивало высокие степени замещения конечного продукта.

Мезиловые и тозилловые эфиры хитина получены действием метан- и и-толуолсульфокислот на переосажденный хитин в сухом пиридине при комнатной температуре. Получение монозамещенных производных требовало длительного времени 7-10 сут [26]. Тозилловые эфиры хитина были также синтезированы при действии тозилхлорида в среде хлороформа на алкалехитин, полученный при низкотемпературной обработке концентрированным раствором едкого натра. Реакция протекает межфазно между двумя перемешиваемыми растворами: хитина в щелочи и тозилхлорида в хлороформе, в течение 1 ч при 0 °С, а затем

в течение 4 ч при комнатной температуре. При мольном соотношении хитин : тозилхлорид 1 : 30 были получены производные с $СЗ > 1$ с тозильной группировкой у C-6.

Тозилхлорид хитина растворим в диметилацетамиде и диметилсульфоксиде, что было использовано для синтеза йод-хитина действием избытка йодистого натрия [27]. Такой же прием был использован для синтеза других производных хитина [28]. Синтез высокозамещенного тозилхитина в гомогенных условиях был осуществлен в растворе LiCl/ДМАА действием тозилхлорида. При дальнейшей обработке полученного тозилхитина избытком роданида калия в среде ДМСО или ДМФА был получен дезокситиоцианат хитина [29].

Сложные эфиры хитина и карбоновых кислот. Ацилирование хитина осуществляют взаимодействием с ангидридами или хлорангидридами соответствующих кислот. Для ускорения реакции используют катализаторы (в основном хлорную кислоту) и различные реакционные среды, способствующие получению растворимых продуктов.

Из сложных эфиров хитина с органическими кислотами первыми были получены ацетаты действием уксусного ангидрида в присутствии сухого хлористого водорода. Полностью ацетилованный хитин был приготовлен в течение 5 сут при комнатной температуре. Продукт был растворим в муравьиной кислоте [30]. Ацелирование хитина смесью уксусной кислоты и уксусного ангидрида в присутствии хлористого цинка продолжалось три месяца. Продукт со $СЗ = 2,5$ был сильно разрушен [12]. Гомогенное ацелирование в растворе хитина в фосфорной кислоте с хлорной кислотой в качестве катализатора при 80 °C не дало полностью замещенного продукта. При $СЗ = 1,8$ эфир был растворим в резорцине и феноле [31]. Диацетилхитин, растворимый в 85%-ной муравьиной кислоте был получен действием на хитин уксусного ангидрида в растворе метансульфоновой кислоты [32]. В дальнейшем для получения диацетата хитина в качестве среды реакции использовали трихлоруксусную [33] или толуолсульфокислоту [34], уксусный ангидрид как ацетилирующий агент и хлорную кислоту как катализатор. Продукт растворялся в муравьиной или трифторуксусной кислоте, из растворов были получены прозрачные пленки или мембраны.

Так как результаты ацелирования не привели к созданию удобного технологического процесса для переработки хитина в волокно или пленки из-за агрессивности и летучести растворителей диацетатов, то поиски производных, растворимых в обычных растворителях, были предприняты среди других ацилатов хитина. Ацилирование хитина ангидридами карбоновых кислот (C_{2-5}) было изучено в системах, содержащих трифторуксусную кислоту и хлорированные углеводороды при 5-25 °C [35]. Реакция протекала в гомогенных условиях и давала монозамещенные продукты. Более длинные ацильные остатки (C_{6-12}) были введены в хитин в работе [36], при степени ацилирования 1,7-1,8 производные растворялись в бензоле, m-крезоле, тетрагидрофуране, метилхлориде, дихлоруксусной кислоте. Миристил хитина был получен при растворении хитина в смеси 1,3-диметил-2-имидазалан/LiCl действием хлорангидрида миристиновой кислоты при кипячении в присутствии хлороформа [37].

Из ацильных производных хитина наиболее перспективным для получения хитинового волокна оказался дибутирилхитин. Синтез этого производного был разработан в 1996 г. Счосланд [38]. Хитин растворяли в N-метилпирролидоне с 5% хлорида лития при 25 °C, реакцию с масляным ангидридом вели в течение 2 ч в присутствии хлорной кислоты при 20-25 °C. Продукт хорошо растворялся в ацетоне и ДМФА. Из растворов методом сухого формования были получены волокна дибутирилхитина, которые при щелочном омылении переходили в хи-

тиновые волокна с сохранением удовлетворительных механических свойств [39]. Из растворов дибутирилхитина были получены также микрокапсулы, которые использованы как носители для биоактивных лекарств [40].

Растворимость ацильных производных хитина может быть повышена также путем введения двух ацильных заместителей разной длины - ацетила и бутирила или валерила. Реакцию с ангидридами соответствующих кислот ведут в метансульфокислоте с катализатором. Общая СЗ составляет 1,5-1,9 [41].

Для ацильных производных хитина с длиной заместителя от C_2 до C_6 со СЗ = 1,5-2 было обнаружено образование жидкокристаллической фазы в растворах при концентрациях выше критической, которая составляет 0,25 для ацетилхитина и 0,37 для гексаноилхитина [42].

Водорастворимые производные хитина были приготовлены по реакции раскрытия кольца циклических ангидридов кислот в растворе ДМФА/LiCl. Были использованы ангидриды янтарной, малеиновой, глутаровой, тетрагидрофталевой, тримеллитовой и других кислот. Почти все продукты были монозамещенными и в Na-форме хорошо растворялись в воде [43].

Ароматические сложные эфиры хитина были получены по реакции с хлорангидридами бензойной, *n*-метилбензойной, *n*-трет-бутилбензойной кислот в присутствии метансульфокислоты при низкой температуре. Производные имели СЗ = 0,5-2 в зависимости от концентрации хлорангидрида. Эфиры имели схожие ИК-спектры и растворялись в общих органических растворителях [44].

Ариллаты хитина были получены также с использованием высоконабухшего состояния хитина, достигаемого в концентрированной щелочи при охлаждении. Обработка хитина фталевым, тримеллитовым и пиромеллитовым ангидридами осуществлялась в апротонных растворителях. Нагревание приводило к имидизации производных и способствовало удалению ангидридов, прореагировавших по гидроксильным группам. В конечном итоге были получены селективно N-замещенные производные, растворимые в органических растворителях и водно-щелочных растворах [45].

Простые эфиры хитина. Синтез алкильных производных хитина проводят двумя способами:

1. По механизму замещения с помощью различных алкилирующих агентов: диметилсульфата, галоидных алкилов, галоидзамещенных кислот и пр. Реакцию ведут в присутствии щелочных агентов, являющихся акцепторами протонов.

2. По механизму присоединения, используя реакции раскрытия циклов (окиси алкиленов, алкилсультоны) или по реакции Михаэля, используя непредельные соединения (акрилонитрил). В этом случае также необходима щелочная среда в качестве катализатора раскрытия кольца или для активации двойной связи.

Первые опыты по метилированию хитина были проведены Шорыгиным и Землянской в 1935 г. Многократное воздействие диметилсульфата на алкалехитин привело к получению монометилхитина, растворимого в муравьиной и частично в уксусной кислоте [46].

Этилхитин со СЗ = 1,57 был получен в жестких условиях реакцией хлористого этила с алкалехитином. Из растворов продукта в диметилэтилкетоне были отлиты пленки с удовлетворительными механическими свойствами [47].

Гидроксиэтиловые эфиры хитина получены действием окиси этилена на алкалехитин. Реакцию проводили как в гетерогенных [47], так и в гомогенных условиях [48]. Синтез водорастворимых производных требовал большого избытка окиси этилена. Гидроксиэтилхитин со СЗ = 0,3-0,8 был синтезирован обработкой хитина этиленхлоргидрином и был испытан для определения активности лизоцима [49].

Дигидроксипропиловый эфир хитина получен взаимодействием с α -моноклоргидрином глицерина в присутствии Na-додецилсульфата, что позволило понизить концентрацию щелочи и получить водорастворимый продукт с замещением по гидроксилам при C-2 и C-6 [50].

Глицериновые эфиры хитина были синтезированы двумя способами: действием моноклоргидрина глицерина и действием глицидола в щелочной среде [51]. В первом случае СЗ составляла 1,5, но продукт был нерастворим из-за частичной сшивки, во втором СЗ = 1,24 и продукт растворялся в органических кислотах и воде. В обоих случаях имело место значительное дезацетилирование.

Большое число работ посвящено синтезу и изучению карбоксиметилхитина (КМХ). В качестве этерифицирующего агента все исследователи используют моноклоруксусную кислоту (МХУ) или ее натриевую соль, реакцию ведут в присутствии щелочи. Различие методов состоит в способе подготовки хитина к реакции и в использовании разбавителя. В щелочном растворе хитина карбоксиметилирование сопровождается сильным гидролизом ацетамидной группы, замещение протекает в основном по первичному гидроксилу [52]. В гетерогенных условиях при действии МХУ на алкалехитин при 20-60 °С в течение 20 ч был получен монозамещенный продукт, растворимый в воде [53]. Для предварительной активации хитина использовали набухание в диметилсульфоксиде [54], при этом продукт полностью растворялся в воде. Активация хитина водно-изопропанольным раствором едкого натра позволила сократить продолжительность реакции до 3 ч с получением монозамещенного КМХ с незначительным дезацетилированием [55]. Небольшие добавки додецилсульфата в реакционную смесь дали водорастворимый КМХ при СЗ = 0,6 [50]. Возможность осуществления карбоксиметилирования хитина в условиях пластического течения при одновременном воздействии сдвиговых и температурных воздействий впервые была показана в работе [56]. Этот гетерофазный процесс протекает при меньшем расходе реагентов (едкого натра, растворителей и воды) в течение нескольких минут. Продукт неоднороден по СЗ и значительно деструктурирован.

Изучение химического состава КМХ методом ЯМР и по скорости гидролиза лизоцимом показало, что при СЗ = 0,65-1,5 заместители располагаются преимущественно у C-6. Положение заместителя у C-3 сильнее замедляет скорость гидролиза лизоцимом, чем замещение у C-6 [57].

КМХ как водорастворимое производное хитина с карбоксильной группой обладает комплексообразующей и сорбционной способностью. КМХ в качестве сорбента металлов был исследован в работах [58, 59]. Было установлено, что КМХ хорошо сорбирует ионы Ca^{2+} и Fe^{2+} , превращаясь при этом в гель [59]. Большой интерес КМХ представляет для медицины, парфюмерии и косметики. Так как это производное хитина разлагается в организме животных [60], оно было предложено в качестве носителя лекарств для пролонгирования их действия [61]. КМХ в виде зерен, пленок и губок удобен для иммобилизации протеолитических и других ферментов [62, 63]. Конъюгаты КМХ с митомицином С обладают противоопухолевой активностью [64], а с RGDS-пептидом ингибируют рост опухолевых метастаз [65]. Сульфатированный КМХ также ингибирует рост метастаз [66]. Это же смешанное производное обладает и антикоагуляционной активностью [67]. Композит КМХ с гидроксипатитом используют для приготовления зубных протезов [68]. КМХ, гидрофобизированный альдегидом лауриловой кислоты, используется в косметике [69].

Спирторастворимые производные хитина получают путем дополнительного алкилирования КМХ бромистым этилом [70] или бромистым алилом [71].

Этилкарбоксиметилхитозан предложен как антизапотеватель для автомобильных стекол [70].

Цианэтилирование хитина осуществляли реакцией присоединения акрилонитрила в щелочной среде. Максимальная степень замещения достигается при семикратном избытке акрилонитрила. Исследование строения цианэтилхитина методом ^{13}C -ЯМР показали расположение заместителя у С-6. Увеличение СЗ эфира приводит к увеличению растворимости в муравьиной кислоте, из растворов были получены волокна и пленки [72]. Сорбционные и диэлектрические свойства цианэтилированных хитина и хитозана были изучены в работе [73]. Было показано, что цианэтилированные продукты имеют высокую диэлектрическую постоянную и хорошо сорбируют ионы меди при pH 6.

Методика синтеза аминированных производных хитина была разработана Kurita [74]. Хитин в водном растворе едкого натра или в дисперсии едкого натра в органических растворителях обрабатывали диэтиламиноэтилхлоридом. В обоих случаях получены эфиры с СЗ > 1, но растворимы в воде, бензоле, спиртах, ДМАА и ДМСО только продукты, синтезированные в водной среде. Продукты, полученные в органических растворителях, растворимы в дихлоруксусной кислоте. Это свидетельствует о различном распределении заместителей вдоль полимерной цепи. Диэтиламиноэтилхитины с высокими СЗ использованы как адсорбенты и разделяющие материалы.

Дополнительная аминогруппа может быть введена в хитин восстановлением азидопроизводного, которое получают хлорированием хитина N-хлорсукцинамидом или хлористым тионилом в растворе хитина в ДМАА/LiCl с последующей реакцией с азидом натрия и восстановлением боргидридом натрия. Содержание аминогрупп в продукте составляет 0,5 [75].

Катионные производные хитина получены также реакцией хитина с глицидилметиламмонийхлоридом или с N-триалкилпропиленоксидом в присутствии щелочи в спиртовой или водной среде при 40-60 °С в течение 8 ч. Продукт водорастворим при СЗ = 0,48 [76].

Пропиловые эфиры хитина, содержащие одну или две гидроксигруппы в заместителе, синтезированы реакцией хитина с 1-хлорпропаном, пропиленоксидом и 3-хлор-1,2-пропандиолом. Изучение структуры производных методами Фурье ИК-спектроскопии и ^{13}C -ЯМР показали замещение у С-6 [77].

Элементсодержащие производные хитина. Кремнийсодержащие производные хитина получены при воздействии триметилсилилхлорида на хитин в органических растворителях. Производные имеют замещение у С-6. Из растворов получены пленки, которые разлагаются лизоцимом [78]. В присутствии гексаметиленсилазана в пиридине получены полностью замещенные триметилсилильные производные хитина [79]. Трифенилсилилхитин, растворимый в органических растворителях, получен реакцией с трифенилсилилхлоридом в диоксане, тетрагидрофуране, хлороформе или толуоле. Производное имеет СЗ = 1,5 с преимущественным замещением у С-6. Продукт устойчив к водному гидролизу, размягчается при 225-240 °С [80].

Бромсодержащие производные хитина получены в гомогенных условиях в растворе в LiBr-DMAA реакцией с N-бромсукцинамидом при 50-90 °С. Почти монозамещенный продукт имеет замещение у С-6 [81]. Бромирование может быть произведено с помощью трибромимидазола и трифенилфосфина в том же растворителе [82].

Региоспецифическое окисление хитина проводят гипохлоритом натрия в присутствии стабильного нитроксильного радикала и NaBr в водной среде при комнатной температуре в течение трех минут [83]. 6-оксихитин использован для

приготовления микросфер с хитозаном для доставки лекарств. Проведены предклинические испытания 6-оксихитина в процессе регенерации костных тканей и для покрытий титановых протезов.

Синтез производных хитина в гомогенных условиях. Гомогенные реакции позволяют получать частично замещенные производные, которые выгодно отличаются от соответствующих гетерогенно синтезированных продуктов равномерностью распределения заместителей между макромолекулами и их звеньями. Это обусловлено одинаковой доступностью и равной вероятностью взаимодействия всех структурных элементов полимера с низкомолекулярными реагентами в растворе, где макромолекулы или их ассоциаты отделены друг от друга молекулами растворителя и где нивелируется влияние надмолекулярной организации полисахарида [84]. Реакции в растворах проходят с высокой скоростью в мягких условиях и дают высокий выход продукта.

Для хитина единственным растворителем, в котором практически отсутствует деструкция полимерной цепи, является ДМАА с хлоридом лития. Как правило, содержание LiCl в системе составляет 5%. Первое сообщение о гомогенном синтезе карбаматов и сложных эфиров хитина в этом растворителе появилось в 1980 г. [85]. Реакции с изоцианатами и хлорангидридами кислот дали соответствующие производные со $СЗ = 0,12-0,98$ и характеристической вязкостью $0,20-0,58$ дл/г.

В гомогенных условиях были получены ацетил-, бензоил-, 4-хлорбутирилхитины со $СЗ = 1-2$ по реакции с ангидридами или хлорангидридами соответствующих кислот; карбанилаты по реакции с фенилизоцианатом в присутствии пиридина со $СЗ = 1,7-1,9$ и сульфонаты по реакции с комплексом SO_3 -пиридин, растворимые в ДМСО, ДМФА и воде. [86]. Реакции с 1,6-гексадиизоцианатом, тозилхлоридом, N-фенилтиомочевинной, бутил- и бензилксантогенатами, бензоилхлоридом и ацетилхлоридом были проведены в мягких условиях в [87]. Все производные отличались хорошей растворимостью.

ПРОИЗВОДНЫЕ ХИТОЗАНА

О-производные хитозана. Принципы синтеза производных хитозана основаны на тех же реакциях, что и получение производных хитина. Однако реакционная способность хитозана и хитина в аналогичных реакциях различны из-за дополнительной функциональной группы в хитозане. Первичная аминогруппа придает хитозану не только существенно отличные от хитина свойства, но и обогащает химию этого полисахарида возможностью синтеза селективно замещенных производных. На хитозане могут быть получены как неизбирательно замещенные О, N-производные, так и направленно замещенные О- или N-производные. Свойства этих продуктов существенно различаются. Для получения О-производных необходима либо защита аминогрупп во время реакции, либо подбор реагентов и условий реакции, либо проведение реакции на хитине с последующим деацетилированием амидной группы. N-замещение часто не требует защиты гидроксильных групп и достигается при помощи реакций, характерных для первичных аминов.

Сложные эфиры хитозана. Синтез сульфопроизводных хитозана, впервые осуществленный в 1956 [88], до сих пор остается в центре внимания исследователей благодаря выявленным антикоагуляционным свойствам этого производного.

Сульфатирование хитозана смесью серного и сернистого ангидридов при температуре кипения смеси дало эфир с 14,4% S, обладающий антикоагуляционной активностью *in vivo* и *in vitro* [88]. В дальнейшем для сульфирования применяли хлорсульфоновую кислоту в среде пиридина [89], комплекс серный ангидрид-пиридин [90], серную кислоту, в которой процесс сульфирования сопровождался деполимеризацией [91].

Снижение скорости деструктивных процессов при сульфировании хитозана серной кислотой было достигнуто проведением процесса в среде изопропилового спирта [92]. Однако при этом получены продукты со СЗ - 0,7-0,9, преимущественно О-замещенные, имеющие низкую антикоагуляционную активность.

Были разработаны методы избирательного сульфирования хитозана путем использования различных реагентов и сред. При обработке хитозана комплексом серный ангидрид-пиридин в щелочной среде был получен N-сульфохитозан с полностью замещенными аминогруппами [93]. Последующая обработка продукта смесью сернистого и серного ангидрида при охлаждении привела к замещению 75% гидроксильных групп. Авторы наблюдали отсутствие антикоагуляционного эффекта у N-замещенного производного и высокую активность у N.О-производного хитозана.

Комплексы серный ангидрид-ДМФА и хлорсульфоновая кислота-ДМФА дают О-замещенные продукты. При СЗ = 1,5 антикоагуляционная активность их превышает активность сульфохитозана, полученного обработкой комплексом хлорсульфоновая кислота-пиридин, в котором присутствует частичное N-замещение [91]. Фракционный состав сульфатированного хитозана в зависимости от способа его получения был изучен в [94], было установлено, что при использовании полимера с ММ = 30000 активность продукта составляет 90% от активности гепарина.

Методом ультрафильтрации было показано, что в процессе сульфирования хитозана смесью хлорсульфоновая кислота-ДМФА молекулярная масса снижается в 12 раз [95].

В качестве сульфлирующего агента был использован также комплекс пиросульфат натрия-ДМСО в среде ДМСО [96]. Пиросульфит натрия был использован для сульфатирования хитозана в патенте [97].

Способ сульфирования полисахаридов, в том числе и хитозана, перэтерификацией солями серной или сернистой кислот был предложен в [98]. Реакцию вели в растворе полисахарида в смеси ДМФА-N₂O₄.

Установление зависимости антикоагуляционной активности сульфированных хитозанов от присутствия О- или N-замещения вызвало исследования по уточнению замещения гидроксильных групп (первичных у С-6 или вторичных у С-2).

Связь строения сульфатов хитозана со способом их получения была исследована в работе [99] методом ¹³С-ЯМР. Было установлено, что при гомогенных условиях синтеза продукт представляет собой смесь 6-О-сульфатов и 3,6-О-дисульфатов хитозана, при гетерогенных условиях продукт более однороден и отвечает формуле 3,6-О-дисульфата.

Селективно замещенный по С-6 сульфохитозан получен сульфированием комплексом пиридин-SO₃ при защите аминогрупп и гидроксильных групп при С-3 ионами меди [100].

В самом начале изучения антикоагуляционной активности сульфопроизводных хитозана было замечено усиление активности в присутствии карбоксильных групп у азота аминогруппы. Первым из смешанных производных был синтезирован N-формилсульфохитозан [101]. Позже сульфатированию стали подвергать N-карбоксиметилхитозан [102]. В работе Hirano [103] было изуче-

но восемь сульфопроизводных хитозана различного строения и было установлено, что введение карбоксильной группы в положение С-6 в N-сульфатированный хитозан дает продукт с 23% от активности гепарина, дополнительное O-сульфатирование повышает активность до 45%. O-сульфатированный N-карбоксиметилхитозан также обладает 45% активности гепарина. Параллельное исследование токсичности препаратов хитозана показало, что O, N-сульфатированный хитозан имеет низкую токсичность, сравнимую с токсичностью гепарина.

Было замечено также, что для повышения активности необходимо присутствие N-ацетильных групп. Нетоксичный гепариноид с активностью равной 90% активности гепарина имел строение б-O-карбоксиметил-N-сульфо-N-ацетил хитина [104].

Самая высокая антикоагуляционная активность была достигнута при совместном присутствии сульфогрупп при N- и O-положениях, карбоксиметильных групп при O-6 и N-ацетильных групп (степень дезацетилирования хитина 70%). Было также обнаружено ингибирующее действие этого производного на клетки меланомы [105].

Параллельно с созданием аналога гепарина совершенствовалась технология синтеза, выделения и очистки сульфата хитозана. Перевод сульфатированного продукта в Ba или Ca соль, описанный в [106], существенно упрощает процесс. Очищенный продукт по антикоагуляционной активности не отличался от Na соли сульфохитозана.

Для создания искусственных кровеносных сосудов с антитромбогенным эффектом проводилось сульфирование пленок хитозана комплексом SO_3 -пиридин. Изучение их *in vitro* показало возрастание времени свертывания крови на поверхности пленки с увеличением степени ее сульфирования. Пленки сохраняли механическую прочность [107].

Фосфорсодержащие производные хитозана. Введение фосфора в полисахариды производят с целью придания им огнестойкости. Для этого используют различные фосфорсодержащие реагенты. При реакции хитозана с гексахлорфосфазеном, октахлорфосфазеном или с линейными олигомерными хлорфосфазенами в среде тетрахлорэтана при 120-140 °C в течение 10 ч вводится 5-8% P. Данные ИКС показали, что реакция проходит по аминогруппам хитозана. Модифицированный хитозан самозатухает при поднесении пламени при содержании P > 2,5%, не загорается при содержании P > 7%. Производное трудно растворимо в муравьиной кислоте, набухает в уксусной кислоте, что подтверждает замещение по аминогруппам [108].

Водорастворимые фосфорсодержащие производные хитозана получены конденсацией хитозана с формальдегидом и фосфористой кислотой [109]. Авторы исследовали кинетику реакции и влияние условий реакции на молекулярную массу продукта, а также его способность к комплексообразованию.

Для придания огнестойкости хитозан обрабатывали фосфонитрилхлоридом в органическом растворителе (тетрахлорэтаноле или толуоле) в присутствии пиридина при температуре кипения смеси в течение 2 ч. Содержание фосфора в продукте составляло 0,54% [НО].

Для фосфорилирования хитозана было предварительно получены его органически растворимые производные - бензилхитозан, которое обрабатывали диэтиламидом 1,3-бутиленфосфористой кислоты. Фосфорсодержащая группировка присоединялась по аминогруппе. Для направленного фосфорилирования хитозана по вторичным гидроксильным группам синтезировали O-третил-N-салицилиденхитозан, в котором первичные гидроксильные группы были защищены третильными

ми, а аминогруппы - салицилиденовыми группировками. Глубина фосфорилирования достигала 0,9 [111].

Реакция конденсации аминогруппы хитозана с гидроксиметилфосфином (реакция Минниха) дает новый тип хиральных иммобилизованных фосфинов. Реакция протекает легко при комнатной температуре в суспензии хитозана в метаноле при избытке дифенилгидроксиметилфосфина. Продукт содержит 5,1% P [112].

Фосфоновые группы введены в хитозан с помощью конденсации по аминогруппе с хлорметиленфосфином. Получены N-монофосфин- и N,N-дифосфин-хитозан в соотношении 64/36. Производное хорошо растворяется в воде в широкой области pH и обладает хелатирующей способностью по отношению к ионам Ca^{2+} [113].

Нитраты хитозана. Нитрацию хитозана проводили в суспензии в ледяной уксусной кислоте абсолютной азотной кислотой в присутствии перхлорной кислоты. Продукт представлял собой нитрохитозан в виде азотнокислой соли со $\text{CZ} = 1,7$. При переводе в соль перхлорной кислоты продукт разлагался со взрывом уже при комнатной температуре, что авторы объяснили присутствием в полимере карбонильных групп, возникающих при щелочной обработке хитина [114].

Ацильные производные хитозана. Неизбирательное ацилирование хитозана проводят с помощью ангидридов кислот в растворе хитозана в мягких условиях. Так были получены производные кислот с длиной цепи C_{2-6} . Для высших кислот C_{10-18} требуется кратковременный нагрев на водяной бане и присутствие пиридина [115]. Производные интересны своим влиянием на избирательную агрегацию некоторых опухолевых клеток. При омылении О-ацильных групп спиртовым раствором щелочи в течение 16 ч при 20 °C получены соответствующие N-производные хитозана.

Полностью N,O-ацилированные хитозаны были получены при действии хлорангидридов кислот в пиридине. Было приготовлено 28 различных производных с общей степенью ацилирования около 2,0 [116].

Изучение скорости О-ацилирования N-ацилированных хитозанов показало ее зависимость от длины N-ацильных групп: чем больше длина первого заместителя, тем выше скорость О-ацилирования [117]. Для облегчения полного ацетилирования хитозана было предложено проводить сначала ацетилирование гидроксильных, а затем аминогрупп. Этим снимаются стерические затруднения, и конечный продукт имеет структуру ди-О-ацетил-N-ацетилхитозана (т.е. диацетата хитина). Продукты образуют высоковязкие растворы в органических растворителях [118].

Полностью ацилированный хитозан, растворимый в хлороформе, был получен обработкой хитозана хлорангидридами высших карбоновых кислот: додеcanoиловой, гексаноиловой и тетрадеcanoиловой. При испарении растворителя из растворов, нанесенных на подложки, образуются тонкие резиноподобные пленки [119]. Изучение влияния степени дезацетилирования хитозана на глубину ацилирования в этой реакции показало, что полное О- и N-ацилирование может быть достигнуто только при низком содержании N-ацетильных групп в хитозане и предварительном набухании его в сухом пиридине [120].

Региоселективные N- и О-пальмитоилхитозаны обладают амфифильными свойствами. Степень замещения производных зависит от температуры реакции с хлорангидридом пальмитиновой кислоты [121].

Исследование химической структуры гексаноил-, деканоил-, лауроил-хитозанов, полученных реакцией с хлорангидридами соответствующих кислот в пиридине, методами ИКС, ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР и ГПХ показало $\text{CZ} = 4$, т.е. полное

Замещение гидроксильных групп и двух водородов у аминогруппы. Производные хорошо растворялись в хлороформе, бензоле, пиридине и тетрагидрофуране и давали прозрачные пленки из этих растворов. Динамический механический анализ обнаружил наличие двух температурных переходов, соответствующих температуре стеклования заместителей и плавлению структур, которые они образуют в пленке. По данным рентгеноструктурного анализа в пленках возникает слоистая структура, причем объем слоя увеличивается с длиной цепи заместителя. Это может представить интерес для получения сверхтонких пленок Ленгмюра-Блоджет для микроэлектроники [122].

О-ацетилирование хитозана было проведено в 5%-ном растворе хитозана в муравьиной кислоте действием уксусного ангидрида в присутствии хлорной кислоты. Процесс протекает в гомогенных условиях. Из конечного раствора мокрым способом сформованы волокна и пленки. Регенерацию хитозана проводили щелочной обработкой волокна. ЯМР и ИКС показали избирательное О-замещение [123].

Водорастворимый О-бутирилхитозан был получен действием масляного ангидрида в метансульфокислоте при 0 °С в течение 2 ч. Образовавшийся гель выдерживали 18 ч при -15 °С. ИК-спектры показали только О-замещение при $\nu_{\text{C-O}} = 1,7$ [124].

Неизбирательно замещенный стеароилхитозан получен реакцией хитозана с ангидридом стеариновой кислоты [125]. Из растворов производного в муравьиной кислоте получены пленки толщиной 18-22 мкм, которые были испытаны в качестве мембран.

Для получения О-стеароилхитозана аминогруппу защищают арилиденовыми группировками, предварительно получая основания Шиффа, которые подвергают реакции с хлорангидридом стеариновой кислоты. Защитную группу затем снимают обработкой соляной кислотой. Производное содержит 0,82-1,91 стеарильную группу в расчете на мономерное звено [126].

Водорастворимые неселективно замещенные ацилированные производные хитозана образуются при реакции с лактонами кислот. Реакцию с 8-глюконолактоном ведут в ДМСО или этиленгликоле в присутствии триэтиламина. В зависимости от способа добавления триэтиламина (сразу или дробно) получают О-, N- или только N-производное. Реакция хитозана с β -пропиолактоном идет в воде в мягких условиях, давая О-, N-водорастворимые соединения [12]. Kurita [128] при подобной реакции хитозана с β -бутиролактоном в среде ДМСО при нагревании получил селективно замещенный N-3-гидроксипропилоилхитозан.

Все приведенные выше ацилированные производные хитозана были получены в дисперсии хитозана в реакционной среде или в гомогенных условиях, что вызывает трудности как в процессе выделения и очистки, так и при регенерации растворителя. В связи с этим сравнительно недавно разработанный метод твердофазной модификации хитозана карбоновыми кислотами представляется экологически более приемлемым [129]. Реакцию с твердыми кислотами (стеариновой, щавелевой, малоновой и янтарной) проводили в двухшнековом экстрадере при 25-100 °С. Продолжительность процесса составляла 3-5 мин. Исследование структуры полученных производных показало, что присоединение одноосновных кислот происходит как с образованием ковалентной амидной связи между кислотой и аминогруппой хитозана, так и с образованием ионной связи. Присоединение дикарбоновых кислот также проходит по смешанному механизму с частичным образованием мостичных связей между макромолекулами хитозана. Производные лишь частично растворяются в уксусной кислоте как за счет изменения гидрофильно-гидрофобного баланса макромолекул хитозана,

так и за счет межмолекулярных сшивок. В аналогичных условиях была проведена реакция хитозана с ангидридами фталиевой, янтарной и малеиновой кислот. Реакционная способность ангидридов в указанных условиях убывает в ряду малеиновый > янтарный > фталевый. Во всех случаях идет образование как амидной, так и солевой связей. Полученные соединения предложено использовать в качестве носителей ферментов и других биоактивных веществ, а растворимую часть гидрофобизованного стеариновой кислотой хитозана - в качестве эмульгатора и стабилизатора пен и эмульсий [130].

Простые эфиры хитозана. Синтез простых эфиров хитозана, осуществляемый по реакции нуклеофильного замещения, проводится в щелочной среде с помощью алкилирующих реагентов различного типа. При отсутствии защиты амино- или гидроксильных групп, как правило, получают производные смешанного замещения. Так, при метилировании хитозана с помощью диметилсульфата была отмечена возможность образования как О-, так и О, N-метилхитозана с общей $СЗ = 0,55$ [131]. При сульфэтировании хитозана через р-хлорэтансульфонат натрия в среде разбавителя в присутствии щелочи также был получен водорастворимый О, N-замещенный продукт с общей $СЗ = 0,35$ [132]. При синтезе бензилхитозана через хлористый бензил место присоединения заместителя не определялось [133]. Особое внимание распределению заместителей по функциональным группам стало уделяться при синтезе производных специального назначения: аналогов гепарина и других природных соединений медицинского назначения.

Карбоксиалкилхитозаны. При синтезе карбоксиметилхитозана (КМХАН) обработкой щелочного хитозана монохлоруксусной кислотой отмечалось присоединение заместителей по С-6 [134]. Подробно свойства растворов КМХАН были рассмотрены в работе [135]. Позднее синтез КМХАН проводили в различных разбавителях с варьированием температурно-временного режима и соотношения реагентов [136, 137].

При исследовании строения и фракционного состава неизбирательно замещенного КМХАН было установлено, что синтезированные образцы являются преимущественно О-замещенными: при суммарной $СЗ = 0,6-1,1$; замещение по аминогруппам составляет 0,15-0,40 соответственно [138]. Кислотно-основные характеристики функциональных групп неизбирательно замещенного КМХАН в результате их взаимного влияния выше, чем в полиэлектролитах, имеющих только один тип ионогенных групп. В интервале рН 2-8 в растворах КМХАН происходит переход растворение-осаждение-растворение вследствие изменения степени ионизации карбоксильных и аминогрупп и образования внутренней соли в изoeлектрической области [139]. При сушке КМХАН, выделенного в виде внутренней соли, происходит уменьшение его растворимости вследствие образования мостичных связей амидного типа. Количество сшивок возрастает с увеличением температуры и времени сушки, а также с увеличением молекулярной массы и $СЗ$ КМХАН [140]. Изучение вязкости разбавленных растворов КМХАН в зависимости от рН и ионной силы позволило выяснить влияние степени замещения на жесткость макромолекулы, было показано, что с увеличением $СЗ$ гибкость макроцепи КМХАН увеличивается [141].

Простой метод синтеза КМХАН был предложен Rinaudo [142]. Хитин набухал в 30%-ном водном едком натре в течение 0,5-1 ч, затем добавляли 1,5-3 моля монохлорацетата натрия и столько же щелочи и выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч. В конце реакции хитин был почти полностью дезацетилирован и карбоксиметилирован $СЗ = 1$. ^{13}C -ЯМР изучение показало, что $СЗ$ по С-6 составляет 0,65, по С-2 - 0,42 и по N - 0,10, т.е. при указанном методе синтеза получен почти селективно О-замещенный КМХАН.

Применение неселективно замещенного КМХАН обусловлено его высокими хелатирующими, влагоудерживающим свойствами [143]. N, O-КМХАН является также потенциальным презервантом для пищевых продуктов [144].

Карбоксиэтилхитозан получен реакцией хитозана с 2-хлорпропионовой кислотой, СЗ может быть увеличено повторной обработкой [145]. В этой же работе приведен метод синтеза селективно N-замещенного карбоксиэтилхитозана путем реакции с 2-оксипропионовой кислотой с последующим восстановлением боргидридом натрия.

Сульфоалкилхитозаны. Более сильные кислотные сульфогруппы, присоединенные простой эфирной связью, содержатся в сульфозтилхитозане [132] и сульфопропилхитозане [146]. Сульфопропилхитозан был получен реакцией щелочного хитозана в среде органического растворителя с 1,3-пропансульфоном. При 45 °С за 48 ч образуется сульфопропилхитозан с СЗ = 0,98, хорошо растворимый в воде. Эти производные - полиамфолиты с высокой хелатирующей способностью, обладающие биологической активностью [147].

Селективно O-замещенные карбоксиметил- и сульфозтилхитозаны были получены с использованием оснований Шиффа для протекции аминогрупп в работе [148].

Гидроксипропилхитозаны. Гидроксиэтилхитозан был получен реакцией с этиленоксидом в присутствии щелочи [149] или реакцией с 2-хлорэтанолом в различных разбавителях также в щелочной среде [150]. Производные хорошо растворимы в воде, их вязкость и потенциометрическое поведение изучены в работах [151, 152].

Гидроксипропилхитозан получен реакцией пропиленоксида в присутствии щелочного или кислого катализатора. При СЗ > 0,5 продукт растворим в воде. Вид катализатора мало влияет на выход продукта, но определяет место и степень замещения: при переходе от щелочных условий к нейтральным или кислым наблюдается снижение доли O-алкилирования и увеличение доли N-алкилирования. При повышении температуры специфичность замещения снижается [153]. Растворы гидроксипропилхитозана образуют жидкокристаллические структуры, что было изучено методами поляризованной оптической микроскопии, малоугловым светорассеянием [154, 155]. Производное получило широкое применение для влагоадсорбентов [156], в том числе температурно зависимых [157], в качестве связующих в медицине [158], в косметике [159].

Другие простые эфиры хитозана. Диэтиламиноэтильные группы, усиливающие основные свойства хитозана, были введены с использованием оснований Шиффа. После реакции бензилиденхитозана с диэтиламиноэтилхлоридом защитные группы удалялись этанольным раствором соляной кислоты. Замещение происходило по C-6 [160].

Реакция цианэтилирования хитозана, протекающая по механизму присоединения акрилонитрила, была подробно изучена в [161]. Направленность присоединения заместителей зависела от температуры реакции: при 20 °С присоединение проходило исключительно по гидроксильным группам, при повышенных температурах в реакцию вступало до 30% аминогрупп и происходил частичный гидролиз цианэтильных групп до карбоксиэтильных. Цианэтилхитозан обладал высокой диэлектрической проницаемостью, что позволило его применить для электроизоляционных бумаг [162]. Хорошие адсорбционные свойства цианэтилхитозана по отношению к ионам Si^{2+} показаны в [163].

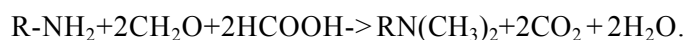
Непределенный эфир целлюлозы - аллилхитозан синтезирован по реакции нуклеофильного замещения с бромистым аллилом [164]. Исследованы кинетические закономерности реакции, показано, что она протекает по первому по-

рядку. Рассчитано $E_a^* = 34,18$ кДж/моль и выявлено влияние надмолекулярной организации на кинетику процесса: аморфизация надмолекулярной структуры хитозана переосаждением увеличивает начальную скорость реакции, но снижает максимальную СЗ. Мезоморфная организация структуры исходного хитозана способствует более равномерному течению реакции до высоких СЗ. До СЗ = 0,5 аллилхитозан полностью растворим в 2%-ной уксусной кислоте. Методом ^{13}C -ЯМР спектроскопии было определено, что замещение в первую очередь проходит по С-3, затем по С-6 и лишь при СЗ > 2 присоединение идет по аминогруппе. Радиационно-химические превращения аллилхитозана проходят с участием аллильных групп, что повышает его устойчивость к радиационной деструкции по сравнению с хитозаном. Цепь превращений приводит к образованию сшитых структур и появлению карбоксильных групп, которые повышают сорбционную емкость производных к ионам меди и урана [165].

Бензилхитозан синтезирован при суспендировании хитозана в жидком аммиаке при -33°C и добавлении охлажденного бромистого бензила. В этих условиях отсутствовала деструкция хитозана, при СЗ < 0,81 производное растворялось в разбавленной уксусной кислоте [166]. Степень замещения бензилхитозана определяли методом ИКС [167].

N-замещенные производные хитозана. *N*-алкилхитозаны. Впервые N-метилирование хитозана было проведено Каррером [168] путем трехкратной обработки йодистым метилом в запаянной ампуле при 100°C . Продукт отвечал формуле йодистоводородной соли N-метилхитозана. N-алкильные производные были получены обработкой гидроксиэтилхитозана йодистым метилом [169]. Из данных работы не ясно, какая степень алкилирования была достигнута.

Четвертичные N-производные хитозана впервые были получены по реакции Гофмана при действии йодистого метила или йодистого этила в среде абсолютного этанола в присутствии органических оснований [170]. В качестве акцепторов протонов использовали замещенные пиридины или триметиламин. Степень кватернизации хитозана была тем выше, чем выше сила применяемого основания. Получение полностью кватернизованного хитозана было подтверждено спектрами ЯМР. Синтезированные N-производные были более сильными основаниями, чем хитозан, их pK_a увеличивалось со степенью кватернизации. N-триметил- и N-триэтилхитозаны в форме хлоридов растворялись в воде, а в форме оснований - в гидроокиси триэтилбензиламмония. Оба N-производных стабилизируют террилитин в условиях тепловой денатурации. Эффект стабилизации тем выше, чем больше количество добавленного производного хитозана [171]. N-диметилхитозан был получен по реакции восстановительного алкилирования (Эшвейлера-Кларка) [172]

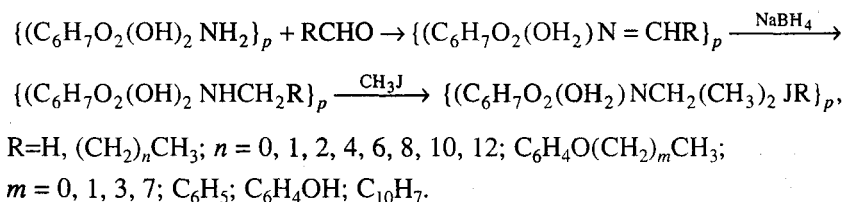


Было показано, что скорость реакции зависит от концентрации формальдегида, температуры и pH [173]. Эта реакция более подробно была изучена в работе Николаева [174]. Процесс вели гетерогенно в присутствии этанола. Степень N-алкилирования увеличивалась с повышением мольной доли муравьиной кислоты и при десятикратном избытке по отношению к хитозану составляла 1. Строение N-диметилхитозана (ДМХ) было доказано с помощью элементного анализа, анализа на первичную аминогруппу методом Ван-Слайка, ИК-спектроскопии и потенциометрического титрования. Производное растворялось в воде, что указывает на отсутствие сшивок за счет формальдегида. Обменная емкость ДМХ составляла 4,4 мг-экв/г.

Позже Муззарелли показал, что с помощью реакции Эшвейлера-Кларка с последующей обработкой йодистым метилом можно получить N-перметилированный хитозан. Полученное производное хорошо показано себя как антибиотик и ионообменник [175]. Синтезированные Муззарелли через образование альдиминов с последующим галогенированием N-метил-, N-этил-, N-пропил-, N-бутил- и N-гексил-хитозаны были использованы в качестве пленкообразующих материалов [176].

Кватернизация хитозана метилиодидом была проведена в среде N-метилпирролидона в присутствии едкого натра [177]. Авторы показали, что существенную роль в синтезе играет количество воды. Ее присутствие важно для гомогенизации реакции, но концентрация воды не должна превышать 14%. Степень кватернизации может быть увеличена введением в реакционную среду йодистого натрия. Производные растворялись в воде при степени кватернизации не выше 0,25 и имели пониженную вязкость по сравнению с исходным хитозаном вследствие деструктивного действия едкого натра. Изучение строения полученных производных с помощью ^{13}C и ^1H -ЯМР спектроскопии [178] ясно показало, что в присутствии щелочи кроме N-метилирования имеет место и метилирование гидроксильных групп хитозан при C-3 и C-6. N-триметилхитозан хлорид является хорошим диспергатором для каолиновых суспензий [179].

Четвертичные аммонийные соли хитозана были получены реакцией глицидилтриметиламмонийхлорида с хитозаном в нейтральной или щелочной среде. При восьмикратном избытке алкилирующего реагента по отношению к аминогруппам хитозана была получена степень замещения 0,96, т.е. все первичные аминогруппы хитозана вступили в реакцию. Продукт реакции имел формулу N-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмоний хитозан хлорида. Строение производного было подтверждено ИК, ^1H и ^{13}C -ЯМР спектроскопией [180]. Методом ДТА было установлено, что производное имеет более высокую температуру разложения, чем хитозан. ДСК-анализ показал, что производное не плавится и кристаллизуется перед разложением. Полученное производное показало высокую активность и было использовано для антимикробной обработки хлопковых тканей. Содержание четвертичного производного 0,1% в неионном связующем эффективно снижает рост бактерий и длительно сохраняет это качество в обработанной ткани [181]. Это четвертичное производное, полученное на высокодеацетилированном хитозане, было также предложено как гипохолестерический агент в патенте [182]. Восстановительное N-алкилирование хитозана с последующим -N-метилированием идет по схеме [183]



Четвертичные производные растворялись в воде и были использованы для сорбции анионных красителей.

Длина алкильного заместителя, присоединенного в N-положении существенно влияет на скорость ферментативного гидролиза и биоцидные свойства N-производного хитозана. Скорость гидролиза хитиназой уменьшается в ряду $\text{CH}_3 > \text{CH}_3\text{CH}_2 > \text{H} > \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2 > (\text{CH}_3)_2\text{CH} > \text{NH}_2\text{CH}_2 > \text{ClCH}_2$. Фермент не гидролизует N-метил-, N-бензидил-, N-бензоил-, N-никотинил- и N-ацил

жирной кислоты (C_{5-18}) хитозаны [184]. Биоцидность N-замещенных хитозанов увеличивается с ростом длины алкильного заместителя [185].

N-октадецилхитозан со степенью замещения 0,7, полученный взаимодействием хитозана с 1-Br-октадеканом, проявляет жидкокристаллические свойства. По данным ДСК термотропный переход имеем место при 46°C. Диспергирование производного в подкисленной воде с одновременным воздействием ультразвука приводит к образованию везикул с диаметром 10-150 нм. Рибофлавин, диффундировавший в везикулы, сохраняет стабильность в течение полугода [186].

Получение N-гидроксиалкилхитозанов приводят при диспергации хитозана в воде или в смесях вода/спирт, вода/эфир, вода/кетон, содержащих 25-75% органической фазы с последующей обработкой окисью алкила. Продукт выделяют высушиванием. При 90-140°C жидкостном модуле (4-12):1 был получен N-гидроксиалкилхитозан с модулем замещения 1,5-2 [187].

Четвертичные производные хитозана, дополнительно содержащие октальную группу, синтезируют обработкой переосажденного хитозана при 100° С в течение 6 ч октен-1-окисью и глицидилтриметиламмоний хлоридом. Производное имеет степень N-алкилирования 0,42 и степень О-замещения 0,31. Производное в виде аэрозоля использовано в косметике для волос [188].

N-гидроксibuтилхитозан был синтезирован обработкой хитозана окисью бутилена. Продукт имел $CZ=2$. Водорастворимые соли производного были использованы в косметике в качестве препаратов для кожи и волос [189].

N-2,3-дигидроксипропилхитозан получен реакцией 3-хлор-1,2-пропандиола с хитозаном в среде диоксана при 60-70° С в течение 5 ч в присутствии щелочи. Более длительная реакция (24 ч) приводила к алкилированию гидроксильных групп. Сшитое производное избирательно сорбирует германий из его смеси с теллуром и бором [190].

Синтез N-карбоксиметилхитозана (N-KMXAH) легко осуществляется в мягких условиях (водная среда и комнатная температура) по реакции образования оснований Шиффа присоединением глиоксалевой кислоты к аминогруппе хитозана с последующим восстановлением $NaBH_3CN$ при pH 5-6,3 [191]. Регулирование степени замещения производных достигалось изменением мольного соотношения реагентов. Условия синтеза исключали как деструкцию хитозана, так и изменение его степени дезацетилирования. Реакция протекала быстро и полностью. При pH 4,5-5,5 происходило растворение хитозана и образование геля в течение 3-4 ч. При pH > 7 гель не образуется. Для полностью замещенных производных pK^I и pK^{II} составляют 2,3 и 6,6 соответственно, изоэлектрическая точка 4,1 [192]. В работе [191] были изучены сорбционные характеристики N-KMXAH по отношению к переходным металлам. Было показано, что производное хорошо сорбирует Co, Ni, Cu, Cd, Pb и U из разбавленных растворов их солей, максимальное значение сорбционной емкости зависит от pH. При этом N-KMXAH может быть рассмотрен как полисахарид, содержащий глициновую $-NH-CH_2-COOH$ при C-2 и в связи с этим может представлять интерес для биохимии и фармацевтической химии. Реология N-KMXAH в виде золя и геля была изучена в [193].

N-карбоксиметилирование хитозана было также описано в работе Ринадо [194]. Синтез осуществляли через глиоксалевую кислоту и восстановление боргидридом натрия. Полученное производное полностью растворялось в воде.

N-KMXAH, синтезированный при эквимолекулярных количествах глиоксалевой кислоты и аминогрупп хитозана, имел по данным жидкостной хроматографии одинаковые CZ по N-монокрбоксиметил- и по N,N-дикроксиме-

тильным группам, равным 0,3. Разбавленные растворы N-КМХАН были использованы для подавления размножения водорослей [195].

N-карбоксивбутилхитозан (N-КБХАН) был получен по схеме, аналогичной синтезу N-КМХАН, т.е. растворением хитозана в водном растворе левуленовой кислоты $\text{CH}_3\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ при мольном соотношении хитозан:кислота 1:5 с последующим восстановлением боргидридом натрия. Конечный продукт представлял собой вязкий раствор с pH 6.

N-КБХАН выделяли лиофильной сушкой после диализа против воды в течение 3 дней. Степень N-замещения по карбоксивбутильным группам не превышала 0,28, что вызвано мягкими условиями реакции. ^{13}C -ЯМР спектроскопия показала наличие N-замещения. Производное было опробовано в косметических средствах и зубных пастах в качестве загустителя [196]. Хирургические салфетки из лиофилизированного N-КБХАН промотируют регенерацию тканей и препятствуют воспалительным процессам [197]. N-КБХАН особенно перспективен в пластической хирургии: при использовании его в виде геля под ним образуются менее жесткие и плотные ткани, и заживление протекает без рубцов.

N-гидроксиацелирование порошкообразного высоко набухшего хитозана с помощью β -бутиролактона было проведено в среде диметилсульфоксида [128]. Реакция при 50-120° С 100° С в течение 48 ч давала степень N-замещения 0,65-0,67. Полученное производное имело аморфную структуру и обладало высокой гигроскопичностью. При подобной реакции хитозана с β -бутиролактоном в среде ДМСО получен селективно замещенный N-3-гидроксивбутаноилхитозан со $\text{CZ} = 0,65$.

N-ацилхитозаны. Наиболее хорошо изученной реакцией N-ацелирования хитозана является реакция его N-ацелирования, т.е. реакция регенерации хитина. Первые опыты по ацелированию хитозана проводили в жестких условиях при нагревании с уксусным ангидридом в запаянной ампуле [198]. Продукт, напоминающий по свойствам хитин, был сильно разрушен.

Позднее N-ацелирование набухшего в воде хитозана осуществляли в мягких условиях с помощью смеси этанола, уксусной кислоты и дициклогексимида в течение 16 ч при комнатной температуре. Продукт содержал одну N-ацетильную группу на мономерное звено [199].

Мягкое N-ацелирование действием уксусного ангидрида в уксуснокислом растворе хитозана в присутствии метанола и пиридина осуществил Hirano [200]. Продукт был подвергнут деполимеризации с помощью NaNO_2 с целью выделения хитоолигосахаридов.

N-ацелирование пленок хитозана было достигнуто при действии уксусного ангидрида в водно-метанольных смесях [201].

В работе Kurita [202] проведено сравнительное исследование реакций ацелирования высоконабухшего хитозана хлорангидридом и ангидридом уксусной кислоты. Было показано, что обе реакции протекают в мягких условиях с воспроизводимыми результатами, однако, уксусный ангидрид более эффективен в протонных растворителях, в то время как хлорангидрид лучше действует в пиридине с небольшим количеством протонного растворителя. По данным ИКС обе реакции избирательно ацелируют аминогруппу с максимальным замещением 0,84 для хлорангидрида и 0,62 для ангидрида уксусной кислоты. Эти же авторы получили водорастворимый хитин при ацелировании хитозана уксусным ангидридом в смеси пиридин/метанол [203].

Частично N-ацелированные хитозаны гидролизуются лизоцимом со скоростью, контролируемой степенью ацелирования, что дало основание для ис-

пользования их в качестве биodeградируемого материала в медицине и биотехнологии [204].

Сравнение стабильности водных растворов N-ацетилированных хитозанов, полученных частичным дезацетилированием хитина и частичным гомогенным N-ацетилированием хитозана при различных pH показало, что в первом случае образуется беспорядочно замещенный полимер, в то время как во втором случае образуется блоксополимер. Растворы беспорядочно замещенного хитозана гомогенны в нейтральной и щелочной области pH [205].

Для придания водорастворимости N-ацилированным производным хитозана важно именно беспорядочное распределение заместителей, для чего реакцию ведут либо в растворе хитозана, либо в высоконабухшем состоянии, при этом степень ацилирования может быть невысокой [206-208].

N-пропионилхитозан был синтезирован действием пропионового ангидрида на раствор хитозана в 5% уксусной кислоте. Из производного были получены тонкие прочные мембраны с высокой химической стойкостью [209].

N-фталоилхитозан легко получается реакцией хитозана с фталевым ангидридом [210]. Это соединение растворимо в органических растворителях и очень удобно в качестве прекурсора для синтеза производных хитина сложного строения в том числе разветвленных полисахаридов [211].

Частично N-сукцинированный хитозан приготовлен реакцией с янтарным ангидридом в уксуснокислом растворе хитозана в присутствии метанола. При соотношении ангидрид:аминогруппа, равном 14,6, образуется селективно N-замещенный продукт со $СЗ = 0,79$, растворимый в воде и разбавленных кислотах. Обработка продукта карбодиимидом приводит к образованию геля, пригодного для биохимических исследований [212].

Реакция хитозана с избытком ангидридов дикарбоновых кислот приводит к образованию соответствующих N-карбоксиацилхитозанов с выходом 56-76%. Продукт может быть выделен в виде сложного эфира, свободной кислоты или Na соли. Реакция проходит при комнатной температуре в уксуснокислом растворе хитозана, разбавленном метанолом в течение 16 ч. В конце реакции образуется вязкий раствор или гель. $СЗ$ по ацильным группам составляет 0,45-0,8. Таким образом были получены производные малеиновой, итаконовой, ацетилтиоянтарной, глутаровой, циклогексан-1,2-дикарбоновой, фталевой и других кислот [213].

Если реакцию вести при эквимолекулярном или меньшем соотношении ангидрид дикарбоновой кислоты/аминогруппа при pH 4-5,5, то в результате реакции получают полиамфолиты, содержащие карбоксильные и свободные аминогруппы [214].

Кинетика реакции хитозана с ангидридами малеиновой, фталевой, глутаровой и янтарной кислот в среде ДМСО была изучена в [215]. Реакция с аминогруппами хитозана протекает количественно с высокой скоростью по порядку I. Реакционная способность ангидридов снижается в ряду малеиновый \rightarrow фталевый \rightarrow янтарный \rightarrow глутаровый. Гидроксильные группы ацилируются незначительно.

Новый тип амфотерного производного хитозана N- β -гидрокси-2',3'-дикарбокси)этилхитозана был синтезирован реакцией высоконабухшего в молочной кислоте хитозана с цис-эпоксисукциновой кислотой. Реакция протекает в щелочной среде при 85° C в течение 24 ч с постепенным растворением продукта. 1H и ^{13}C -ЯМР анализ и Фурье ИК-спектроскопия показали, что продукт представляет собой беспорядочно замещенный терполимер с тремя типами звеньев: N-(3'-гидрокси-2',3'-дикарбокси) этил- β , D-глюкозамин, β , D-глюкоза-

мин, и N-ацетил-β-D-глюкозамин. Реакция абсолютно селективна: О-замещение полностью отсутствует. Степень замещения производного регулируется мольным соотношением цис-эпоксисукциновой кислоты и хитозана. При соотношении 1,5:1 замещается 50% аминогрупп с частичным сшиванием продукта, что вызывает повышение вязкости щелочных растворов. Производное растворяется в широкой области pH, особенно легко в щелочной среде. Растворимость в воде зависит от степени замещения и молекулярной массы продукта. Высокозамещенные низкомолекулярные производные быстро растворяются в воде. При pH < 5 продукт осаждается [216].

Пересаженный хитозан, диспергированный в инертных растворителях легко N-ацилируется безводными кислотами уксусной, монохлоруксусной, смесью акриловой и метакриловой кислот. Особый интерес представляет монозамещенный N-монохлорацетат хитозана, содержащий 15,4% C1 [217].

Основания Шиффа. Реакция конденсации аминогруппы первичных аминов с альдегидной группой ароматических аминов с образованием оснований Шиффа впервые была осуществлена на хитозане в работе [148] с целью защиты аминогрупп в реакциях алкилирования. Из ряда ароматических альдегидов: бензойный, салициловый, анисовый, о-нитробензойный наиболее реакционноспособным оказался салициловый, количественно связавшийся с аминогруппами хитозана. Все синтезированные основания Шиффа не плавилась, разлагаясь при $T > 220^{\circ}\text{C}$, не растворялись в органических растворителях. Салицилиденхитозан разлагался в кислой среде на исходные компоненты - хитозан и салициловый альдегид, но был устойчив в щелочной среде в безводных условиях.

Позднее основание Шиффа хитозана и глиоксалевого кислоты было использовано в качестве промежуточного соединения при синтезе N-карбоксиметилхитозана, который получали восстановлением иминной связи боргидридом натрия [191].

Хелатирующие полиамфолиты на основе хитозана были получены через образование иминов с фталоальдегидной кислотой с последующим восстановлением цианборгидридом натрия. Полученный таким образом N-(карбоксибензил)хитозан имел $\text{CZ} = 0,43$ по N-карбоксибензильным группам, растворялся в кислой и щелочной среде и хорошо сорбировал металлы переменной валентности [218].

Основания Шиффа хитозана и алифатических линейных альдегидов (от ацетальдегида до деканала) и разветвленных альдегидов (изомасляный, изовалериановый, триметилуксусный), а также о-, п-, м- толуиловых альдегидов и п-диметиламинобензальдегида были получены в среде метанола при выдерживании с избытком соответствующего альдегида в течение суток при комнатной температуре [219]. Полученные соединения были использованы для направленного О-ацетилирования хитозана уксусным ангидридом в среде пиридина.

Реакция с о-, м- и п-фталевыми альдегидами в водно-метанольной среде дает моно- и бис-основания Шиффа в случае м- и п-альдегидов и циклический продукт с о-фталевым альдегидом. Восстановление цианборгидридом натрия приводит к соответствующему N-бензильному производному [220]. Полученные таким образом производные обладают хорошими хелатирующими способностями [221].

Основания Шиффа были использованы при синтезе органорастворимых производных хитозана. Синтез проводили конденсацией частично гидролизованного хитозана с 10-20-кратным избытком альдегида алифатического ряда или замещенных фенильных альдегидов в водно-спиртовой среде при pH 5,5 с последующим ацетилированием [222]. Полученные соединения использованы для получения волокон, пленок, связывания ионов металлов и в косметике.

Синтез N-нитрофенилхитозана был осуществлен реакцией гидрохлорида хитозана с п-нитробензальдегидом в среде ДМСО при 50° С в течение 12 ч. Реакция протекала количественно. Динитрофенильные производные были получены в аналогичных условиях реакцией с фтординитробензальдегидом. Производные растворялись в ДМСО и ДМФА. Растворы и пленки, отлитые из этих производных, обладают электрохромными свойствами, изменяя свой цвет при электровосстановлении или электроокислении [223].

По реакции образования оснований Шиффа протекает взаимодействие хитозана с 5-формил-2-фурансульфоновой кислотой. После гидрогенизации образуется N-сульфофурфурилхитозан со $CZ = 0,26$. Соединение селективно удаляет из растворов ионы $Cu(II)$, $Pb(II)$ и $Ni(II)$ [224]. Аналогичная реакция с 2-формилбензолсульфонатом натрия и 4-формилбензолсульфонатом натрия в присутствии цианборгидрида приводит к образованию соответствующих N-бензил-производных с общей $CZ = 0,83$ [225].

Метоксифенильные альдегиды (ванилин, о-ванилин и др.) реагируют с хитозаном при нормальных и восстановительных условиях и придают хитозану нерастворимость и повышенную прочность изделиям, сформованным из их смеси с крафт-лигнином [226].

С помощью оснований Шиффа удалось получить органорастворимые производные хитозана [227]. Бензилиденовые или салицилиденовые группировки, введенные по аминок группам, существенно улучшают доступность гидроксильных групп и делают возможным осуществить полное ацилирование. Таким путем были синтезированы ди-О-ацетил-N-ацилхитозан, ди-О-пропионил-N-дигексаноилхитозан, ди-О-арилкарбамат-N-ацетилхитозан, растворимые или набухающие в ТГФ, хлороформе, диоксане, ДМФА и ДМАА.

Другие производные хитозана. Низкая токсичность хитозана, совместимость с тканями живых организмов и биodeградируемость делает его перспективным в качестве носителя ферментов и различных лекарственных средств с целью пролонгирования их действия и контролируемого релиза. Работы этого направления могут быть предметом отдельного обзора. Приведем здесь лишь некоторые способы иммобилизации биоактивных веществ на хитозане.

Нуклеозид 5-фторурацил (5-FU) обладает заметной противоопухолевой активностью, присоединение его к хитозану, который селективно проникает в опухолевые клетки и ингибирует их рост, могло бы дать эффективный противоопухолевый препарат без побочных эффектов и пролонгированной активностью. Присоединение 5-FU осуществлялось через простую и сложную эфирные связи, через амидную связь, через мочевины и гексаметиленмочевину. Был использован как немодифицированный хитозан [228], так и в виде производных гликоль-, О-бензоил-, О-миристоил-, О-капролоил-, 4-метоксифенилхитозана и сополимера полиэтиленгликоль-хитозан [229]. Изучалось влияние дизайна и типа связи полученных конъюгатов на противоопухолевую активность. Наиболее сильный ингибирующий эффект показали конъюгаты хитозан-5-FU и хитоолигосахариды-5-FU.

Ковалентная иммобилизация различных ферментов на хитозан осуществляется с помощью эпихлоргидрина, глутарового альдегида или водорастворимого карбодиимида. Иммобилизованные ферменты используются в промышленном биокатализе [230].

Привитые сополимеры на основе хитина и хитозана. Привитая полимеризация винильных мономеров на полисахариды позволяет получить гибридные сополимеры, сочетающие свойства природного и синтетического полимера, например, биосовместимость и термопластичность. Этот вид сополимеров приме-

няют в основном как биоматериалы. В случае использования в качестве мономера производных моносахаридов, способных к полимеризации, получают разветвленные полисахариды сложного строения, в которых боковые цепи могут представлять полимеры галактозы или другого моносахарида. Боковые моно- или олигосахаридные цепи могут быть присоединены к макромолекулам хитина и хитозана и с помощью других реакций, требующих синтеза промежуточных соединений. Такие синтезы позволяют получить аналоги редких природных мукополисахаридов, обладающих особо ценными биологическими свойствами.

Гибридные сополимеры на основе хитина. Привитую полимеризацию на хитин или его производные проводят в различных средах с использованием разнообразных инициаторов в гетерогенных или гомогенных условиях. Хитин может быть в виде порошка, раствора или пленки. Выбор характера процесса определяется желаемыми свойствами продукта.

В первых работах по прививке в качестве мономера был использован метилметакрилат, закономерности полимеризации которого хорошо изучены. Kojima с сотр. изучал прививку MMA в бензоле, диметилформамиде и воде при иницировании трибутилбораном. В начальной стадии реакции эффективность прививки составляет 98%, но количество привитых цепей мало. Эффективность уменьшается с повышением температуры. Энергия активации составляет 22,8 и 27,4 ккал/моль для прививки и гомополимеризации соответственно. Конверсия мономера, степень и эффективность прививки MMA линейно возрастают с увеличением количества хитина в реакции [231].

Yang Jingxian [232] прививал MMA на пленки хитина в водно-метанольной среде при комнатной температуре при иницировании солями церия. Максимальный выход сополимера был получен при концентрациях 0,5 и $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л мономера и хитина соответственно. Строение сополимера изучено методами ИКС и электронной микроскопии. Оптимальные условия прививки MMA на хитин при иницировании солями церия были найдены в работе [233], авторы которой показали, что лучшей средой для реакции является вода.

Фотоиницированная прививка MMA на хитин и оксихитин была изучена Takahashi [234] в зависимости от условий фотооблучения, степени окисления хитина и концентрации мономера и хитина. Получены сополимеры со степенью прививки до 150% при эффективности процесса близкой к 50%. Количество привитых цепей 0,4 ммоль/100 г хитина при молекулярной массе $(3-5) \cdot 10^5$ [234].

Сравнение реакционной способности инициаторов пероксодисульфата аммония и ферроаммонийсульфата при прививке MMA было проведено в работе [235]. Наибольшая степень прививки была получена при сочетании обоих инициаторов.

Структура привитых сополимеров хитина и ПММА была исследована в работе [236] методом рентгенооскопии. Было показано, что на β -хитине при степени прививки 260% происходит аморфизация структуры хитина, в то время как на α -хитине даже при степени прививки 620% сохраняется кристалличность хитина.

Образование монослоя привитых цепей ПММА на поверхности хитина было зафиксировано при измерении изотермы поверхностное давление - площадь поверхности [237]. Было показано, что монослой ПММА имеет плотную упаковку и ориентацию. Лизоцим деградирует сополимер.

Toshiharu прививал MMA на карбоксиметилхитин [238]. Было установлено, что степень прививки растет с увеличением концентрации инициатора - пероксодисульфата калия. Сорбционная способность сополимера убывает в ряду: $\text{Si}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{CO}^{2+}$ и $\text{Fe}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ag}^+$.

Kurita [239], используя для прививки ММ А меркаптохитин, получил сополимеры с высокой степенью прививки [239].

Акрилонитрил был привит на хитиновые пленки в водной среде при 25° С с перй аммонийнитратом в качестве инициатора. Пленки с привитым полиакрилонитрилом были прозрачны и прочны [240].

Радиационное иницирование было использовано для прививки на порошок и пленки хитина и хитозана стирола, винилацетата, акриламида и ММА. Облучение проводили γ -лучами ^{60}Co в растворе мономера при - 196° С в вакууме с последующей прививкой при 30° С. Прививка стирола происходит только в 50%-ном растворе мономера в воде или метаноле. Степень прививки линейно растет с увеличением дозы облучения и продолжительности полимеризации. Прививка стирола на порошки хитина и хитозана снижает их набухаемость в воде, а сополимер стирола с хитозаном теряет растворимость в кислотах. Винилацетат не прививается в указанных условиях, в то время как ММА образует сополимеры со степенью прививки >900% при эффективности 84% [241].

Стирол был использован для прививки на хитоолигосахариды, полученные гидролизом хитина. Концевые группы олигосахаридов были превращены в лактоны и обработаны 4-винилбензиламмонием. Образовавшийся макромономерный амид подвергали радикальной полимеризации, в результате которой получены оптически активные полимеры с молекулярной массой $2,4 \cdot 10^5$. Соплимеры перспективны для использования в биомедицинских материалах [242]. Строение сополимеров было изучено методом ^{13}C -ЯМР.

Для синтеза привитых сополимеров хитина с определенной структурой и свойствами необходимо получить промежуточные производные с группами, по которым возможна прививка. Предварительно синтезированные тозил- и иодхитины, растворимые в органических растворителях, удобны для прививки винильных мономеров и полимеризации с раскрытием эпосикольца. Тозилхитин в апротонном растворителе образует привитой сополимер с 2-метил-2-оксазолином со степенью прививки 200%, причем привитые цепи локализованы по местам, ранее занятым тозилными группами [243]. Повышенная совместимость этого сополимера с поливинилхлоридом была охарактеризована методом температурно-программированного аналитического пиролиза [244]. Меркаптохитин, содержащий лабильные меркаптогруппы, образует со стиролом и ММА привитые сополимеры со степенью прививки 1300%. Полученные сополимеры набухают и частично растворяются в органических растворителях, имеют $T_g = 115^\circ \text{C}$ независимо от степени прививки. Привитые полистирольные цепи имеют $M_w = 2,55 \cdot 10^5$ при полидисперсности 2,62 [245]. Стирол был также привит на иодхитин с помощью как радикальной, так и катионной полимеризации [246]. Введение иода в положение С-6 осуществлялось через тозилхитин, при этом производное приобрело растворимость в органических растворителях, что позволило вести прививку в гомогенных условиях. Было установлено, что катионный механизм с иницированием кислотами Льюиса SnCl_4 или TiCl_4 в нитрометане дает степень прививки до 600%, в то время как радикальный процесс при фотоиницировании только 60%. Молекулярная масса привитых цепей составляла $(3,2-5,8) \cdot 10^4$ при отношении $M_w/M_n = 1,5-2$. Полученные сополимеры растворимы в органических растворителях, биодegradуемы и биосовместимы.

Интересные работы по прививке на частично дезацетилированный хитин полипептидных цепей γ -метил-L-глутамата [247] и N-карбоксиангидридов аминокислот (D, L-аланина, α -бензил-L-глутамата) [248] были предприняты рядом японских ученых. Прививка проходила с высокой эффективностью. Последую-

щая обработка сополимеров щелочью превращает эфирные группы в карбоксильные. Сополимеры хорошо набухают в воде.

Частично дезацетилованный хитин был использован для прививки ϵ -капролактона. Прививка проходила в водной среде при 100° С в течение 20 ч с катализатором 2-этилгексаноатом олова. Количество привитых цепей возрастает с уменьшением воды в реакции [249].

Сополимеры олигомеров хитина с полипропиленгликолем имеют блочный характер, так как они получены гидролизом гексаноилхитина до олигомеров и последующей сополимеризацией с полипропиленгликолем с помощью реагента сочетания - 4,4-метилен(дифенилдиизоцианата). Гексаноильные группы затем снимаются метилатом натрия в среде ДМСО. Сополимер гидролизуются хитиназой. Изучены термические свойства сополимера [250].

Полиоксиэтиленовый эфир хитина полученный реакцией алкалехитина с галоидзамещенным полиоксиэтиленом может быть отнесен к гибридным полимерам, так как степень полимеризации боковых цепей составляла 2-4. Соединение отличается высокой гигроскопичностью [251].

Прививка 4-винилпиридина, малеиновой кислоты и малеинового ангидрида на хитин и хитозан проводилась в гетерогенных условиях при иницировании пероксидом бензоила [252], при этом прививаются длинные цепи поли-4-винилпиридина и полималеинового ангидрида. Малеиновая кислота прививается в небольшом количестве в гомогенных условиях. Сополимеры обладают биосовместимостью и высокой хелатирующей способностью.

Сополимер хитина с поли (2-алкил-2-оксазолиновыми) боковыми цепями получен при обрыве живой, полимеризацией оксазолиновых производных частично дезацетилованным хитином (ДМСО, 27° С). Сополимеры растворимы в воде, ДМФА, ДМСО при метильном производном оксазолина и только в воде при этильном производном [253]. Аналогичные сополимеры с хитозаном получены реакцией хитозана с растущими цепями поли(2-метил-2-оксазолина) в присутствии фталевого ангидрида. Эти сополимеры совместимы с поливинилхлоридом и поливиниловым спиртом [244, 254]. Ферментативное разложение гибридных пленок ускоряется при введении сополимеров [255].

Гибридные сополимеры на основе хитозана. Полимеризация метакриловой кислоты в присутствии хитозана протекает по матричному механизму. В уксуснокислом растворе хитозана при иницировании пероксодисульфатом калия образуется оптически активная изотактическая стереорегулярная полиметакриловая кислота. Полимеризация протекает через образование комплекса хитозан-кислота с последующим молниеносным образованием гомополимера кислоты [256].

Сополимеризация сорбиновой и метакриловой кислот в присутствии хитозана при иницировании пероксодисульфатом калия приводит к образованию оптически активного сополимера в результате асимметрического влияния хитозана [257]. Авторы не указывают на возможность образования привитого сополимера.

Собственно графт-полимеризация хитозана и акриловой кислоты при иницировании церий аммоний нитратом была изучена в [258]. Было показано, что степень прививки и молекулярная масса привитых цепей увеличивается с увеличением концентрации акриловой кислоты. В начальной стадии прививки $E_{\text{акт}} = 2,24$ ккал/моль.

В патенте [259] хитозан растворяют в мономере (метакриловой кислоте), а графт-полимеризацию проводят в воде при иницировании пероксодисульфатом калия при 70-80° С. Сополимер выделяют в виде гранул или пленок.

О получении графт-ххшполимеров хитозана с акриловой и метакриловой кислотами с солями Ce(IV) в качестве инициатора сообщено в [260]. Исследовано влияние концентрации мономера и инициатора на степень, эффективность прививки и конверсию мономера. Морфология сополимера изучена с помощью оптической и электронной спектроскопии. В микросферы сополимера внедрен сульфадiazин и изучен его релиз *in vitro*.

Сополимеры хитозана и акриловой кислоты, полученные термополимеризацией в присутствии пероксида бензоила рекомендованы для применения при пломбировании зубов [261].

Прививка ММА на хитозан осуществлялась различными способами иницирования [262]. При фотоиницировании наблюдался индукционный период и полимеризация проходила главным образом за счет фотолиза аминогрупп. При сравнении радикальных инициаторов было выяснено, что процесс легче протекает с азоизобутиронитрилом (АИБН) и с пероксодисульфатом аммония, чем с пероксидом бензоила и с пероксидом водорода. Сочетание пероксодисульфата калия с солями других металлов дает как ингибирующий (SnCl_2), так и промоторный эффект (MgCl_2 , тартрат и оксалат аммония) [263]. При использовании редокс системы $\text{Cu}^{2+}/\text{Na}_2\text{SO}_3$ конверсия мономера увеличивалась с увеличением концентрации восстановителя [264]. Другая редокс-система - реагент Фентона - обеспечивает высокие степени прививки [265]. Изучение прививки ММА на хитозан с различными степенями дезацетилирования и на N-замещенные хитозаны выявило участие аминогрупп в процессе иницирования [266]. Прививка на оксихитозан, полученный окислением диоксидом азота, регулируется количеством образовавшихся при окислении карбоксильных групп и концентрацией инициатора [267].

Прививка других мономеров при фотоиницировании была изучена в зависимости от длины волны, растворителя и вида инициатора АИБН или H_2O_2 [268]. Скорость прививки убывает в ряду ММА > метилакрилат > этилакрилат > стирол > акриловая кислота. Выход сополимера зависит от полярности растворителя, в котором проводится прививка, сродства мономера к воде, вида радикалов, возникающих при фотолизе и переноса цепи на растворитель.

Новая иницирующая система была предложена для прививки метилакрилата на трихлорацетилованный хитозан. В качестве соинициатора был взят карбонил марганца $\text{Mn}_2(\text{CO})_{10}$. Прививку проводили в гетерогенных условиях в массе мономера при фотооблучении. Прививка идет по месту радикала, образовавшегося в результате специфической реакции карбонила марганца с трихлорацетильным заместителем на хитозане [269].

2-гидроксиэтилметакрилат был привит на хитозан в уксуснокислом растворе с церий аммоний нитратом в качестве инициатора [270] и при радиационном облучении [271]. Изучалась кинетика прививки в зависимости от концентрации мономера, инициатора, температуры и времени прививки [270] и от дозы облучения [271]. Сополимеры давали пленки, хорошо совместимые с кровью.

Эмульсионная привитая полимеризация бутилакрилата с иницирующей редокс системой $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{NaHSO}_3$ и эмульгатором Na-додецилсульфатом дает сополимеры, образующие пленки с повышенными эластическими свойствами [272]. Увеличение пластичности пленок из сополимера хитозана и метилакрилата наблюдалось также в [273], прививку проводили в эмульсии при иницировании $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$.

Сополимер **диметиламиноэтилметакрилата** с хитозаном (церий аммоний нитрат в качестве инициатора) обладает лучшими флокулирующими свойствами, чем хитозан при осветлении коалиновых суспензий [274].

Из привитых сополимеров хитозана и 4-винилпиридина (церий аммоний нитрат, вода, 30° С, 2 ч, глутаровый альдегид) получены сшитые мембраны с рН-зависимой степенью набухания [275].

Инициирование солями Ce(IV) применяется для прививки различных мономеров на хитозан. Общие закономерности и механизм прививки с этим инициатором были изучены на модельных соединениях - циклическом и линейном аминокспиртах [276].

Акриламид был привит на хитозан как с церий аммоний нитратом [277], так и радиационным способом [278]. Графт сополимеры имеют высокую степень набухания в воде и были использованы для иммобилизации протеазы.

Сополимер акрилонитрила и хитозана получен при инициировании редокс системой $K_2S_2O_8/Na_2S_2O_3$ или Ce^{4+} [279]. Сшитый эпихлоргидрином сополимер был амидооксимирован реакцией между гидроксиламином и нитрильными группами сополимера и использован для сорбции ионов металлов при различных рН. Найденны константы стабильности комплексов сополимера с ионами Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} [280].

В результате привитой полимеризации винилацетата на хитозана в уксуснокислом растворе при инициировании пероксодисульфатом аммония были получены самостабилизированные эмульсии. Была изучена кинетика процесса и установлено, что скорость реакции не зависит от концентрации хитозана, слабо зависит от концентрации инициатора и пропорциональна концентрации винилацетата. Исследование термомеханических свойств сополимеров с различной степенью прививки показало, что увеличение времени прививки приводит к образованию частично сшитых структур. Щелочная обработка привитого поливинилацетата переводит сополимер в раствор или в гель (в случае сшитого сополимера) вследствие гидролиза ацетатных групп. Изучена кинетика гидролиза. Конечный продукт является сополимером хитозана с поливиниловым спиртом [281].

Графтсополимер стирола и хитозана был получен через тритиловый эфир хитозана. Сополимер использован как новый амфифильный материал [282].

Макромномер для получения сополимеров хитозана был использован при графт полимеризации монометакрилата полиэтиленгликоля на хитозан. Сополимеры при степени прививки 90-350% растворялись в воде с образованием вязких растворов, из которых были отлиты пленки с улучшенными механическими характеристиками. Пленки были проницаемы для витамина B_{12} [283].

Метод получения гибридных сополимеров через образование полимерных оснований Шиффа был использован для прививки полиэтиленгликоля на хитозан [284, 285]. Для этого в полиэтиленгликоль вводили альдегидную группу и проводили реакцию в уксуснокислом растворе хитозана с добавлением метанола при рН 4,6-5,6. Иминную связь между хитозаном и полиэтиленгликолем восстанавливали цианборгидридом натрия. Полученные сополимеры обладают биоактивностью.

Биосовместимый сополимер хитозана с N-винилпирролидоном получают с предварительной обработкой хитозана малеиновым ангидридом и последующей полимеризацией винилпирролидона. В водную дисперсию сополимера вводят антимикробные добавки и получают покровный материал для заживления ожогов кожи. Материал имеет хорошее соотношение водопоглощение/водоотдача и предотвращает бактериальное заражение [286].

Проводящие полимерные материалы на основе полианилина, привитого на хитозан был получен в гомогенных условиях при инициировании полимеризации анилина пероксодисульфатом аммония. Из сополимеризата были получены

пленки и волокна с удовлетворительными механическими свойствами и проводимостью [287].

Полимеризация пиррола в присутствии хитозана дает сополимер также обладающий проводимостью. Строение сополимера изучено методами Фурье ИК-спектроскопии, термогравиметрии сканирующей электронной микроскопии [288].

Разветвленные полисахариды на основе хитина и хитозана. Природные разветвленные полисахариды вызывают все возрастающий интерес в связи с их уникальными биологической активностью и физико-химическими свойствами. Разветвленные глюканы - летианан и шизофиллин показывают высокую противоопухолевую активность и используются клинически [289]. Однако эти полисахариды редко встречаются в природе. Поэтому поиск путей синтеза полисахаридов подобного строения - актуальное направление исследований. В настоящее время проводятся работы по выяснению связи структура - свойства разветвленных полисахаридов и установлению необходимого молекулярного дизайна. Для этого прежде всего необходимо определить процедуру получения различных сконструированных полисахаридов с ветвями, состоящими из сахаридов другого строения.

В качестве основной цепи для такого конструирования удобны хитин и хитозан, так как из функциональные группы могут быть защищены для проведения региоспецифической модификации.

Начало работам этого направления положили Hall и Yalpani в 1980 г. синтезом хитозана с боковыми привесками лактозы [290]. Синтез основан на том, что восстанавливающие сахара атакуют аминогруппу хитозана с образованием иминной связи, которую затем восстанавливают до амидной цианборгидридом натрия. Реакция протекает в смеси уксусная кислота - метанол в течение 6 дней. Продукт реакции имеет необычную растворимость: он не растворяется в этаноле, водном этаноле и других органических растворителях, но и не осаждается из водных растворов добавлением кислоты, основания, солей или их комбинации.

Таким же образом к хитозану были присоединены боковые ветви D-глюкозы, глюкозамина, галактозы, целлобиозы [291]. С γ -лактоном D-глюкогептеновой кислоты был получен соответствующий амид [291]. Реология водных растворов подобных производных изучена в зависимости от СЗ. Низкозамещенные производные имеют более высокую вязкость, сильно зависящую от скорости сдвига [292]. Глюкоза с алкильным заместителем C_{10} была присоединена к хитозану по такой же схеме, растворы этого производного обладают способностью переходить в гель при нагревании [293].

Другой путь синтеза разветвленных полисахаридов был разработан Kurita [294]. Это многоступенчатый синтез через тозил-, иодхитин или фталимидхитозан. Полученный в мягких условиях тозилхитин (щелочной раствор хитина, $TsCl$, $0^\circ C$, 1 ч) растворим в ДМСО и других полярных растворителях, что позволяет легко осуществить иодирование (NaI , $80^\circ C$, ДМСО). При отрыве иона иода иодхитин образует ион карбония при С-6, который способен инициировать катионную полимеризацию виниловых мономеров. При добавлении 1,2-нена-сыщенной глюкозы и кислоты Льюиса к раствору иодхитина в ДМСО происходит присоединение одного глюкозного звена по С-6. Реакцию можно вести с триацетил- или трибензилглюкалем, а также с алкоксидами Сахаров, получая хитин с соответствующими ответвлениями (при $80^\circ C$ получена СЗ = 0,63 для маннозы) [294].

N-фталимидхитозана (фталевый ангидрид, ДМФА, $130^\circ C$) растворяется в полярных органических растворителях, что дает возможность провести тритилирование в пиридине с полным замещением при С-6. О-тритил, N-фталимид

хитозана реагирует с О-перацетил-N-фталимидоглюкозамин бромидом. После снятия защитных групп получено соединение, в котором и основная и боковая цепь построены из глюкозамина, ветвления находятся при C-3 [294].

Введение а-маннозидных боковых цепей в хитин было осуществлено через последовательное N-фталоилирование, О-триметилсилирование, 3-О-ацетилирование хитозана и реакцию с ортоэфиром перацетилированной маннозы. Последующее депротектирование и N-ацетилирование дает хитин с маннозными ветвями. Это соединение легко растворимо в воде и имеет высокую аффинность к конкавалину А [295]. По аналогичной схеме в хитин и хитозан были введены [3-галактозидные ветви [296]. Это соединение гидролизуетсЯ лизоцимом.

Последние достижения этого направления модификации хитина отражены в работе [297]. N-фталоилхитозан является ключевым промежуточным соединением для контролируемой модификации хитина, так как он растворим в общих органических растворителях и легко депротектируется, освобождая аминогруппы. Как 3-О-ацетил-N-фталоилхитозан, так и 3-О-ацетил-N-фталоил-6-О-триметилсилилхитозан удобные органорастворимые прекурсоры для специфического замещения при C-6 и проведения модификаций в мягких условиях. Важно, что три типа функциональных групп в хитине и хитозане могут быть разделены, и все реакции проходят контролируемо. Разветвленные хитины и хитозаны имеют характеристики, существенно отличные от линейных хитина и хитозана, включая растворимость и гигроскопичность. Наблюдается связь между молекулярной структурой и биodeградируемостью, антимикробной активностью и отношением к некоторым ферментам. Эти свойства разветвленных полисахаридов могут быть использованы в различных областях, например, в косметике для увлажнителей, как носители для лекарственных веществ, биоразлагаемые материалы для медицины, презерванты для пищевых продуктов и антимикробные агенты для обработки волокон и тканей.

Из разветвленного хитозана с галактозными остатками при C-2 аминогруппе было получено волокно, обладающее антимикробными свойствами [298].

Кватернизованный хитозан с галактозными привесками был исследован для применения в генной инженерии [299].

Оригинальный способ ветвления хитозана предложил Smidsrod [300]. Частично дезацетилированный хитозан обрабатывают азотистой кислотой, при этом возникают олигомеры хитозана с конечными группами 2,5-ангидро-D-маннозы, которая дает основание Шиффа с хитозаном. После восстановления иминной связи цианборгидридом натрия возникает связь между двумя цепями хитозана.

Другие виды ветвлений, представляющих собой олигопептиды, были введены в хитозан с помощью солянокислого 1-этил-2-[3-диметиламинопропил]карбодиимида, при этом между хитозаном и олигопептидом возникает амидная связь. Полученное соединение может быть использовано для покрытий имплантатов, контактирующих с кровью [301].

Гиперразветвленные дендримеры хитозана с сиалиловой кислотой, содержащие тетраэтиленгликолевые спейсеры, были синтезированы с целью ингибирования гемагглютинацию человеческих эритроцитов вирусом гриппа [302]. Для создания мультиплетной разветвленности тетраэтиленгликоль был модифицирован в аминоацеталь по пятиступенчатой схеме. Остатки сиалиловой кислоты были привешены к каждому дендримеру путем восстановительного N-алкилирования. Сиалодендриды с альдегидными концами были присоединены к хитозану восстановительным аминированием.

Антигриппозная активность обнаружена также у глюкополимеров с олигосахаридными ветвями, имеющими строение N-ацетилгалактозамин [(3-Э-галактопиранозил-(1 → 4)-2-ацетида-2-дезоксид-D-глюкопиранозы [303].

Хитозан, содержащий привески циклодекстрина, получен через образование основания Шиффа с последующим восстановлением цианборгидридом натрия. Полученное соединение способно образовывать комплекс типа гость-хозяин с п-нитрофенолятом [304].

Разветвленные сополимеры, имеющие синтетическую основную цепь с боковыми привесками из N-ацетилглюкозамина или его олигомеров, также находятся в центре внимания исследователей.

Полиакриловая кислота с олигосахаридными боковыми цепями была получена через образование амидных связей. Вязкость растворов сополимера существенно выше, чем исходной полиакриловой кислоты [305].

Сополимер поливинилового спирта с хитоолигосахаридными боковыми цепями получен в две ступени. На первой ступени хитоолигосахариды реагируют с N-метакриламидом в кислой среде, а затем проводят их иммобилизацию на поливиниловом спирте в щелочной среде. Из сополимеров получены пленки с высокой антимикробной активностью [306].

Амфифильные блоксополимеры виниловых эфиров с привесками N-ацетил-D-глюкозаминных остатков были синтезированы живой катионной полимеризацией изобутилвинилового эфира и винилового эфира, содержащего три-O-ацетил-2-фталимидо-β-D-глюкозу. Блок-сополимеризация, инициируемая системой CF₃COOH/EtAlCl₂ в присутствии основания, дает блоксополимер с узким молекулярно-массовым распределением и регулярной структурой сегментов. После снятия защитных групп и последующего ацетилирования получен амфифильный блоксополимер с контролируемым строением. Конечный блоксополимер взаимодействует с лектином агглютинина зародышей пшеницы, который специфически распознает N-ацетилглюкозамин [307].

Количество публикаций по синтезу как разветвленных хитинов и хитозанов, так и полимеров, содержащих хитоолигосахаридные привески, растет, что вызвано актуальностью этого направления модификации для создания новых лекарственных средств, обладающих высокой специфичностью, их доставки в организм человека, для биологических и биомедицинских исследований.

Данная статья посвящена основным направлениям модификации хитина и хитозана, но не претендует на исчерпывающий охват всех известных производных. Вне его рамок остались многочисленные смешанные производные, сочетающие заместители различного типа, сложные производные, созданные с применением методов биохимии и биоинженерии. В обзоре не освещены работы по модификации хитинглюкановых комплексов, которые находятся в стадии развития и представляют значительный интерес как с химической точки зрения, так и по свойствам производных. Применение отдельных производных упомянуто лишь в связи с приданием хитину или хитозану определенных характеристик.

Материалы ежегодных международных и региональных конференций отражают самые последние достижения в синтезе и использовании все новых модификаций хитина и хитозана. Однако, многоступенчатые синтезы основаны на реакциях, характерных для гидроксильных и аминных групп, которые мы попытались отразить в данном обзоре. Применению производных хитина и хитозана посвящены обзоры более узкой направленности [308-312], количество которых постоянно пополняется и может удовлетворить специалистов различного профиля.

ЛИТЕРАТУРА

1. Muzzarelli R.A.A. // Carbohydr. Polym. 1983. V. 3. N 4. P. 53-75.
2. Kurita K. // Yuki Gosu Kagaku Kyokaishi 1984. V. 42. N 6. P. 567-574.
3. Seng J.-M. // Biofutur. 1988. N 71. P. 40-45.
4. Singh D.K., Ray A.R. // J. Macromol. Sci. 2000. V. C40. N 1. P. 69-84.
5. Muzzarelli R.A.A. // Natural chelating polymers. N.-Y.: Pergamon Press. 1973. 230 p.
6. Muzzarelli R.A.A. // Chitin. N.-Y.: Pergamon Press. 1977. 309 p.
7. Tokura S., Asuma I. // Chitin derivatives in life science. Tokyo: Japan Shitin Society, 1992. 140 p.
8. Плиско Е.А., Худьга Л.А., Данилов С.Н. // Усп. химии. 1977. Т. 46. № 8. С. 1471-1488.
9. Тесленко А.Я., Попов В.Т. // Обзорная информация ГУ микробиол. пром-сти. М. 1982. Серия V. Вып. 3. 44 с.
10. Мышкина Л.А., Луценко В.В., Низовский А.Ю. // Обзорная информация. Химико-фармацевтическое производство. М. 1991. Вып. 4. 36 с.
11. Fuhr O., Scholl E. // Chem. Zbl. 1907. Bd. 2. S. 910.
12. Meyer K.H., Wehrly H. // Helv. Chim. Acta. 1937. B. 20. N 3. S. 353-362.
13. Марченко Г.Н., Маршова В.Н., Коваленко В.И. и др. // Высокомогл. соед. 1983. Т. 25Б. №6. С. 427-431.
14. Karrer P., Koenig H., Ustery E. // Helv. Chim. Acta 1943. B. 26. N 5. S. 1296-1315.
15. Cashing J.B., Davis R.V., Kratovil E.J. // J. Am. Chem. Soc. 1954. V. 76. N 12. P. 4590-4591.
16. Bergstrom S. // Naturwissenschaften. 1935. Bd. 23. 706 s.
17. Komazawa H., Saiku J., Nishikawa N., Yoneda I. // Clin. Exp. Metastasis. 1993. V. 11. N 6. P. 482-491.
18. Jeon K.-J., Katsuraya K., Kasuko Y. et al. // Macromolec. 1997. V. 30. № 7. P. 1997-2001.
19. Miyataki K., Okamoto Y., Tokura S., Minami S. // Abstr. Intern. Conf. on chitin and chitosan 8th ICC-4th APCCS Yamaguchi, Japan. 2000. P. 90.
20. Пат. 4958011 США. С 08 В 37/08.
21. Nishi N., Macketa Y., Nishimura S.-i. et al. // Int. J. Biol. Macromol. 1987. V. 9. N 2. P. 109-114.
22. Henderson W., Olsen G.M., Bomington L.S. // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1994. N 16. P. 1863-1864.
23. Пат. 2168274 США. С 08 В 37/08.
24. Hirano S., Usutani A., Zhang Min // Carbohydr. Res. 1994. V. 256. N 2. P. 331-336.
25. Hirano S., Usutani A., Zhang Min // Front. Biomed. Biotechnol. 1993. V. 1 (Carbohydrates and Carbohydrate Polymers). P. 253-264; Chem. Abstr. 121: 57843y.
26. Данилов С.Н., Плиско Е.А., Пяйвинен Э.А. // Изв. АН СССР 1961. № 8. ОХН С. 1500-1506.
27. Kurita K., Inone S., Nishimura S.-I. // J. Polymer Sci. 1991. V. 29A. N 6. P. 937-939.
28. Kurita K., Yoshino H., Yohota K. et al. // Macromolec. 1992. V. 25. N 14. P. 3786-3792.
29. Morita Y., Sugahara Y., Takahashi A., Itonai M. // Eur. Polym. J. 1994. V. 30. N 11. P. 1231-1236.
30. Kruger D., Tschirch E. // Uber Acetylierung der Cellulose. 1931. Bd. 64. N 2. S. 1874-1878.
31. Плиско Е.А., Данилов С.Н. // Химия и обмен углеводов. М. "Наука", 1965. С. 141-145.
32. Nishi N., Noguchi J., Tokura S., Shiota S. // Polym. J. 1979. V. 11. N 1. P. 27-32.
33. Jpn. Kokai Tokkyo Koho № 8007842 (1980); Chem. Abstr. 93:48897v (Заявка. Япония).
34. Yan Jun, Xu Rongnau, Xia Yan // Gaodong XuexiaoHuaxue Hyegbao 1986. V. 7. N 11. P. 1051-1053; Chem. Abstr. 107:154643b.
35. Ando T., Kataoka S. // Kobunshi Ronbunshu 1980. V. 37. N 1. P. 1-8.
36. Kaifu K., Nishi N., Komai T. // J. Polymer Sci. Polym. Chem. Ed. 1981. V. 19. N 9. P. 2361-2363.
37. Jpn. Kokai Tokkyo Koho № 88117002 (1988); Chem. Abstr. 110:8591d (Заявка. Япония).
38. Szosland L. // J. Bioactive and Compat. Polymer. 1996. V. 11. N 1. P. 61-71.
39. Szosland L., East G.C. // J. Appl. Polym. Sci. 1995. V. 55. N 12. P. 2459-2466.
40. Szosland L., Poiowicska A., Pierzchlewska A., Poiowicski S. // Polymer. 1993. V. 38. P. 107-113.
41. Van Luyen D., Rossbach V. // J. Appl. Polym. Sci. 1995. V. 55. N 5. P. 679-686.
42. Dong Yan Ming, Wang Jian. // Gaofenzi Xuebao. 1999. N 5. P. 576-580.
43. Sashiwa H. // Advance in Chitin Sciences (Proc. 7th Int. Conf. on Chitin Chitosan and EUCHIS-97) Lyon, France / Ed. A. Domard, G.A.F. Roberts, K.M. Varum. 1997. V. 2. P. 360-365.
44. Nishi N., Ohnuma H., Nishimura S. et al. // Polym. J. 1982. V. 14. N 11. P. 919-923.
45. Kurita K., Ichikawa H., Ishiziki S. et al. // Macromol. Chem. 1982. V. 183. N 5. P. 1161-1169.
46. Shorigin P.P., Makarova-Semljanskaja N.N. // Uber die Methylather des chitins, 1935. Bd. 68. N 1. P. 969-973.

47. Данилов С.Н., Плиско Е.А. // ЖОХ. 1958. Т. 28. С. 2217-2223.
48. Okimatsu S. // J. Agr. Chem. Soc. Japan 1956. V. 30. N 1. P. 36-41.
49. Yamada H., Imoto T. // Carbohydr. Res. 1981. V. 92. N 1. P. 160-162.
50. Tokura S. // Pop. Plast. 1982. V. 27. N 11. P. 11-12, 18.
53. Данилов С.Н., Плиско Е.А. // ЖОХ. 1954. Т. 28. № 11. С. 2071-2075.
52. Okimatsu S. // J. Agr. Chem. Soc. Japan. 1958. V. 32. N 4. P. 303-308.
53. Данилов С.Н., Плиско Е.А. // ЖОХ. 1961. Т. 31. № 2. С. 469-473.
54. Trujillo R. // Carbohydr. Res. 1968. V. 7. N 4. P. 483-485.
55. Вихорева Г.А., Гладышев Д.Ю., Базт М.Р. и др. // Cellulose Chem. Techn. 1992. V. 26. N 6. P. 663-674.
56. Акопова Т.А., Роговина С.З., Вихорева Г.А., Зеленецкий СР. // Высокомогл. соедин. 1995. Т. 37Б. № 10. С. 1797-1801.
57. Hijerde R.J.M., Varum K.M., Tokura S., Smidsrod O. // Carbohydr. Polym. 1997. V. 34. N 3. C 131-134.
58. Tokura S., Nishimura S.-I., N. Nishi. // Polym. J. 1983. V. 15. N 8. P. 597-602.
59. Izumi Y., Matsuo T., Uraki Y. et al. // Proc. 4th Int. Conf. Chitin and Chitosan 1988. Norway. Pub. 1989. P. 519-522.
60. Tokura S., Nishi N., Nishimura S., Somorin O. // Sen-I Gakkaishi (Fiber). 1983. V. 39. №. 11. P. 507-511.
61. Baba S., Uraki Y., Miura Y., Tokura S. // Proc. 4th Int. Conf. Chitin and Chitosan 1988. Norway. Pub. 1989. P. 703-706.
62. Ohya Y., Nomomwa K., Hirai K. // Macromol. Chem. Phys. 1994. V. 195. N 8. P. 2839-2853.
63. Вихорева Г.А., Хомяков К.П., Сахаров И.Ю., Гальбрайт Л.С. // Хим. волокна. 1995. № 5. С. 34-37.
64. Song Y., Onuchi Y., Naggi T. // Biol. Pharm. Bull. 1993. V. 16. N 1. P. 48-54.
65. Komesawa H., Saiki J., Igarashi Y. et al. // Carbohydr. Polym. 1993. V. 21. N 4. P. 299-307.
66. Saiku /., Murata J., Nakajinu M. et al. // Cancer Res. 1990. V. 50. N 12. P. 3631-3637.
67. Tokura S., Nishimura S.-I. // Funct. Monomers Polym. (2 nd Ed.). 1997. P. 433-454.
68. Пат. WO 97226 Польша С 08 В 37/08.
69. JP 97 316105 (1997); Chem. Abstr. 128:93249n. С 08 В 37/08. (Заявка. Япония).
70. Пат. 4027068 США. В 32 В 17/06.
71. Tokura S., Uraki Y., Ohmiya K. et al. // Carbohydr. Polym. 1990. V. 13. N 4. P. 363-374.
72. Tokura S., Norio N., Nishimura S.-i., Ikechi Y. // Polym. J. (Tokyo). 1983. V. 35. N 7. P. 553-556.
73. Shimiezu Y. // Shiga-Kenritru Tanki Daigaku Gakuyutsu Zasshi. Chem. Abstr. 123:12179k. 1994. N 46. P. 1-5.
74. Kurita K., Koyama Y., Inone S., Nishimura S.-I. // Macromolec. 1990. V. 23. N 11. P. 2865-2869.
75. Furuhashi K.-I., Arai N., Ishizuki S. et al. // Sen-i-Gakkaishi (Fiber). 1998. V. 54. N 12. P. 647-650.
76. 84-34004(1984); РЖ Химия 1987. 2Ф20П. (Заявка. Япония).
77. Kim S.J. // Macromol. Chem. Phys. 1994. V. 195. N 5. P. 1687-1693.
78. Suh S.B., Kim S.J., Lee Y.M., Kim J. J. // Polym. 1994. V. 18. N 6. P. 906-913.
79. Kurita K., Hirakawa M. // Advance in Chitin Sciences Proc. 7th Int. Conf. on Chitin Chitosan and EUCHIS'97. Lyon, France Ed.: A. Domard, G.A.F. Roberts, K.M. Varum, 1997. V. 2. P. 355-359.
80. Vincendone M. // Advance in Chitin Sciences / Proc. 7th Int. Conf. on Chitin Chitosan and EUCHIS'97. Lyon, France ed. A. Domard, G.A.F. Roberts, K.M. Varum, 1997. V. 2. P. 328-333.
81. Tseng H., Furukata K.-i., Sakamoto M. // Carbohydr. Res. 1995. V. 270. N 2. P. 149-161.
82. Tseng H., Lee R.S., Furukata K.-i., Sakamoto M. // Sen-i-Gakkaishi (Fiber). 1995. V. 51. N 11. P. 540-543.
83. R.A.A. Muzzarelli // Advance in Chitin Science / (Proc. 3rd Int. Conf. of Eur. Chitin Soc.) Potsdam, Germany / Ed. M.G. Peter, A. Domard, R.A.A. Muzzarelli, 1999. V. 4. P. 171-175.
84. Гринипан Д.Д., Емельянов Ю.Г., Капуцкий Ф.Н. // Химия древесины 1987. № 1. С. 30-35.
85. McCormick C.L., Lichatovich D.K., Peleso J.A., Anderson K.W. // Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. 1980. N 121 (Modif. Polym.) P. 371-380.
86. Terbojevich M., Cosani A., Carraro C, Torri G. // Chitin and Chitosan. Proc. 4th Int. Conf. 1988. N.-Y. 1989. P. 407-414.
87. Cardenas T., Bernal A.L., Retamal E.J. 1992. V. 37. N 4. P. 285-289; Chem. Abstr. 119:98357v.
88. Пат. 746870 Англия. 116 h.
89. Wolfrom M.L., Shen Han T.M. // J. Am. Chem. Soc. 1959. V. 81. N 7. P. 1764-1766.

90. Пат. 326792 Швейцария. 116 h.
91. Nagasawa K., Tohira Y., Inone Y., Tanoura N. // Chem. Pharm. Bull. 1972. V. 20. N 1. P. 157-162.
92. Батура Л.И., Вихорева Г.А., Норейка Р.М. и др. // Cell. Chem. Technol. 1981. V. 15. N 5. P. 487-504.
93. Warner D.T., Coleman L.L. // J. Org. Chem. 1958. V. 23. N 8. P. 1133-1135.
94. Горбачева И.Н., Кожушко М.В., Вихорева Г.А., Гальбрайт Л.С. // Изв. вузов. Химия и хим. технол. 1990. Т. 33. № 11. С. 120-123.
95. Норейка Р.М., Колодзейкис В.С., Дуденас Т.Э. // Тез. докл. Всесоюз. конф.: "Актуальные вопросы разработки, изучения и производства лекарственных средств", Каунас. 1985. С. 113-116.
96. Степанова С.А., Будовская К.Э., Горбачева И.Н. // Повышение эффективности технологических процессов и оборудования в текстильной промышленности. М., 1993. С. 62-65.
97. Пат. 955053 ФРГ. 12а, 6.
98. Торгаев В.И., Гернг Е.В., Тюрина В.И. // Тез. докл. Всесоюз. конф.: "Проблемы использования целлюлозы и ее производных в медицине и микробиологической промышленности." М., 1989. С. 54.
99. Gamsasade A., Шаг А., Nasibov S. et al. // Carbohydr. Polym. 1997. V. 34. N 1-2. P. 113-116.
100. Terbojevich M., Carraro M., Cosani A. et al. // Macromol. Chem. 1989. V. 190. N 11. P. 2847-2855.
101. Пат. 2048475 РФ. С 08 В 37/08.
102. Muzzarelli R.A.A., Tanfani T., Emmanuelli M. et al. // Carbohydr. Res. 1984. V. 126. N 2. P. 225-231.
103. Hirano S., Kinugawa J., Nishioka A. // Chitin in Nature and Technology. (Proc. Int. Conf. Chitin/Chitosan 3rd). 1985. P. 461-468.
104. Nishimura S.-i., Tokura S. // Int. J. Biological. Macromolec. 1987. V. 9. N 4. P. 225-234.
105. Tokura S., Toyama K., Nishi N. et al. // J. Macromol. Sci. 1994. V. A31. N 11. P. 1701-1718.
106. Будовская К.Э., Кузнецов Ю.Н., Вихорева Г.А. и др. // Хим. волокна. 1995. № 5. С. 31-34.
107. Кочнев И.Г., Молодкин В.М., Мchedlishvili Б.В., Плиско Е.А. // ЖПХ. 1973. Т. 46. № 5. С. 1141-1142.
108. Allan G.G., Gilmartin E.J., Struszczyk H. // J. Macromol. Sci. 1981. V. A15. N 4. P. 599-608.
109. Гамзададе А.М., Сименел А.И., Леонова Е.Ю., Рогожин С.В. // Тез. докл. II Всесоюз. конф. по водорастворимым полимерам. Иркутск, 1982. С. 157.
110. Пат. 127084 Польша. С 08 В 37/08, С 07 G 3/00.
111. Нифантьев Е.Е., Васильев А.В., Коротеев М.П., Гамзададе А.М. // Докл. АН 1994. Т. 336. № 6. С. 779-781.
112. Henderson W., Olsen G.M., Bonnington L.S. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1994. N 16. P. 1863-1864.
113. Rodrigues N.M., Ramos V.M., Stanic V. et al. // Advance in Chitin Science (Proc. 3rd Int. Conf. of Eur. Chitin Soc.) Ed.: M.G. Peter, A. Domard, R.A.A. Muzzarelli, Potsdam, Germany 1999. V. 4. P. 200-205.
114. Wolfrom M.L., Maher G.G., Chaney A. // J. Org. Chem. 1958. V. 23. N 10. P. 1990.
115. Hirano S., Ohe Y. // Carbohydr. Res. 1975. V. 41. N 1. P. 1-2.
116. Hirano S., Koide Y. // Carbohydr. Res. 1978. V. 65. N 1. P. 166-168.
117. Moore G.K., Roberts G.A.F. // Proc. Int. Conf. Chitin/Chitosan, 1st Boston. 1997. P. 421-429.
118. Moore G.K., Roberts G.A.F. // Int. J. Biol. Macromol. 1982. V. 4. N 4. P. 246-249.
119. Fujii S., Kamagai H., Noda M. // Carbohydr. Res. 1980. V. 83. N 2. P. 389-393.
120. Grant S., Blair H.S., McKay G. // Polymer Commun. 1990. V. 31. N 7. P. 267-268.
121. Kongo O., Ishii S., Nishimura S., Kurita K. // Adv. Chitin/Chitodan Proc. 5th Int. Conf. 1991. (Pub. 1992) P. 526-532.
122. Zong Z., Kimura Y., Takahashi M., Yamani H. // Polymer 2000. V. 41. N 3. P. 899-906.
123. Hadson S.M., Kim U.B. // Polymer Preprints. 1990. V. 31. N 1. P. 629.
124. Grant S., Blair H.S., McKay G. // Polymer Commun. 1988. V. 29. N 11. P. 342-344.
125. Cho J., Cong M.S., Park S.B. // Polym. 1982. V. 6. N 4. P. 228-234; Chem. Abstr. 97:146487 p.
126. Hirano S., Osaka T. // Agric. Biol. Chem. 1983. V. 47. N 6. P. 1389-1391.
127. Loubaki E., Sicsic S., Le Goffic F. // Eur. Polym. J. 1989. V. 25. N 6. P. 379-384.
128. Kurita K., Nishimura S.-I., Takeda T. // Polym. J. 1990. V. 22. N 5. P. 429-434.

129. *Роговина С.З., Вихорева Т.А., Аكوпова Т.А. и др. //Высокомол. соед. 1997. Т. 39. № 6. С. 941-946.*
130. *Rogovina C.Z., Vikhoreva G.A., Akopova T.A. et al. // Mendeleev Comm. 1998. N 3. P. 107-109.*
131. *Wolfrom M.L., Versellotti J.R., Horton D. Hi. Org. Chem. 1964. V. 29. N 3. P. 547-550.*
132. *Нудьга Л.А., Плиско Е.А., Данилов С.Н. // ЖПХ. 1974. Т. 47. № 4. С. 872-875.*
133. Пат. США 2072771 С 08В 37/08.
134. *Okimasu S., Senju R. II J. Agr. Chem. Soc. Japan 1950. V. 23. P. 437.*
135. *Okimasu S. II Nippon Nogel Kagaku Kaishi. 1958. V. 32. P. 383-386.*
136. Заявка Япония 8770401. С 08 В 37/08.
137. Заявка Япония 8765561. С 08 В 37/08.
138. *Гладышев Д.Ю., Базт М.Р., Вихорева Г.А., и др. // Высокомол. соед. 1990. ТБ32. № 7. С. 503-505.*
139. *Вихорева Г.А., Гальбрайт Л.С., Овсепян А.М., Панов В.Н. II Высокомол. соед. 1989. Т. 31А. №5. С. 1003-1007.*
140. *Базт М.Р., Вихорева Г.А., Гальбрайт Л.С. //Хим. волокна. 1990. № 5. С. 5-6.*
141. *Базт М.Р., Скоринова Е.Е., Вихорева Г.А., Гальбрайт Л.С. II Высокомол. соед. 1990. Т. 32А. № 4. С. 805-809.*
142. *Rinaudo M., Pham Le Dung, M. Milas // Adv. Chitin/Chitosan. Proc. Int. Conf. 5th. 1991. (Pub. 1992). P. 516-525.*
143. Заявка Япония 2-105801. С 08 В 37 08.
144. *Carolan C.A., Blair H.S., Allan S.J., McKay G. II Chem. Eng. Res. Des. 1991. V. 69. N A3. P. 195-196.*
145. *Shigemasa Y., Ishida A. II Chem. Lett. 1995. N 8. P. 623-624.*
146. Пат. 3432227. ФРГ. С 08 В 37/08.
147. *Ishikuro T., Inone S., Meshitsuka G. et al. //Sen-I Gakkaishi (Fiber). 1995. V. 51. N 12. P. 571-579.*
148. *Нудьга Л.А., Плиско Е.А., Данилов С.Н. //ЖОХ. 1973. Т. 55. № 12. С. 2752-2756.*
149. *Senju /?, Okimasu S. Hi. Agr. Chem. Soc. Japan. 1950. V. 23. N 10. P. 432-437.*
150. *Wang Aigin, Li Hongqu, Yu Xianda II Tianran Chanwu Yanijii Yu Kaifa. 1997. V. 9. N 2. P. 28-31; Chem. Abstr. 128:129338y.*
151. *Okimasu S. II J. Agric. Chem. Soc. Japan. 1956. V. 30. N 1. P. 36-41.*
152. *Kokufuta E., Hirato M., Iwai S. II J. Japan. Soc. Colour. Mater. 1975. V. 48. N 8. P. 493-497.*
153. *Maresh G., Clausen T., Lang G. II Chitin and chitosan / Proc. 4th Int. Conf., Norway 1988 (pub. 1989). P. 389-395.*
154. *Asahina D., Miyashita Y., Nishio Y. II Sen-I Gakkaishi (Fiber). 1999. V. 55. N 1. P. 28-33.*
155. *Asahina D., Matsubara T., Miyashita Y., Nishio Y. II Sen'I Gakkaishi (Fiber) 2000. V. 56. N 9. p. 435-443.*
156. Заявка Япония 5411955. С 08L89/00.
157. Заявка Япония 57180602. С 08В 37/00.
158. Заявка Япония 01259084. С 09К 5/00.
159. *Seino H., Akamutsu E. II Kichin Kitosan Kenkyu 1990. V. 5. N 2. P. 162-163; Chem. Abstr. 132:69057k.*
160. *Kim Jin Hong, Lee Young Moo. II Polymer. 1993. V. 34. N 9. P. 1952-1957.*
161. *Нудьга Л.А., Плиско Е.А., Данилов С.Н. //ЖОХ. 1975. Т. 45. № 5. С. 1145-1149.*
162. *Баранова В.Н., Плиско Е.А., Нудьга Л.А. II Бум. пром-сть. 1976. № 7. С. 9-10.*
163. *Shimiezu Y. // Shiga-Kenritru Tanki Daigaku Gakujitsu Zasshi. 1994. N 46. P. 1-5.*
164. *Нудьга Л.А., Петрова В.А., Денисов В.М., Петропавловский Г.А. // ЖПХ. 1991. Т. 64. № 1. С. 229-232.*
165. *Нудьга Л.А., Петрова В.А., Петропавловский Г.А. и др. // ЖПХ. 1991. Т. 64. № 3. С. 517-621.*
166. *Muraki E. II Osaka Kogyo Gijusu Shikensho. 1979. V. 30. N 4. P. 233-237.*
167. *Tingda J., Fudao L. II Int. J. Biol. Macromol. 1987. V. 9. N 1. P. 54-56.*
168. *Karrer P., White S.M. II Helv. Chim. Acta 1930. V. 13. N 5. P. 1105-1113.*
169. *Okimasu S. II i. Agr. Chem. Japan. 1958. V. 32. N 4. P. 298-302.*
170. *Нудьга Л.А., Плиско Е.А., Данилов С.Н. //ЖОХ. 1973. Т. 43. № 12. С. 2756-2760.*
171. *Орлиевская О.В. II Исследования физико-химических свойств тромболитической протеазы из Aspergillus terricola. Дис. ... канд. хим. наук. 1973. Ленингр. химико-фарм. ин-т. 148 с.*
172. *Hirano S., Matsuda N., Miura O., Tanaka T, II Carbohydr. Res. 1979. V. 71. N 1. P. 344-348.*

173. Synowiecki J., Sikorski Z.E., Naczek M., Piotrowska H. // *Biotechnol. Bioengin.* 1982. V. 24. N 8. P. 1871-1876.
174. Николаев А.Ф., Прокопов А.А., Шульгина Э.С., Чуднова В.М. // *ЖПХ.* 1985. Т. 58. № 8. С. 1916-1917.
175. Muzzarelli R.A.A., Tanfani T. // *Carbohydr. Polym.* 1985. V. 5. № 4. P. 297-307.
176. R.A.A. Muzzarelli // *J. Membr. Sci.* 1983. V. 16. P. 295-308.
177. A. Domard, M., Rinaudo, C. Terrasin // *Int. J. Biol. Macromol.* 1986. V. 8. № 2. P. 105-107.
178. J. Domard, C. Gey, M. Rinaudo, C. Terrasin. // *Int. J. Biol. Macromol.* 1987. V. 9. № 4. P. 233-237.
179. A. Domard, M. Rinaudo, C. Terrasin. // *J. Appl. Polym. Sci.* 1989. V. 38. P. 1799-1806.
180. E. Loubaki, M. Ourevitch, S. Sicsic // *Eur. Polym. J.* 1991. V. 27. № 3. P. 311-317.
181. Young Ho Kim, Hyung-Min Choi, Jung Hu Yoon // *Text. Res. J.* 1998. V. 68. № 6. P. 428-434.
182. Eur. Pat. EP 400364. C 08 B 37/08.
183. Seo T., Nakagawa M. // *Adv. Chitin Sci.* 2000. V. 4. P. 257-262.
184. Hirano S., Yagi Yuig // *Agr. and Biol. Chem.* 1980. V. 44. № 4. P. 963-964.
185. Kim Chen Ho, Choi Jand Won at al. // *Polym. Bull.* 1997. V. 38. № 4. P. 387-393.
186. Wakita M.-aki., Hashimoto M. // *Kobunshi Ronbunshu.* 1995. V. 52. № 10. P. 589-593.
187. Заявка 4310088 ФПГ. C 08 B 37/08.
188. Eur. Pat. EP 290741. A 61 K 7/48.
189. Ger. Offen. DE 3614697. C 08 B 37/08.
190. Inukai Y., Kaida Y., Yasuda S. // *Adv. Chitin Sci. Proceedings of the 7-th Intern. Conf. on Chitin and Chitosan. Lyon France / Ed.: A. Domard, G.A.T. Roberts, K.M. Varum.* 1997. V. 2. P. 513-518.
191. Muzzarelli R.A.A., Tanfani T. // *Chitin and chitosan. Proceedings of 2-nd Conf. on chitin and chitosan.* 1982. Sapporo, Japan. P. 45-53.
192. Muzzarelli R.A.A., Tanfani T., Emmanuelli M. Mariotti S. // *Carbohydr. Res.* 1982. V. 107. № 2. P. 199-214.
193. Delben F., Lapasin /?, Priel S. // *Int. J. Biol. Macromol.* 1990. V. 12. N 1. P. 9-13.
194. Pham le Dung, M. Milas, M. Rinaudo, Desbrieres J. // *Carbohydr. Polym.* 1994. V. 24. № 5. P. 209-214.
195. Cuero R.G., Lilchoj E.B. // *Biotechnol. tech.* 1990. V. 4. № 4. p. 275-280.
196. Muzzarelli R.A.A., Weckx M., Filippini O., Lough C // *Carbohydr. Polym.* 1989. V. 11. № 4. P. 307-320.
197. Zucchini C, Rizzoli C // *Biomaterials.* 1991. V. 12. № 4. P. 281-285.
198. Hoppe-Seyler F. // *Ber.* 1894. B. 27. N 3. S. 3329-3331.
199. Пат. 76 68689. Япония. C 08 B 37/08.
200. Hirano S., Kondo Y., Fujii K. // *Carbohydr. Res.* 1985. V. 144. N 2. P. 338.
201. Miya M., Iwamoto R., Ohta K., Mima S. // *Kobunshi ronbunshu.* 1985. V. 42. N 3. P. 181-189.
202. Kurita K., Chikaoka S., Kamiya M., Koyama Y. // *Bull. Chem. Soc. Japan* 1988. V. 61. N 2. P. 927-930.
203. Kurita K., Koyama Y., Nishimura S.-L., Kamiya M. // *Chem. Lett.* 1989. N 9. P. 1597-1598.
204. Hirano S., Tsushida H., Nagao H. // *Biomaterials.* 1989. V. 10. N 8. P. 574-576.
205. Aiba S.I. // *Int. J. Biol. Macromol.* 1989. V. 11. N 4. P. 249-252.
206. Tian Chen, Jun Yan, Rougnon Xu, Yan Xia // *Chin. J. Appl. Chem.* 1989. V. 6. N 3. P. 90-92.
207. Kurita K., Kamiya M., Nishimura S. // *Carbohydr. Polym.* 1991. V. 16. N 1. P. 83-92.
208. Aiba S.-i. // *Int. J. Biol. Macromol.* 1991. V. 13. N 1. P. 40-44.
209. Baba T., Beppi M., Kamisawa C // *Kobunshi Ronbunshu* 1994. V. 51. № 8. P. 523-529.
210. Nishimura S.-I., Kohgo O., Kurita K., Kuzuhara H. // *Macromolecules.* 1991. V. 24. № 17. C 4745-1748.
211. Kurita K. // *Adv. Chitin Sci. Proceedings of the 7-th Int. Conf. on Chitin and Chitosan. Lyon France / Ed.: A. Domard, G.A.T. Roberts, K.M. Varum.* 1997. V. 2. P. 320-327.
212. Yamaguchi R., Aral J., Itoh T. // *Carbohydr. Res.* 1981. V. 88. N LP. 172-175.
213. Hirano S., Moriyasu T. // *Carbohydr. Res.* 1981. V. 92. N 2. P. 323-327.
214. А.с. 802290 СССР. C 08 B 37/08, А 61 K 7/00.
215. Николаев А.Ф., Прокопов А.Ф., Шульгина Э.С. // *ЖПХ.* 1985. Деп. ВИНТИ 20.05.85. №3413-85.
216. Gruber J.V., Ruter V., Bandekar J., Konish P.N. // *Macromolecules.* 1995. V. 28. № 26. P. 8865-8867.

217. Заявка/Япония № 8329801 (1983); Chem. Abstr. 99:55390k;
218. Muzzarelli R.A.A., Tanfani T., Mariotti S., Emmanuelli M. // Carbohydr. Polym. 1982. V. 2. N 2. P. 145-157.
219. Moore G.K., Roberts G.A.F. // Int. J. Biol. Macromol. 1981. V. 3. N 5. P. 337-340.
220. Hirano S., Takeuji M. // Int. J. Biol. Macromol. 1983. V. 5. N 6. P. 373-376.
221. Пат. 4424346 США. С 08 В 37/08.
222. Заявка 2630639 Франция. С 08 В 37/08.
223. Onishi N., Kondo K., Takemoto K. // Macromol. Chem. 1990. V. 191. N 10. P. 2397-2402.
224. Muzzarelli R.A.A. // Carbohydr. Polym. 1992. V. 19. N 4. P. 231-236.
225. Crini G., Torri C., Guerrini M. // Carbohydr. Polym. 1997. V. 33. N 2/3. P. 145-151.
226. Muzzarelli R.A.A., Rati P. // Carbohydr. Polym. 1994. V. 23. N 3. P. 155-160.
227. Moore G.K., Roberts G.A.F. // Int. J. Biol. Macromol. 1982. V. 4. N 4. P. 246-249.
228. Ouchi T., Banba T., Fujimoto M., Hamamoto S. // Makromol. Chem. 1989. V. 190. N 8. P. 1817-1826.
229. Ouchi T., Banba T., Masuda H., et al. // J. Macromol. Sci. 1991. V. A28. N 10. P. 959-976.
230. Illinas A. // Adv. Bioprocess Eng., Ed. Galindo E. Dordrecht. 1994. P. 461-506.
231. Kojima K., Yoshikuni M., Suzuki T. // J. Appl. Polymer Sci. 1979. V. 24. N 7. P. 1587-1594.
232. Yang Jingxian, He Dading, Wu Jun, et al. // Shandong Haiyang Xeynan Xuebao. 1984. V. 14. N 4. P. 58-62; Chem. Abstr. 103:71732w.
233. Lee Y.C., Kim K.S., Shin J.S. // Pollimo. 1989. V. 13. N 5. P. 442-446; Chem. Abstr. 111:174785k.
234. Takahashi A., Sugahara Y., Hirano Y. // J. Polymer Sci. 1989. V. A27. N 11. P. 3817-3828.
235. Yazdani-Pedram M., Lagos A., Campos N., Retuert J. // Int. J. Polym. Mater. 1992. V. 18. N 1-2. P. 25-37.
236. Ren L., Tokura S. // Carbohydr. Polym. 1994. V. 23. N 1. P. 19-25.
237. Ren L.D., Goto Y., Kaneko H. // Polym. Int. 1994. V. 35. N 4. P. 303-307.
238. Nakajima T., Sugawara Y., Takahashi A., Teramachi S. // Sen-i-Gakkaishi (Fiber) 1994. V. 50. N 8. P. 329-334.
239. Kurita K., Inone M., Nishimura Y. // Abstracts EUCHEIS'99 Chem-PS-091.
240. Yang Jingxian, He Dading, Wu Jun, Jang Hua, Gao Yan // Shandong Haiyang Xueynan Xuebao. 1987. V. 17. N 2. P. 62-66; Chem. Abstr. 110:213527g.
241. Shigeno Y., Kondo K., Takemoto K. // J. Macromol. Sci. 1996. V. 29. N 6. P. 1939-1943.
242. Kobayashi K., Aoki K., Sumimoto H., Akaike T. // Makromol. Chem. Rapid Comm. 1990. V. 11. N 11. P. 577-582.
243. Kurita K., Hashimoto S., Ishii S. // Abstr. Book of 1th Int. conf. Eur. Chitin Soc. Lyon. France. 1995. P. 34.
244. Sato H., Tsuge S., Ohtani Y. et al. // Macromolec. 1997. V. 30. N 14. P. 4030-4037.
245. Kurita K., Hashimoto S., Yoshino H. et al. // Macromolec. 1996. V. 29. N 6. P. 1939-1942.
246. Kurita K., Inone S., Yanamura K. et al. // Macromolec. 1992. V. 25. N 14. P. 3791-3794.
247. Kurita K., Kanari M., Koyama. // Polym. Bull. (Berlin). 1985. V. 14. N 6. P. 511-514.
248. Aiba S., Minouura N., Fujiwara Y. // Int. J. Biol. Macromol. 1985. V. 7. N 2. P. 120-121.
249. Detchprohm S., Aoi K., Okada M. // Abstracts of Int. conf. 8th ICCS and 4th APCCS Yamaguchi, Japan. 2000. P. 182.
250. Kadokawa J.-I., Yamashita K., Karasu M. et al. // J. Macromol. Sci. 1995. V. A32. N 7. P. 1273-1280.
251. Заявка. Япония 8914201. С 08 В 37/08.
252. Caner H., Hasipogbu H., Vilmaz E., Vilmaz O. // EUCHEIS-99. Abstracts 3rd Int. Conf. of the Eur. Chitin Soc. Potsdam, Germany 1999. Chem-OL-084.
253. Aoi K., Takasu A., Okada M. // Macromol. Chem. Phys. 1994. V. 195. N 12. P. 3835-3844.
254. Sato H., Ohtani Y., Tsuge S. et al. // Macromolec. 2000. V. 33. N 2. P. 357-362.
255. Aoi K., Takasu A., Okada M. // Kobunshi Ronbunshu. 1998. V. 55. N 9. P. 501-511.
256. Kataoka S., Anto T. // Ibid. 1980. V. 37. N 3. P. 185-190.
257. Kataoka S., Anto T. // Ibid. 1982. V. 39. N 6. P. 399-405.
258. Kim Yong Beom, Jung Byung Ok, Kim Kong Soo et al. // Pollimo. 1988. V. 12. N 8. P. 678-685.
259. Заявка. Япония 9141105. С 08 F 2/44.
260. Shanta R.L., Baba U., Rao K.P. // Eur. Polym. J. 1995. V. 31. N 4. P. 377-382.
261. Qu X., Wrzyczynski A., Pielichowski K., et al. // J. Macromol. Sci. 1997. V. A34. N 5. P. 888-900.

262. Takahashi A., Sugahara V., Horikawa Y. *II Sen'I Gakkaishi (Fiber)* 1987. V. 43. N 7. P. 362-369.
263. Retuert J., Yazdan-Perdam M. *II Polym. Bull.* 1993. V. 31. N 5. P. 559-562.
264. Wang Hanfu, Wang Zhiliang, Chen Xin et al. // *Fudan Xuebao, Ziran Kexueban.* 1997. V. 36. N 1. P. 107-111; Chem. Abstr. 128:115304f.
265. Lagos A., Reyes J. // *J. Polymer Sci.* 1988. V. 26A. N 4. P. 985-992.
266. Wang Y., Yang J., Qin K. // *Gaofenzi Xuebao.* 1994. N 2. P. 188-195; Chem. Abstr. 122:82653g.
267. Takahashi A., Tansawa J., Sugahara Y. *II Kobunshi Ronbunshu.* 1989. V. 46. N 5. P. 329-334; Chem. Abstr. 111:97905v.
268. Takahashi A., Feng L.G., Sugahara Y. *II Kogakuin Daigaku Kenkyo Hokoku.* 1992. V. 72. P. 55-61; Chem. Abstr. 120:161152k.
269. Jenkins D.W., Hudson S.M. // *EUCHIS'99. Abstracts 3rd Int. Conf. of the Eur. Chitin Soc.* Potsdam, Germany 1999. Chem.-OL-083.
270. Cho Suk Hyong., Kim Kong Soo, Kim Kong Ho et al. // *Pollimo.* 1990. V. 14. N 1. P. 9-13.
271. Singh D.K., Ray A.R. Hi. *Appl. Polym. Sci.* 1994. V. 53. N 8. P. 1115-1121.
272. Wei Deking, Luo Xiaojim, Deng Ping et al. // *Gaofenzi Xuebao.* 1995. N 4. P. 427-433; Chem. Abstr. 123:258386s.
273. Смирнова А.А., Семчиков Ю.Д., Тухобаева Я.Г., Пастухова Н.В. // *Высокомогл. соедин.* 2001. Т. 43. №2. С. 353-356.
274. Kim Chen-Ho., Lee Joon-Woo Jung Byung Ok. et al. // *Kongop Hwanhak.* 1999. V. 6. N 1. P. 130-139; Chem. Abstr. 119:98360r.
275. Kim Kong Soo, Lim Jeong Kyu Cho Suk Hyeong et al. // *Pollimo,* 1993. V. 17. N 2. P. 222-230; Chem. Abstr. 123:287076w.
276. Li Wei, Li Zhangyang, Feng Hinde *II Polymer Prepr. (Am. Chem. Soc). Div. Polym. Chem.* 1992. V. 33. N 1. P. 974-975.
277. Kim Kyoung Ho, Kim Keng Soo, Shin Jac Sup *II Pollimo.* 1987. V. 17. N 2. P. 133-138; Chem. Abstr. 107:9207h.
278. Le H.P., Canh T.T., Hai L. *II Rad. Tech. Asia-93. UV/EB Conf. Proc.* 1993. P. 649-653.
279. Wu G.-S., Cui J.-G., Hang G.Z. *II Shiyu Huagong.* 1994. V. 23. N 10. P. 651-657.
280. Doo Kang, Choi H.R., Dong K. *II J. Appl. Polym. Sci.* 1999. V. 73. N 4. P. 469-476.
281. Нудьга Л.А., Петрова В.А., Лебедева М.Ф., Петропавловский Г.А. // *ЖПХ.* 1996. Т. 69. №7. С. 1194-1199.
282. Ohya Y., Maruhashi S., Shizumo K. et al. // *J. Macromol. Sci.* 1999. V. A36. N 3. P. 339-353.
283. Chung J.-E., Chung B.-O., Chung B.-K. // *Kongop Hwahak.* 1994. V. 5. N 3. P. 524-536.
284. Mo Humei, Aiba S.-I., Wang P., Hayashi K., Xu Z. *II Advance in Chitin Sciences Proc. 7th Int. Conf. on Chitin Chitosan and EUCHIS'97* Lyon, France / Ed.: A. Domard, G.A.F. Roberts, K.M. Varum, 1997. V. 2. P. 396-401.
285. Musslinn T., Morimoto M., Saimoto H. et al. // *Abstr. Int. Conf. 8th ICCS/4th APCCS 2000.* P. 93.
286. Gao J.-P., Li L.-C., Huang M.-Z. // *IUPAC 32nd Int. Symp. Macromol. Kyoto, 1988. Preprint Kyoto, 1988.* P. 80.
287. Yang Sen, Tirmizi S.A., Burns A. et al. *Synthetic Metals.* 1989. V. 32. N. 2. P. 191-200.
288. Khor E., Whey J., Liong H. // *Carbohydr. Polym.* 1995. V. 26. N 3. P. 183-187.
289. Kurita K., Shimada K., Nishiyama Y. et al. // *Macromolec.* 1998. V. 31. N 15. P. 4764-4769.
290. Hall L.D., Yalpani M. *II J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1980. N 23. P. 1153-1154.
291. Yalpani M., Hall L.D. // *Macromolec.* 1984. V. 17. N 3. P. 272-281.
292. Hall L.D., Holme K.R. // *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1986. N 3. P. 217-218.
293. Holme K.R., Hall L.D. // *Macromolec.* 1991. V. 24. N 13. P. 3828-3833.
294. Kurita K., Nishimura S., Koyne Y. et al. // *Polymer Preprints.* 1990. V. 31. N 1. P. 624.
295. Kurita K., Kobajashi M., Munakata T. et al. // *Chem. Lett.* 1994. N 11. P. 2003-2006.
296. Kurita K., Akao H. // *Polym. Bull. (Berlin).* 1997. V. 39. N 5. P. 543-549.
297. Kurita K., Kojima T., Nishiyama., Shimojoh M. *II Macromolec.* 2000. V. 33. N 13. P. 4711-4716.
298. Kulpinski P., Nishimura S., Tokura S. *II Advance in Chitin Sciences Proc. 7th Int. Conf. on Chitin Chitosan and EUCHIS-97.* Lyon, France / Ed.: A. Domard, G.A.F. Roberts, K.M. Varum, 1997. V. 2. P. 334-338.
299. Ouchi T., Murata J.-i., Ohya Y. *II Advance in Chitin Sciences. Proc. 7th Int. Conf. on Chitin Chitosan and EUCHIS'97.* Lyon, France ed A. Domard, G.A.F. Roberts, K.M. Varum, 1997. V. 2. P. 870-877.
300. Tommeraas K., Varum K.M., Christensen B.E., Smidsrod O. *II Abstracts of Int. Conf. 8th ICCS-4th APCCS 2000.* P. 92.

301. *Nurdin N., Francous N., Sidouni F., Descouts P. II Advance in Chitin Sciences / Proc. 7th Int. Conf. on Chitin Chitosan and EUCHIS(97) Lyon, France / Ed.: A. Domard, G.A.F. Roberts, K.M. Varum, 1997. V. 2. P. 378-383.*
302. *Sashiwa H., Shigemasu V., Roy R. // Macromolec. 2000. V. 33. N 19. P. 6913-6915.*
303. *Furuika T., Aiba S., Suzuki T. et al. // J. Chem. Soc. Perkin I. 2000. N 17. P. 3000-3005.*
304. *Tojima T., Katsura H., Han S.M. et al. // J. Polym. Sci. 1998. V. 36. N 11. P. p1965-1968.*
305. *Emmerling W.N., Pfannemuelle B. // Makromol. Chem.1983. B. 184. N 7. S. 1441-1458.*
306. *Cho Y-W., Han S.S., Ko S.-W. // Polymer. 2000. V. 41. N 6. P. 2033-2039.*
307. *Yamada K., Minoda M., Miyamoto T. // Macromolec. 1999. V. 32. N 11. P. 3553-3558.*
308. *Muzzarelli R. II Polymer Biomater N.-Y. 1994. P. 179-197.*
309. *Peter CM. II J. Macromol. Sci. 1995. V. A32. N 4. P. 629-640.*
310. *Gupta K.C., Kumar M.N.V.R. // J. Macromol. Sci. 2000. V. C40. N 4. P. 273-308.*
311. *Struszczyk H. II Chitin and chitosan (polish-russian monograph) / Ed.: Struszczyk H., Pospieszny H., Gamzazade A. 1999. P. 115-130.*
312. *Chitosan per os (from dietary supplement to drug carrier). / Ed.: R.A.A. Muzzarelli. Atec. Italy. 2000. 334 p.*

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ХИТОЗАН

Ю.М. Евдокимов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва
yevdokim@eimb.ru

Среди важных научных направлений быстро формирующихся в последние годы в области биомедицины, все более заметное место занимает направление, находящееся на стыке молекулярной биологии и медицины, которое получило название "генной терапии" [1]. Генная терапия это введение в организм больного специфических генных конструкций, имеющих заданные свойства. Лечебный эффект достигается либо в результате экспрессии введенного гена, либо за счет частичного или полного подавления функции "больного" гена. Важнейшим условием успешной генотерапии является обеспечение эффективной доставки, т.е. трансфекции (или трансдукции) требуемого гена в клетки-мишени, обеспечение длительного функционирования его в этих клетках и создание условий для полноценной работы гена. Трансфекцию проводят с использованием фрагмента "голой" ДНК (специфического гена), или фрагмента, встроенного в соответствующую плазмиду - "вирусного вектора". Вирусные векторы имеют много преимуществ в качестве носителей генов, что обусловлено их высокой эффективностью и широким рядом используемых клеток-мишеней. Однако такая система переноса гена имеет и целый ряд недостатков. Так ретровирусные векторы нестабильны и не способны инфицировать неделящиеся клетки. Кроме того, они содержат онкогены и, хаотически встраиваясь в геном хозяина, нарушают регуляторные элементы соседних генов, что может привести к нарушению метаболизма клетки, а также к активации онкогенов. Вирусные векторы могут индуцировать полный иммунный ответ той или иной силы. При этом нужно иметь в виду, что продажная стоимость создания вирусных векторов достаточно высока. Поэтому можно сказать, что безопасный и эффективный носитель генов по-прежнему остается критическим барьером на пути эффективной генетической терапии.

Как альтернатива вирусным векторам интенсивно исследуются и создаются не только "баллистические" [2] методы введения генов, но и невирусные системы или "невирусные векторы" [3]. Хотя эффективность и специфичность невирусных векторов на основе искусственных систем пока невысока, в настоящее время разработаны целые системы медиаторов трансфекции, которые обеспечивают достаточно эффективную и направленную доставку генов в различные ткани. Следует отметить, что трансфекция ДНК высокой молекулярной массы связана с проблемой конденсации (компактизации) ее молекулы. Так например, плазмиды слишком велики ($3-15 \times 10^3$ пар оснований), для того, чтобы легко преодолеть барьер клеточных мембран. Кроме того, "голая" ДНК нуждается в защите от деградации под действием эндогенных нуклеаз. Наконец, для эффективного проникновения ДНК через клеточные мембраны необходимо нейтрализовать отрицательный заряд ее фосфатных групп.

Для создания невирусных векторов используют, в частности, комплексы, образующиеся в результате взаимодействия ДНК с медиаторами трансфекции. Частицы таких комплексов имеют, как правило, микроскопические размеры, что, в принципе, должно способствовать проникновению этих частиц в клетку. Молекула ДНК в составе комплексов может быть защищена от действия нук-

леаз. Наиболее часто для трансфекции используют катионные полимеры, которые, нейтрализуя отрицательный заряд ДНК, способствуют ее конденсации (компактизации) и тем самым защищают ее от эндонуклеазной деградации.

Полилизин как медиатор трансфекции начали применять в конце 1980-х г. Затем в качестве невирусных систем транспортировки генов были использованы многие другие поликатионы. К ним относятся полиэтиленимин, полибрен и полиамидаминные дендримеры. Потенциальные преимущества этих систем очевидны - это легкость синтеза, возможность адресовки данной ткани (клетке), низкий иммунный ответ, возможность использования плазмид или молекул ДНК любой молекулярной массы. Ограничения на применение этих систем накладывают низкая эффективность трансфекции и плохая биосовместимость, даже несмотря на то, что эти системы кажутся удобными и безопасными при лечении заболеваний человека. Кроме того, многие катионные полимеры являются токсичными, что уменьшает потенциал их практического применения.

Чтобы преодолеть эти проблемы, в качестве систем переноса генов изучаются и создаются новые носители и модифицированные поликатионы.

Анализ литературных данных позволяет сформулировать несколько эмпирических требований к синтетическим или полусинтетическим невирусным поликатионным полимерным векторам, которые должны соблюдаться при создании новых систем транспорта генов: полимерный вектор должен быть биосовместимым (нетоксичным, не вызывать иммунной реакции) и биodeградируемым; он должен комплексоваться с ДНК с образованием частиц размером порядка 1000 Å, причем этот процесс должен быть воспроизводим; он должен защищать ДНК от деградации при транспорте в потоке биологической жидкости; он должен "донести" ДНК до клетки мишени в достаточной концентрации и, в идеале, он должен связаться с клеткой-мишенью.

В этой связи в качестве основы для создания невирусной системы переноса генов большой интерес вызывает применение такого природного поликатиона, как хитозан [4]. Он отличается низкой токсичностью, биodeградируемостью и хорошей биосовместимостью. Известно также, что хитозан подавляет рост большого числа бактерий. Он кроме того, усиливает межклеточный и окологклеточный транспорт через эпителий мукозных клеток. Молекула хитозана, несущая положительно заряженные аминокислотные группы, может образовывать комплекс с молекулой ДНК, фосфатные группы которой несут отрицательный заряд [5].

О возможности использования хитозана (Хи) в качестве невирусного вектора R. Murper с сотр. сообщили в 1995 г. и запатентовали этот результат в 1997 г. [6]. Для переноса генов Хитозан-ДНК-комплексы использовались в 1996—1999 гг. разными авторами [7-11]. С той же целью в 1996 г. исследован также модифицированный хитозан - триметилхитозан.

Заслуживает внимания упоминание о применении в качестве невирусного вектора хитозановых микросфер. Кольцевая и линейная ДНК, капсулированные в составе хитозановых микросфер, были применены в опытах *in vivo* [12-13]. Микросферы остаются стабильными по крайней мере в течение трех месяцев, причем микрокапсуляция существенно улучшает стабильность ДНК, что чрезвычайно важно при создании реалистической системы переноса генов. Кроме того, хитозанполифосфатные микросферы были использованы в качестве модели для выяснения природы взаимодействия хитозана с клетками. Следовательно, хитозан с его уникальной комбинацией биологических, физических и химических свойств вполне может соответствовать специфическому набору перечисленных выше требований, или, по крайней мере, большей их части.

Анализ литературы позволяет обратить внимание на два важных обстоятельства. Во-первых, несмотря на наличие патентов, свидетельствующих о принципиальной возможности успешного применения хитозана в качестве медиатора трансфекции, эффективность ее и в этом случае остается достаточно низкой, и причины этого в литературе не рассмотрены. Во-вторых, несмотря на отмеченные выше попытки использования комплексов хитозана с ДНК в практических целях, вопрос о том, что представляют собой такие комплексы с физико-химической точки зрения, остается открытым.

В настоящем обзоре рассмотрены данные, полученные в течение 1999-2001 гг., в результате совместных исследований, посвященных свойствам комплексов, образуемых между молекулами хитозана и линейными двухцепочечными молекулами нуклеиновых кислот принадлежащих к В- и А-семействам, которые выполнены сотрудниками Института молекулярной биологии РАН, Центра "Биоинженерия" РАН, Института кристаллографии РАН, РНЦ "Курчатовский Институт" и Института биофизики ГНЦ. Эти данные свидетельствуют, прежде всего, о том, что хитозан, взаимодействуя с молекулами двухцепочечных нуклеиновых кислот, переводит эти молекулы в жидкокристаллическое состояние, причем для этого состояния характерна множественность пространственных форм, определяемая такими факторами, как молекулярная (ММ) масса хитозана, число аминок групп в его молекуле, ионная сила и pH раствора и т.д.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали двухцепочечную ДНК эритроцитов цыплят "Reanal" и тимуса теленка "Sigma", молекулярная масса (ММ) которых после ультразвуковой деполимеризации составляла $(7-8 \cdot 10^5 \text{ Да})$, а также двухцепочечный синтетический полирибонуклеотид[поли(И) х поли(Ц)] "Sigma".

Препараты хитозана (Хи, сополимеры 2-амино-2-деокси-D-глюкозы и 2-ацетамидо-2-деокси-D-глюкозы) средней вязкостной молекулярной массы - 2,0; 4,1; 7,8; 13,6; 19,0 и 31,0 кДа (85% аминок групп) и разным содержанием аминок групп (46; 66; 75 и 85%) для препарата хитозана с ММ = 14,6 кДа были выделены и охарактеризованы в Центре "Биоинженерия" РАН.

Комплексы нуклеиновых кислот с хитозанами (НК-Хи) готовили, добавляя небольшие объемы исходного водного раствора препарата Хи к водно-солевому раствору НК при перемешивании. При титровании регистрировали спектры поглощения. "Критическую" концентрацию $C_{кр}$ любого из использованных хитозанов, т.е. концентрацию хитозана, необходимую для образования дисперсий комплексов ДНК-Хи, определяли по изменению формы спектров поглощения. Спектры поглощения комплексов НК-Хи регистрировали при помощи спектрофотометра "Specord M-40" в интервале $\lambda = 230-450 \text{ нм}$.

Исходные водные растворы дауномицина "Sigma" использовали без дополнительной очистки. Комплексы дауномицина с ДНК формировали, добавляя небольшие (1-10 мкл) объемы исходного раствора (по $\sim 2 \text{ мг/мл}$) к 2 мл дисперсии комплексов (ДНК-Хи) при перемешивании.

Теоретические расчеты оптических свойств дисперсий комплексов НК-Хи проводили, основываясь на подходе, описанном в работе [4].

Спектры кругового дихроизма (КД) комплексов НК-Хи регистрировали при помощи портативного дихрометра СКД-2 производства Института спектроскопии РАН, г. Троицк. Спектры КД представляли как зависимость кругового дихроизма ΔA от длины волны λ .

Получение образцов жидкокристаллических фаз комплексов НК-Хи, а также комплексов НК-антибиотик - Хи для рентгенографического анализа описано в работе [15]. Рентгенографические параметры, обычно используемые для описания кривых рассеяния такие, как размер "кристаллитов" L , "радиус взаимодействия" r_m и параметр "разупорядоченности" Δ/d оценивали по формулам, приведенным в работе [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Образование дисперсий. На рис. 1 приведены спектры поглощения, отражающие результаты титрования водно-солевого раствора ДНК ($V = 2$ мл; $C_{\text{ДНК}} \sim 15$ мкг/мл) небольшими порциями раствора Хи (1-4 мкл раствора Хи; $C_{\text{Хи}} = 2,5$ мг/мл).

При достижении "критической" концентрации Хи в спектре появляется поглощение в той области спектра ($\lambda > 320$ нм), в которой ни ДНК, ни Хи не поглощают ("кажущаяся" оптическая плотность, $A_{\text{каж}}$) и увеличивается поглощение при $\lambda \sim 260$ нм. Такие изменения формы спектра поглощения отражают формирование дисперсной фазы комплексов ДНК-Хи, на микроскопических частицах которой происходит рассеяние УФ-излучения. Зависимость "кажущейся" оптической плотности, измеренной при $\lambda, 340$ нм ($A_{\text{каж}}^{340}$), от концентрации Хи использованная для определения величины $C_{\text{кр}}$ (см. выделенный фрагмент на рис. 1). Экспериментальные зависимости, представленные ниже на рис. 1-13 получены для растворов со следующими параметрами: $C_{\text{ДНК}} = 15,5$ мкг/мл; $0,15\text{M NaCl} + 0,01$ М Na-фосфатный буфер; pH 6,86; 85% аминокрупп. $MM = 19$ кДа; величина ДА всюду дана в относительных единицах, причем 1 отн. ед. = 10^{-6} опт. ед. Величина $C_{\text{кр}}$ зависит от концентрации ДНК - чем выше концентрация ДНК, тем более высокой является величина $C_{\text{кр}}$. Аналогичные изменения в спектре поглощения [поли(И) x поли(Ц)] наблюдаются при титровании этого полинуклеотида раствором Хи; эти изменения также свидетельствуют об образовании дисперсии комплекса [поли(И) x поли(Ц)-Хи] (данные не показаны).

Таким образом, в водно-солевом растворе взаимодействие между молекулами Хи, несущими положительнозаряженные аминокруппы, и двухцепочечными линейными молекулами НК, несущими отрицательнозаряженные фосфатные группы, оказывается достаточным для образования дисперсных частиц, состоящих из молекул этих комплексов.

Спектры КД дисперсий. На рис. 2 приведен спектр КД исходной В-формы ДНК (кривая 1) и спектры дисперсий комплексов ДНК-Хи (кривые 2-6). При достижении "критической концентрации" Хи (см. фрагмент на рис. 2), в спектре КД в области поглощения ДНК ($\lambda \sim 270$ нм) появляется интенсивная (аномальная) положительная полоса.

Дисперсия комплекса [поли(И) x поли(Ц)-Хи], сформированная в условиях, соответствующих рис. 1 (т.е. при использовании препарата Хи, имеющего 85% аминокрупп и мол. массу 19 кДа), не имеет интенсивной полосы в спектре КД. Однако при изменении условий, в частности, при уменьшении до $MM_{\text{Хи}} = 2$ кДа, удается получить дисперсию, характеризуемую интенсивной (аномальной) отрицательной полосой в спектре КД в области поглощения поли(И) x поли(Ц) (рис. 3).

Сопоставление рис. 1 и рис. 2 показывает, что величины $C_{\text{кр}}$, определяемые при помощи разных методов, практически совпадают между собой. Это означает, что в данных условиях появление аномальной (положительной или

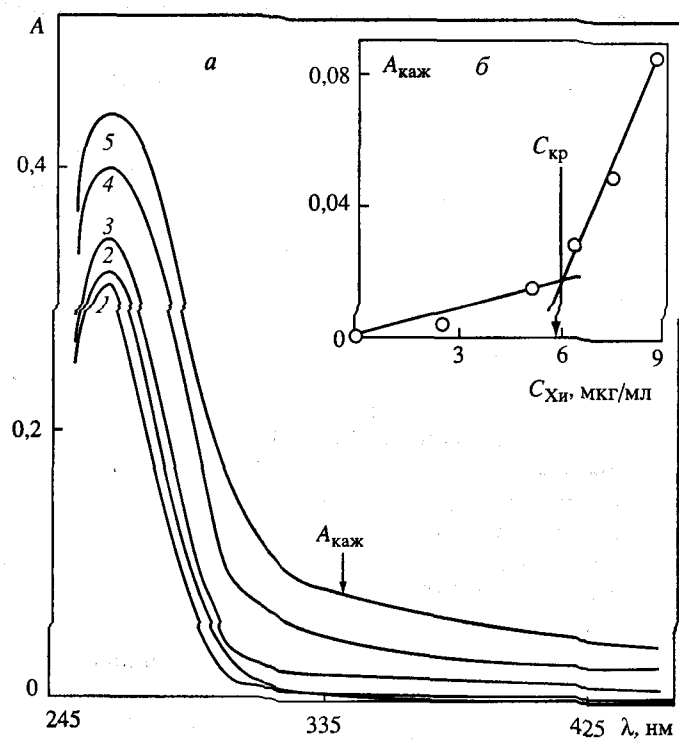


Рис. 1. Спектры поглощения (а) ДНК в отсутствие (кривая 1) и присутствии (кривые 2-5) Хи в растворе (кривые 2-5).

1-5 - 0; 2,5; 5; 7,5 и 8,75 мкг/мл Хи в растворе соответственно; б - зависимость "кажущейся" оптической плотности при $\lambda = 340$ нм от концентрации Хи в растворе

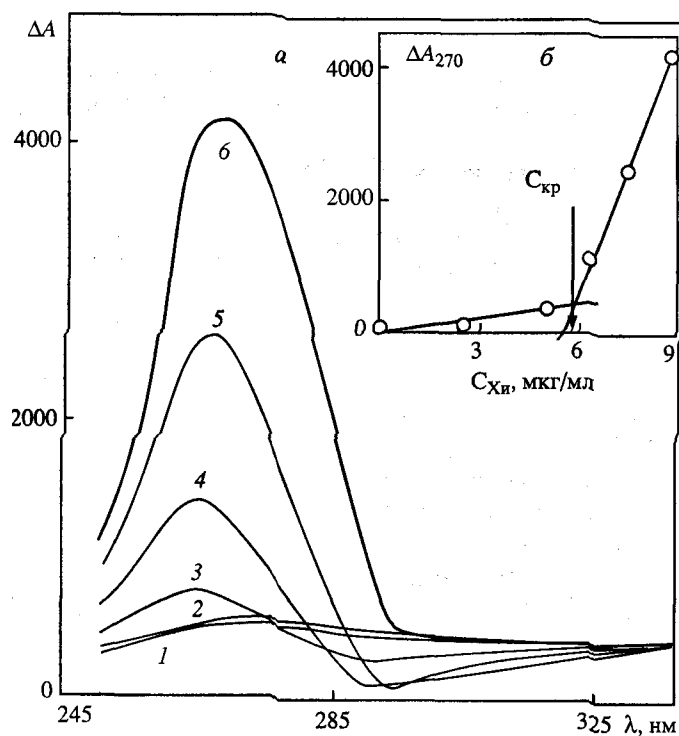


Рис. 2. Спектры КД (а) ДНК в отсутствие (кривая 1) и присутствии Хи в растворе (кривые 2-6)

1-6 - 0; 2,5; 5; 6,25 и 8,75 мкг/мл Хи в растворе соответственно; б - зависимость амплитуды полосы ($\lambda = 270$ нм) в спектре КД жидкокристаллических дисперсий комплексов ДНК-Хи от концентрации Хи в растворе

Рис. 3. Спектры КД (а) [полю(И) х поли(Ц)] в отсутствии (кривая 1) и присутствии X_{II} в растворе (кривые 2-5)

1-5 - 0; 134; 157; 181 и 204 мкг/мл X_{II} в растворе соответственно. $M = 2$ кДА; $C_{II} = 18$ мкг/мл; зависимость амплитуды полосы в спектре КД комплексов поли(И) х поли(Ц)- X_{II} при $\lambda = 270$ нм от концентрации X_{II} в растворе

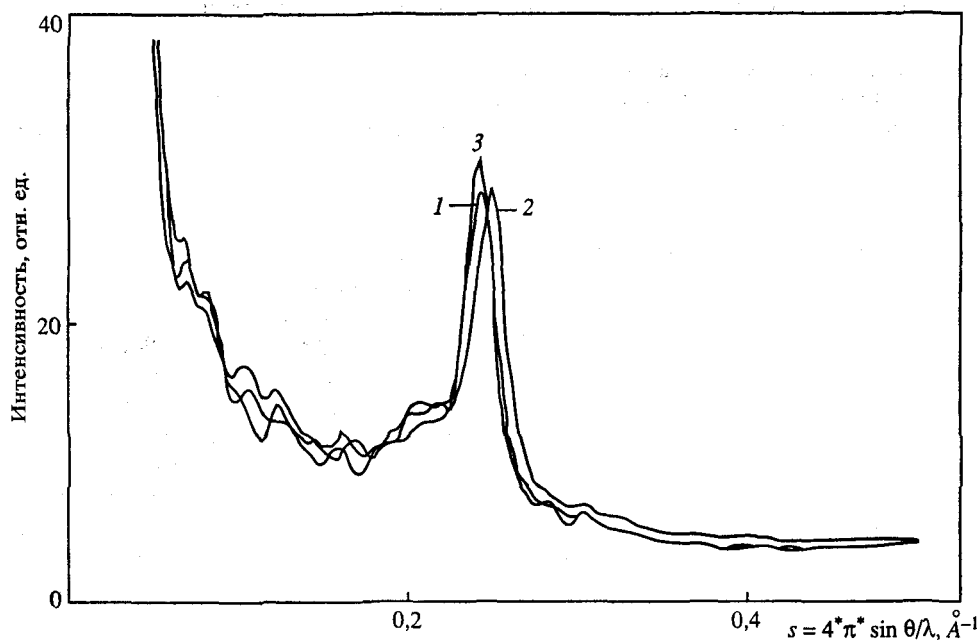
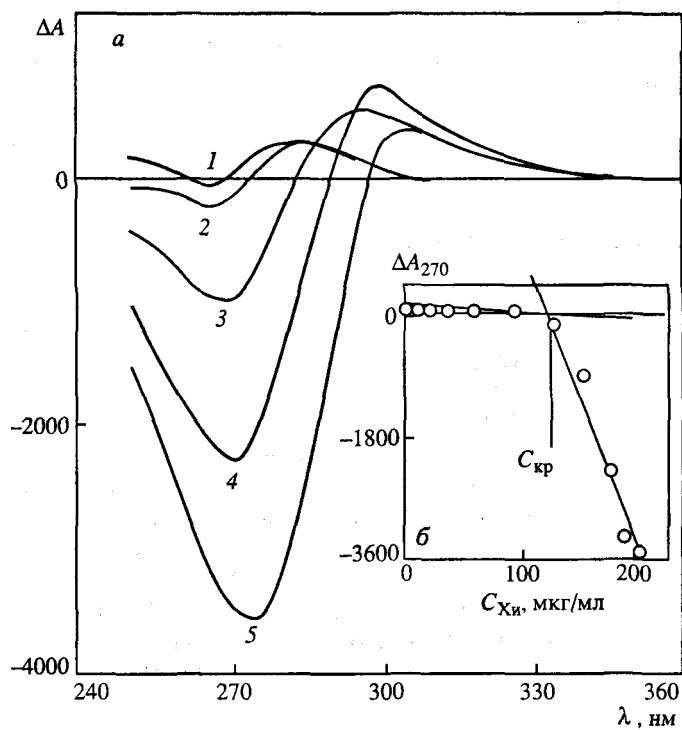


Рис. 4. Кривые малоуглового рассеяния рентгеновых лучей жидкокристаллической фазой комплекса ДНК- X_{II} при разных температурах

1 - 20 °C; 2 - 80 °C; 3 - препарат 2, охлажденный до 20 °C;

отрицательной) полосы в спектре КД происходит при тех же условиях, при которых образуются дисперсии ДНК или [поли(И) x поли(Ц)], рассеивающие УФ-излучение.

Теоретические вычисления спектров КД дисперсий ДНК [17] показывают, что интенсивная (аномальная) полоса в спектре КД, возникающая в области поглощения азотистых оснований этой макромолекулы, отражает, прежде всего, образование дисперсий, для которых характерна так называемая жидкокристаллическая упаковка соседних молекул ДНК. Более того, эта упаковка должна быть спиральной. Поэтому на основании спектров КД можно сказать, что в результате фазового исключения нуклеиновых кислот образуются жидкокристаллические дисперсии, для которых характерна спирально-закрученная (холестерическая) пространственная структура. "Классический" холестерик, образующийся при фазовом исключении линейных двухцепочечных правоспиральных молекул ДНК, принадлежащих к В-семейству полинуклеотидов [18], обладает аномальной отрицательной полосой в спектре КД, что, согласно результатам теоретических расчетов, свидетельствует о левой закрутке пространственной холестерической структуры частиц дисперсий. В нашем случае (см. рис. 2) аномальная положительная полоса в спектре КД связана с возникновением холестерической структуры частиц жидкокристаллической дисперсии, образованной из молекул комплексов ДНК-Хи. В отличие от "классических" холестериков, для холестериков ДНК-Хи характерна положительная полоса в спектре КД и, следовательно, правая закрутка пространственной структуры. С учетом этой точки зрения можно утверждать, что молекулы комплекса, сформированного между Хи и правоспиральными, двухцепочечными молекулами [поли(И) x поли(Ц)], принадлежащими к А-семейству, образуют в выбранных условиях холестерическую дисперсию, имеющую, также, как и "классические" холестерики ДНК, левую закрутку пространственной структуры.

Величина $\Delta\epsilon_{\text{макс}}$, характеризующая молярный круговой дихроизм, соответствующий максимальной амплитуде аномальной полосы в спектре КД жидкокристаллической дисперсии комплекса НК-Хи, не зависит от концентрации НК. В частности, в случае комплекса ДНК-Хи, амплитуда этой полосы ($\Delta\epsilon$), выраженная как $\Delta\epsilon_{270}$ (-85 отн. ед.), существенно превышает значение $\Delta\epsilon_{270}$ (~2 единицы), характеризующее молекулярную оптическую активность азотистых оснований в изолированных молекулах ДНК. Постоянство величины $\Delta\epsilon_{\text{макс}}$ в случае и других дисперсий НК-Хи, свидетельствует о том, что в использованных условиях частицы жидкокристаллической дисперсии комплексов НК-Хи имеют фиксированную пространственную структуру.

Представляло интерес сопоставить рентгенографические параметры фаз, полученных в результате концентрирования жидкокристаллических дисперсий комплексов НК-Хи, имеющих разную аномальную оптическую активность.

Рентгенографические параметры фаз. На рис. 4 приведены кривые рассеяния рентгеновых лучей фазой комплекса ДНК-Хи при температуре 20 °С (кривая 1) и 80 °С (кривая 2), и этой же фазы, охлажденной до 20 °С после нагрева (кривая 3). На кривых рассеяния фазы, сформированной в результате концентрирования частиц жидкокристаллической дисперсии комплекса ДНК-Хи, и имеющей положительную полосу в спектре КД, присутствует один четко выраженный Брегговский рефлекс. Величина этого рефлекса, а также рентгенографические параметры образованной фазы приведены в табл. 1.

Отсутствие высших порядков малоуглового рефлекса на рентгенограммах свидетельствует об отсутствии регулярного трехмерного порядка в расположении молекул комплексов ДНК-Хи, т.е. указывает на тот факт, что фаза не име-

Таблица 1. Рентгенографические параметры фазы, сформированной из комплекса ДНК-Хи

$T, ^\circ\text{C}$	$d_{\text{Br}}, \text{\AA}$	$\beta_s, \text{рад}$	$L, \text{\AA}$	$r_m, \text{\AA}$	Δ/d_{Br}
20	26,06	0,00584	264,115	416,891	0,100
	26,579	0,00989	155,975	246,203	0,131
40	25,804	0,00525	293,738	463,645	0,094
	25,323	0,01048	147,21	232,364	0,135
60	25,552	0,00523	295,119	465,821	0,094
	26,060	0,0093	165,419	261,105	0,126
70	23,315	0,00523	295,122	465,821	0,093
	26,06	0,0105	146,867	231,822	0,134
80	25,315	0,00582	265,236	418,65	0,098
	25,804	0,00991	155,593	245,593	0,130
20*	26,060	0,00525	293,735	463,645	0,095
	26,579	0,0093	165,852	261,793	0,127

Примечание. В числителе и знаменателе приведены значения с учетом и без учета коллимации пучка рентгеновского излучения соответственно. Звездочка означает, что приведенные значения получены для охлажденного образца.

ет идеальной кристаллической структуры. Это означает, что в расположении соседних молекул комплексов ДНК-Хи может существовать только "ближний", ориентационный порядок, характерный, в частности, для жидкокристаллических фаз.

Анализ данных, приведенных в табл. 1, позволяет выделить ряд важных обстоятельств. Во-первых, расстояние между соседними молекулами ДНК в образованной фазе ($D_{\text{int}} = 2d_{\text{Br}}/3^{1/2}$) составляет около 30 А. Во-вторых, это расстояние уменьшается при изменении температуры в пределах от 20 до 80 °С. В-третьих, при охлаждении до 20 °С величина малоуглового рефлекса полностью восстанавливается.

Представляют интерес данные рентгенографического анализа фаз, сформированных из молекул [поли(И) х поли(Ц)], связанных в комплексы с молекулами Хи, имеющими разную мол. массу. На рис. 5 приведены кривые рассеяния рентгеновых лучей фазой комплекса [поли(И) х поли(Ц)-Хи], связанного с Хи ММ = 19 кДа (кривые 7 и 2) и Хи ММ = 2 кДа (кривая 3). Видно, что на кривых 1 и 2, характеризующих фазы, не имеющие аномальной полосы в спектре КД, Брегговский рефлекс выражен чрезвычайно слабо. В то же время на кривой 3, характеризующей фазу, имеющую интенсивную отрицательную полосу в спектре КД (см. рис. 3), этот рефлекс присутствует. Величина рефлексов и рентгенографические параметры образованных фаз приведены в табл. 2. Брегговский рефлекс в случае фазы комплекса [поли(И) х поли(Ц)-Хи] приблизительно на 2 А отличается от соответствующего рефлекса в случае фазы комплекса ДНК-Хи. Приведенные в табл. 2 результаты свидетельствуют о том, что молекулы [поли(И) х поли(Ц)] упорядочены в обоих типах фаз, несмотря на наличие или отсутствие у них аномальной оптической активности. Таким образом, во всех случаях для комплексов НК-Хи действительно характерно упорядоченное, плотное, расположение соседних молекул.

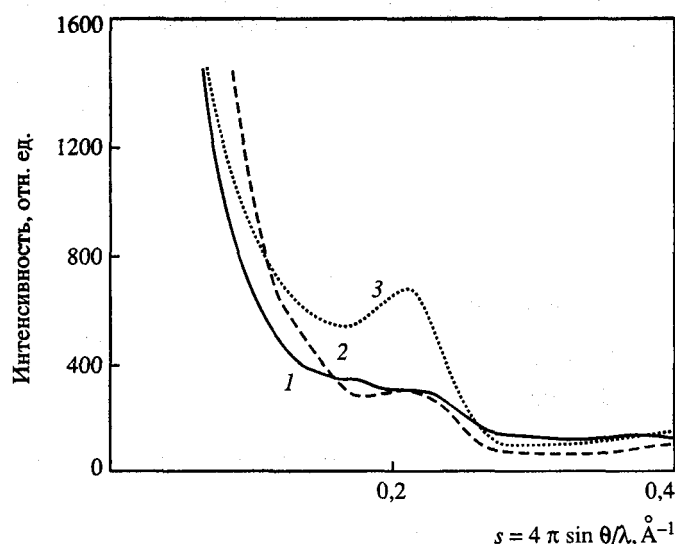


Рис. 5. Малоугловое рассеяние рентгеновых лучей жидкокристаллическими фазами комплексов [поли(И) × поли(Ц)]-Хи

1-3 - $C_{\text{Хи}} = 49,5$ 37,3 и 192 мкг/л соответственно; для 3 - $C_{\text{нц}} = 185$ мкг/л

Следует отметить, что в литературе имеется лишь несколько работ, в которых анализировались температурные изменения структурных параметров как "классических" холестерических фаз нуклеиновых кислот [19], образуемых в результате фазового исключения, так и фаз, образованных в результате комплексообразования НК с разными поликатионами [20]. Результаты этих работ показывают, что в случае "классических" холестерических фаз исходных двухцепочечных НК, изменение температуры сопровождается как увеличением расстояния между молекулами НК в холестерических фазах, так и заметными увеличением шага холестерической структуры [19, 21, 22]. Иная ситуация имеет место в тех случаях, когда фазы образованы в результате комплексообразования НК с различными соединениями. Небольшое уменьшение величины малоуглового рефлекса при нагревании фазы, образованной в результате комплексообразования ДНК с $\text{Mn}(\text{ClO}_4)_2$, обнаружено в работе [23]. Следует отметить также, что температура оказывает весьма незначительное влияние на параметры холестерической фазы, образуемой комплексом ДНК-спермидин [20].

Полученные выше результаты показывают, что температурное поведение фазы комплекса ДНК-Хи, весьма близко поведению фаз, образуемых другими комплексообразователями с ДНК. Это поведение отличается в двух отношениях от поведения "классических" холестериков, сформированных в результате фазового исключения молекул ДНК в ПЭГ-содержащих растворах. Во-первых, для холестерической фазы характерно расстояние между молекулами ДНК в пределах от 30 до 51 Å [24] и, во-вторых, для этой фазы характерно заметное (на 3-6 Å в зависимости от условий) увеличение расстояния между молекулами ДНК при росте температуры [22]. Малое изменение Брегговского рефлекса при увеличении температуры показывает, что фазы комплексов НК-Хи не являются столь "жидкими", как холестерические фазы "голой" НК. Такое отличие, в сочетании с небольшой величиной Брегговского рефлекса, позволяет предположить, что фазы комплексов НК-Хи имеют упаковку, соответствующую упаковке в переходной области между холестерической и гексагональной фазами [24].

Таблица 2. Рентгенографические параметры фазы, сформированной из комплексов
[поли(И) х поли(Ц)-Хи]

Образец	$T, ^\circ\text{C}$	$d_{Br}, \text{\AA}$	$\beta_s, \text{рад}$	$L, \text{\AA}$	$r_m, \text{\AA}$	Δ/d_{Br}
1 и 2-фаза комплекса [поли(И) х поли(Ц)- Хи] ММ = 19 кДа	20	27,441	0,00592	260,481	411,172	0,103
3-фаза комплекса [поли(И) х поли(Ц)- Хи] ММ = 2 кДа	20	28,595	0,01362	113,230	178,741	0,160

Примечание. Данные получены с учетом коллимации пучка рентгеновского излучения.

В этой связи интересным является сопоставление рентгенографических параметров фаз комплексов НК-Хи и аномальной оптической активности жидкокристаллических дисперсий. Анализ рентгенографических параметров, приведенных в табл. 1 и 2, показывает, что рентгенографические параметры фаз комплексов ДНК-Хи и [поли(И) х поли(Ц)-Хи] отличаются незначительно. В то же время для дисперсий этих комплексов характерна аномальная оптическая активность разного знака (см. рис. 2 и 3). Такое несоответствие показывает, что расстояние между молекулами НК в образующихся фазах само по себе не является достаточным критерием, определяющим направление пространственной закрутки соседних молекул в фазе.

Интересен вопрос о величине аномальной оптической активности, наблюдаемой в случае жидкокристаллических дисперсий комплексов НК-Хи. Если величина аномальной оптической активности связана (только) с расстоянием между молекулами НК в образующейся холестерической дисперсии [24], то следовало бы ожидать, что малому расстоянию между молекулами НК в образующейся фазе комплексов НК-Хи будет соответствовать малая аномальная оптическая активность. Как следует из рис. 2-3, аномальная оптическая активность фаз (ДНК-Хи и [поли(И) х поли(Ц)-Хи], хотя и меньше активности "классических" холестериков, однако она вполне с ней сопоставима. Учитывая тот факт, что аномальная оптическая активность наблюдается в полосе поглощения азотистых оснований, можно предположить, что при образовании жидкокристаллических дисперсий из комплексов НК-Хи некоторые диффузионные степени свободы как самих молекул НК, так и азотистых оснований по отношению к оси молекул НК, является более ограниченными по сравнению с их степенями в дисперсиях исходных молекул НК. Такое "замораживание" может быть результатом специфического взаимодействия Хи с молекулами (парами оснований) НК; оно приводит к увеличению средней аномальной оптической активности жидкокристаллических дисперсий комплексов НК-Хи, несмотря на малое расстояние между молекулами НК в частицах этих дисперсий.

Таким образом, можно предположить, что характер пространственной упаковки соседних молекул комплексов НК-Хи в жидкокристаллических дисперсиях связан не только (и не столько) с расстоянием между молекулами нуклиновых кислот.

С этой точки зрения было интересно определить влияние различных условий на эффективность образования жидкокристаллических дисперсий НК-Хи.

ОБРАЗОВАНИЕ ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ДИСПЕРСИЙ

Зависимость от молекулярной массы хитозана. На рис. 6 приведена зависимость величины $C_{кр}$ от молекулярной массы препаратов Хи, использованных для приготовления дисперсий НК. Видно, что при длине молекулы Хи с ММ 4 кДа эффективность образования комплексов как ДНК-Хи, так и [поли(И) х поли(Ц)-Хи] резко уменьшается, что сопровождается ростом концентрации Хи, необходимой для конденсации молекул этих полимеров.

Таким образом, существует определенный предел длины молекул Хи, начиная с которого комплекс НК-Хи образуется кооперативно.

Величины $C_{кр}$, необходимые для образования дисперсий комплексов ДНК-Хи и [поли(И) х поли(Ц)-Хи], мало отличаются друг от друга при использовании препаратов Хи одинаковой мол. массы. В частности, в случае ДНК (15 мкг/мл), величина $C_{кр}$ составляет около 6 мкг/мл, а в случае [поли(И) х поли(Ц)] (18 мкг/мл) - около 8 мкг/мл при использовании Хи с ММ 19 кДа.

Максимальная аномальная оптическая активность дисперсий комплексов ДНК-Хи и [поли(И) х поли(Ц)-Хи] по-разному зависит от молекулярной массы Хи (рис. 7). Рисунок показывает, что аномальная оптическая активность дисперсий комплексов ДНК-Хи существует в широком ряду значений $MM_{Хи}$, (кривая 1), тогда как область существования дисперсий, имеющих оптимальную оптическую активность в случае комплексов [поли(И) х поли(Ц)-Хи], является значительно более узкой (кривая 2).

Зависимость от pH растворов. Хитозан, будучи первичным полиамином, имеет $pK \sim 6,5$. При этом величина pK зависит от степени дезацетилирования Хи (содержания аминогрупп в молекуле хитозана) [25]. Представляло интерес определить прежде всего тот интервал значений pH , в котором Хи может образовывать комплексы с ДНК, способные к холестерической упаковке.

На рис. 8 приведена зависимость величин $C_{кр}$ и $\Delta\epsilon_{\max}$ для комплексов ДНК-Хи от pH растворов, использованных для приготовления жидкокристаллических дисперсий. Обращает на себя внимание тот факт, что максимальная амплитуда полосы в спектре КД возникает в растворе, имеющем $pH \sim 6,8$, что вполне соответствует величине pK хитозана в водно-солевом растворе. Это означает, что оптимальная холестерическая упаковка комплексов ДНК-Хи осуществляется при таких условиях, при которых степень ионизации Хи близка к 50%. Видно также, что имеется связь между степенью ионизации Хи, использованного для приготовления жидкокристаллической дисперсии, и аномальными оптическими свойствами частиц дисперсии.

"Критические" концентрации Хи (см. рис. 1), необходимые для образования комплексов ДНК-Хи, остаются практически неизменными в области $pH < 7$, однако при $pH > 7$ наблюдается резкое увеличение "критической" концентрации Хи. Характерен при этом тот факт, что при $pH \sim 8$, т.е. в условиях, при которых степень ионизации аминогрупп Хи невелика, измерения спектров поглощения свидетельствуют (данные не показаны) об образовании дисперсии комплекса ДНК-Хи, рассеивающей излучение, тогда как в спектрах КД никаких изменений не наблюдается ($\Delta\epsilon_{270} \sim 2$ отн. ед.).

Рис. 8 показывает, что существуют, как минимум, два семейства частиц жидкокристаллических дисперсий ДНК-Хи, различающихся по характеру пространственной упаковки молекул комплексов ДНК-Хи: для частиц первого семейства характерна аномальная положительная полоса в спектре КД, тогда как образование частиц второго семейства не приводит к изменениям в спектре КД. Можно отметить также, что имеется корреляция между степенью ионизации

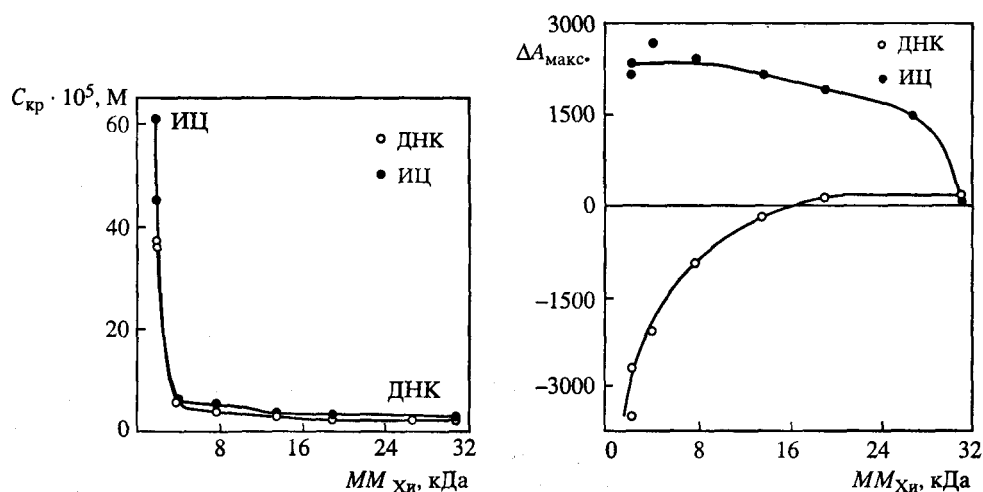


Рис. 6. Критическая концентрация $C_{кр}$, необходимая для образования жидкокристаллических дисперсий комплексов ДНК-Хи и [поли(И) х поли(Ц)]-Хи в зависимости от молекулярной массы препаратов Хи. Светлые точки - данные для ДНК, темные - данные для [поли(И) х поли(Ц)] $C_{кр}$ - см. рис. 1-3

Рис. 7. Максимальная амплитуда полосы в спектре КД ($\lambda = 270$ нм) жидкокристаллических дисперсий комплексов ДНК-Хи (кривая 1) и [поли(И) х поли(Ц)]-Хи (кривая 2) в зависимости от молекулярной массы Хи для $C_{иц} = 18$ мкг/мл; $C_{днк} = 15$ мкг/мл;

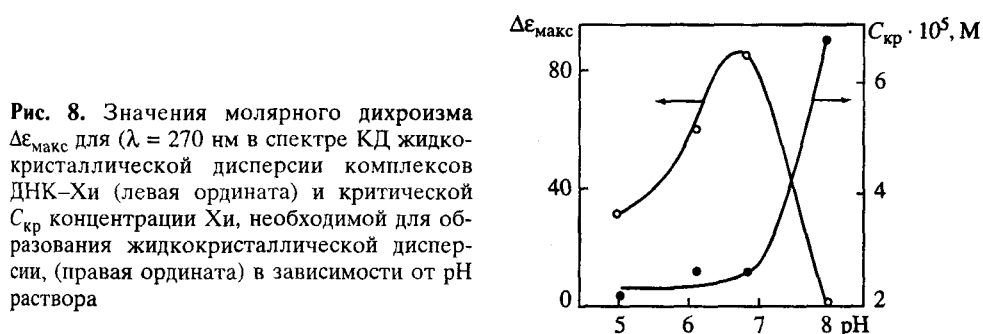


Рис. 8. Значения молярного дихроизма $\Delta \epsilon_{макс}$ для ($\lambda = 270$ нм в спектре КД жидкокристаллической дисперсии комплексов ДНК-Хи (левая ордината) и критической $C_{кр}$ концентрации Хи, необходимой для образования жидкокристаллической дисперсии, (правая ордината) в зависимости от pH раствора

молекул хитозана и способностью комплексов ДНК-Хи к образованию холестерических жидкокристаллических дисперсий.

Зависимость от ионной силы растворов. Величина $C_{кр}$, как было сказано выше, зависит от концентрации ДНК. Оказалось, что как и в случае других полиаминов, образующих комплексы с ДНК [26-29], существует сложная зависимость эффективности образования комплексов ДНК-Хи от свойств как молекул Хи, так и свойств растворителя (рис. 9). Величина $C_{кр}$, которая в случае полиаминокислот и полиаминов зависит от химической структуры использованного поликатиона, в случае Хи также зависит от химической структуры молекул Хи, использованных для комплексообразования, точнее, она зависит от содержания аминогрупп в препарате Хи ($MM_{Хи} 14,6$ кДа). Для каждого препарата Хи имеется определенный интервал ионной силы раствора, в пределах которого формируется комплекс ДНК-Хи, характеризуемый аномальной полосой в спектре КД. Выход за эти пределы со стороны растворов, имеющих

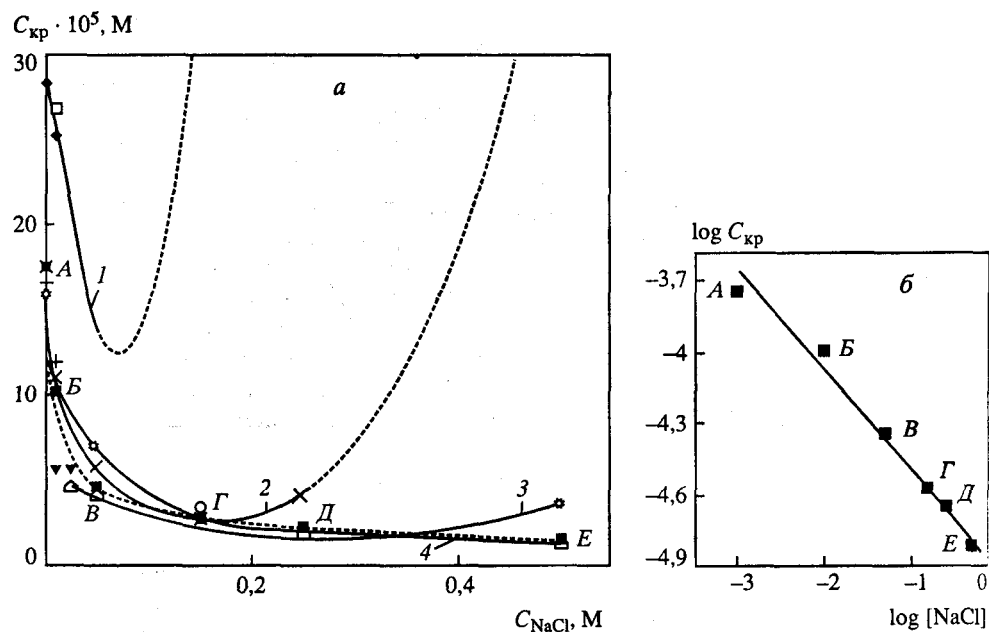


Рис. 9. Критическая концентрация (а) образцов Хи с разным содержанием аминокрупп в зависимости от концентрации NaCl в растворе

1-4-46; 66; 75 и 85% аминокрупп, соответственно; принималась равной $MM^{\wedge} \Gamma$ 212,66; 216,86; 218,75; и 220,85 Да мономерных единиц Хи соответственно; б- точки А - Е (усредненные значения $C_{кр}$ при соответствующей концентрации NaCl в растворе для Хи с содержанием аминокрупп от 66 до 85%) были использованы для построения зависимости $\log C_{кр}$ от $\log [NaCl]$

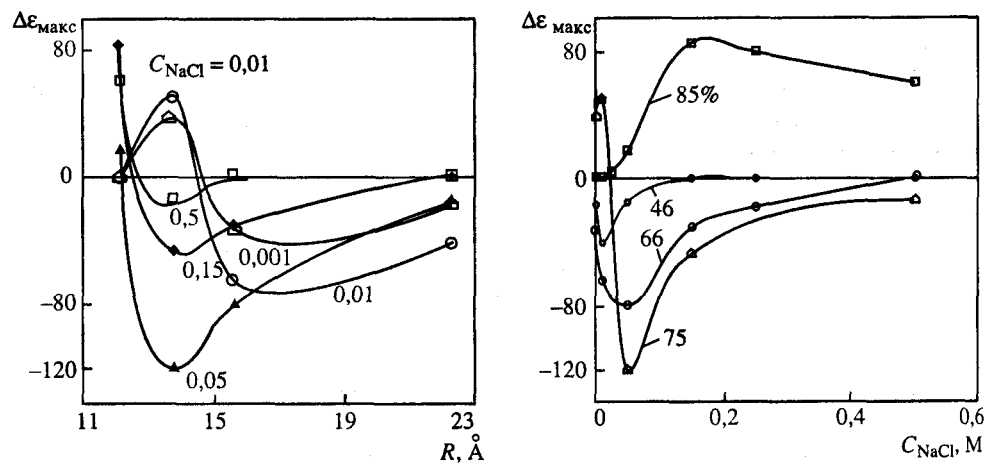


Рис. 10. Максимальная амплитуда полосы $X = 270$ нм в спектре КД жидкокристаллических дисперсий комплексов ДНК-Хи при различных C_{NaCl} в растворе Хи в зависимости от среднего расстояния R между аминокруппами

Рис. 11. Максимальная амплитуда полосы $\lambda = 270$ нм в спектре КД жидкокристаллических дисперсий комплексов ДНК-Хи для образцов Хи с различным содержанием NH_2 -групп в зависимости от концентрации NaCl в растворе

высокую ионную силу, приводит к тому, что жидкокристаллическая дисперсия комплекса ДНК-Хи, рассеивающая УФ-излучение, не образуется (см. рис. 9, правые части кривых 1-2). При очень низкой ионной силе растворов, однако, образуется такая дисперсия, для которой аномальная оптическая активность не характерна. В частности, в случае препарата Хи (85% аминокрупп) в растворе ионной силы меньше 0,02 дисперсия комплекса ДНК-Хи, рассеивающая УФ-излучение, образуется, однако в спектре КД никаких изменений не наблюдается. Аналогичная ситуация отмечена также в случае использования препарата Хи (46% аминокрупп) для приготовления дисперсий в растворе ионной силы 0,1.

Зависимость, приведенная на рис. 9, отражает полиэлектролитную природу образования комплекса ДНК-Хи, поскольку между величиной $\log(C_{кр})$, связанной с константой равновесия образования комплекса ДНК с Хи, и $\log(NaCl)$ имеется прямолинейная зависимость [27].

Зависимость аномальных оптических свойств жидкокристаллических дисперсий комплексов ДНК-хитозан от расстояния между аминокруппами в молекулах хитозана. На рис. 10 приведены зависимости величин $\Delta\epsilon_{\max}$ от расстояния между аминокруппами в молекулах Хи, использованных для приготовления дисперсий в растворах разной ионной силы. Среднее расстояние между аминокруппами в образцах Хи рассчитывали по соотношению $R(\text{\AA}) = 2(5,15 \times 100\%)/(\text{NH}_2)$, где 5,15 Å - расстояние между двумя соседними мономерными единицами Хи [21, 22]. Коэффициент 2 учитывает тот факт, что в силу стерических ограничений соседние аминокруппы Хи принимают участие в нейтрализации отрицательных зарядов фосфатных групп ДНК по типу "через одну"; NH_2 - процентное содержание аминокрупп в образце Хи.

Обращает на себя внимание тот факт, что аномальная оптическая активность является сложной функцией расстояния между аминокруппами в молекулах Хи и ионной силы растворов. Приведенные кривые показывают, что сочетание двух параметров, а именно, ионной силы и содержания аминокрупп, определяет возможность формирования двух типов холестерических жидкокристаллических дисперсий ДНК-Хи, характеризующихся или отрицательной, или положительной аномальной полосой в спектре КД. Кроме того, при определенном сочетании этих же параметров, можно формировать дисперсии, не обладающие аномальной оптической активностью, причем величина $\Delta\epsilon_{\max}$ обращается в нуль как при больших, так и при малых расстояниях между аминокруппами в молекулах Хи. Характерно при этом, что в растворах, имеющих очень низкую ионную силу (0,001 и 0,01), в которых формируются дисперсии комплекса ДНК-Хи, зависимости величины $\Delta\epsilon_{\max}$ от расстояния между аминокруппами Хи принадлежат к семейству, отличающемуся от семейства кривых, регистрируемых при более высокой ионной силе (от 0,05 до 0,5).

В этой связи представляет интерес зависимость амплитуды аномальной полосы в спектре КД от концентрации соли в растворе, которую можно построить на основании данных рис. 10. Приведенные на рис. 11 кривые характеризуют области существования холестерических жидкокристаллических дисперсий ДНК-Хи, сформированных из молекул Хи, имеющих разное содержание аминокрупп. Видно, что область существования холестерических дисперсий имеющих только положительную полосу в спектре КД для препарата Хи, содержащего 85% аминокрупп, является достаточно широкой. В то же время для препарата Хи, содержащего 46% аминокрупп, эта область является весьма узкой, причем при этом возникает холестерическая дисперсия, имеющая только отрица-

тельную полосу в спектре КД. Однако для препаратов Хи с 75%-ным содержанием аминокрупп можно формировать дисперсии, характеризующиеся как положительной, так и отрицательной полосами в спектре КД.

Таким образом, для жидкокристаллических дисперсий комплекса НК-Хи характерна множественность пространственных форм, зависящая от конкретных условий образования этих дисперсий. Упаковка молекул комплексов НК-Хи в частицах жидкокристаллических дисперсий зависит от двух фундаментальных параметров молекулы Хи: степени деацетилирования и степени полимеризации (т.е. от ММ). При этом конформация основной цепи Хи, тип и положение ионизируемых аминокрупп являются важными факторами, определяющими направление пространственной упаковки молекул НК-Хи в жидкокристаллических дисперсиях.

Об особенностях взаимодействия молекул хитозана с нуклеиновыми кислотами. На основании приведенных выше результатов и данных, известных из литературы [30, 31], можно попытаться рассмотреть некоторые молекулярные особенности взаимодействия Хи с молекулами НК.

Следует сразу же отметить, что комплексообразование между макромолекулами существенно отличается по своим характеристикам от образования комплексов между низкомолекулярными соединениями. Такое отличие обусловлено "полимерными эффектами", при которых достаточно стабильные комплексы образуются даже в том случае, когда энергия взаимодействия между макромолекулами невелика. Поэтому кажущаяся константа равновесия чрезвычайно высока, и реакция между макромолекулами, по существу, необратима. Комплекс между макромолекулами всегда более стабилен по сравнению с комплексом мономер-мономер или мономер-макромолекула. Изменение свободной энергии для макромолекулярных комплексов является функцией степени полимеризации, причем константа равновесия резко увеличивается при определенной критической длине полимерной цепи. В пользу образования именно такого комплекса между молекулами Хи и НК свидетельствует то, что D-глюкозамин (основной компонент Хи) не образует нерастворимого комплекса с НК. Кроме того, эффективность образования жидкокристаллических дисперсий НК резко зависит от ММ_{Хи} (см. рис. 6). Если принять, что "средняя" молекулярная масса мономерного звена Хи составляет около 200, то можно сказать, что начиная с длины молекулы Хи, эквивалентной (4000/200) 20 мономерным звеньям, т.е. около 100 Å [30, 31], Хи начинает кооперативно взаимодействовать с молекулами ДНК. (При таком расчете не учитывается тот факт, что в выбранных условиях (см. выше) лишь 50% аминокрупп Хи могут взаимодействовать с ДНК и, кроме того, в силу особенностей пространственной структуры молекул Хи [30, 31], с отрицательно-заряженными фосфатными группами ДНК могут взаимодействовать аминокруппы по типу "через одну".) Этот результат в принципе означает, что минимальный фрагмент двухцепочечной молекулы ДНК, который может образовать "нерастворимый" комплекс с Хи, должен содержать в своем составе около 30 пар оснований, что вполне согласуется с результатами оценок 15-20 других авторов [8], исследовавших осаждение молекул ДНК под действием Хи.

При начальном добавлении Хи, когда на молекулах НК имеется избыток отрицательно заряженных фосфатных групп, доступных для связывания с положительно заряженными аминокруппами Хи, взаимодействие Хи с ДНК сопровождается выделением тепла, что соответствует экзотермическому процессу [32]. Экзотермический процесс свидетельствует об образовании комплекса за счет электростатического взаимодействия между молекулами Хи и ДНК. Наличие электростатического вклада в механизм связывания Хи с ДНК может быть

проиллюстрировано по изменению константы связывания в присутствии одно-валентных солей. В этой связи интерес представляют данные, приведенные на рис. 9, относящиеся к образованию комплекса ДНК-Хи. Если принять, что величина $C_{кр}$ связана с константой равновесия образования комплекса ДНК с Хи, то следует ожидать, что зависимость $\log C_{кр}$ от $\log NaCl$ будет носить прямолинейный характер [25]. Действительно, в интервале ионных сил до 0,5 для препаратов Хи, имеющих в своем составе 66, 75 и 85% аминок групп, такая зависимость наблюдается (см. правую часть рис. 9). Однако на полученную прямую не ложатся точки, относящиеся к препарату Хи, имеющему 46% аминок групп. Это показывает, что конформация основной цепи Хи в сочетании с концентрацией (положением) ионизируемых аминок групп является важным фактором при образовании полиэлектрических комплексов этого аминоксахара с НК.

Экзотермический процесс вносит существенный вклад в свободную энергию взаимодействия Хи с НК. По мере того, как места связывания заполняются, эффективность выделения тепла уменьшается и, наконец, когда все места заняты, комплекс становится электронейтральным, и Хи более не связывается. Небольшой эндотермический эффект, наблюдаемый при соотношении зарядов 1:1,2 (-/+), можно рассматривать как указание на то, что преимущественной компонентой свободной энергии становится энтропия. Перестроение структуры молекул хитозана (и, возможно, НК) с последующим фазовым разделением и образованием дисперсии комплекса НК-Хи, обеспечивает энтропийную составляющую свободной энергии процесса взаимодействия Хи с НК.

Таким образом, в водно-солевом растворе обеспечиваются условия, в частности, осмотическое давление, при которых взаимодействие между молекулами Хи, несущими отрицательно заряженные аминок группы, и двухцепочечными линейными молекулами НК, несущими отрицательно заряженные фосфатные группы, оказывается достаточным для фазового исключения молекул образующихся комплексов НК-Хи, и образования дисперсных частиц, состоящих из молекул этих комплексов. Следует добавить, что согласно предварительным результатам, полученным методом атомной силовой микроскопии, эти частицы имеют форму, близкую к сферической и средний диаметр порядка 5000 Å.

Можно предполагать, что молекула Хи взаимодействует с НК таким способом, при котором аминок группы сахарных остатков Хи не только нейтрализуют отрицательные заряды фосфатных групп НК, но и создают специфическое распределение положительно заряженных аминок групп вблизи поверхности НК. Не исключено при этом, что молекулы Хи выполняют при этом две функции. Во-первых, они выполняют роль "сшивок", обеспечивающих плотную упаковку соседних молекул НК, и, во-вторых, они выполняют роль "среды", влияющей на характер и эффективность взаимодействия между соседними молекулами НК. Это означает, что существенный вклад в процесс взаимодействия Хи с НК (кроме ионного взаимодействия) может вносить конформация углеводной цепи молекулы Хи и она должна учитываться при создании рациональной теории, описывающей взаимодействие Хи с молекулами НК.

Способ распределения аминок групп сахарных остатков Хи на поверхности молекулы НК может определять характер взаимодействия соседних молекул НК при их сближении, а следовательно, и направление пространственной закрутки этих молекул в образующихся жидкокристаллических дисперсиях (фазах). О том, что характер распределения положительных зарядов вблизи поверхности молекулы НК влияет на оптические свойства дисперсий, свидетельствует тот факт, что дисперсия комплекса [поли(И) x поли(Ц)] с $MM_{Хи}$ 19 кДа не имеет аномальной оптической активности, тогда как дисперсия, сформиро-

ванная из этого полинуклеотида на основе $MM_{\text{Хи}}$ 2 кДа, такой активностью обладает.

Таким образом, конформация основной цепи Хи в сочетании с типом и положением ионизируемых групп является важным фактором при образовании частиц дисперсии, имеющих аномальную оптическую активность.

Интересен вопрос о временной стабильности оптических свойств жидкокристаллических дисперсий комплексов Хи с НК. Можно предполагать, что в силу пространственной структуры комплекса (НК-Хи), частицы жидкокристаллической дисперсии этих комплексов обладают некоторым электростатическим потенциалом, большим по сравнению с потенциальной энергией их Ван-дер-Ваальсова взаимодействия; и это обстоятельство может обеспечивать стабильность частиц по отношению к дальнейшей агрегации. Предположение требует дополнительной экспериментальной проверки.

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОЛЕКУЛ КОМПЛЕКСОВ (ДНК-ХИТОЗАН), ПРИВОДЯЩЕГО К ОБРАЗОВАНИЮ ЖИДКИХ КРИСТАЛЛОВ С РАЗНЫМИ ОПТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Согласно существующим в настоящее время теоретическим представлениям [33] упорядоченное расположение электрических диполей вдоль длинных осей спиральных молекул полимеров может влиять на свойства жидкокристаллической фазы (дисперсии), образующейся при фазовом исключении этих полимеров. При этом предполагается, что диполи перпендикулярны оси молекулы полимера и равномерно вращаются вокруг нее, образуя собственную спиральную структуру. Кроме того, молекулы полимеров обладают короткодействующим отталкивающим стерическим взаимодействием, благоприятствующим нематической упорядоченности соседних молекул полимеров в образующейся фазе, и диполь-дипольным взаимодействием, играющим роль возмущения, которое обуславливает появление спиральной закрутки фазы, т.е. приводит к появлению холестерической фазы. В зависимости от направления пространственной закрутки спиральная структура образующейся фазы характеризуется аномальной оптической активностью разного знака.

Известно, что конденсация комплексов, образующихся при взаимодействии двухцепочечных, жестких линейных молекул ДНК с полипептидами, имеющими разную химическую структуру и несущими положительно заряженные аминокислотные группы, приводит к образованию холестерических жидкокристаллических фаз (дисперсий). При этом они обладают разными знаками аномальной оптической активности [34]. Известно также, что в случае жидкокристаллических дисперсий ДНК, направление спиральной закрутки их холестерической структуры меняется при увеличении температуры или уменьшении диэлектрических свойств растворителя [35, 21], что на основании рассматриваемой теории можно объяснить нарушением баланса сил стерического отталкивания и дисперсионного взаимодействия спиральных сегментов этой молекулы. Направление пространственной закрутки холестерической структуры частиц жидкокристаллической дисперсии ДНК меняется и в том случае, когда для конденсации используют молекулы ДНК, предварительно связанные в комплекс с антибиотиками антрациклиновой группы [21]. В работе [36] предложен возможный механизм этого явления. Когда планарная молекула дауномицина (ДАУ) интеркалирует между парами оснований ДНК, на поверхности ДНК "остаются" заряженные аминокислотные группы сахарных остатков ДАУ. Поэтому вдоль длинной оси молекулы

кулы ДНК возникает спиральное распределение эффективных поперечных диполей, которое вносит дополнительный вклад в хиральное взаимодействие между молекулами ДНК. При определенных значениях среднего расстояния между соседними положительными зарядами, обусловленными наличием молекул ДАУ возникающий дополнительный вклад приводит к изменению направления спиральной закрутки образующейся холестерической структуры, образованной молекулами комплекса (ДНК-антибиотик).

Феноменологическое выражение для свободной энергии холестерического жидкого кристалла имеет следующий вид [33, 35]:

$$F_d = (1/2)K_{22}(n \operatorname{rot} n)^2 + \lambda(n \operatorname{rot} n), \quad (1)$$

где $n(r)$ - единичный вектор, задающий среднюю ориентацию длинных осей молекул, образующих жидкий кристалл; K_{22} - постоянная упругого кручения; λ - псевдоскалярный параметр, определяющий холестерический поворот и зависящий только от хиральной части потенциала взаимодействия между молекулами.

В случае холестерического кручения $n_x = \cos(z)$, $n_y = \sin \theta(z)$, $n_z = 0$ и минимум свободной энергии соответствует спиральному распределению директора $n(r)$ с шагом (P)

$$2\pi/P = \lambda/K_{22}. \quad (2)$$

В работе [36] показано, что для молекул ДНК, связанных с антрациклиновым антибиотиком, электростатическое взаимодействие между двумя заряженными спиральными структурами комплексов (ДНК-антибиотик) вносит следующий вклад в параметр λ :

$$\lambda_d = -(9/16)(d^4 \rho \sigma^2 L / kT) \exp(-2xR) R^{-6} \sin(2qb), \quad (3)$$

где $R = (R_0^2 + b^2)^{1/2}$; $d = r_0 e$; $q = 2\pi / p_s$; p_s - шаг спиральной структуры В-формы молекулы ДНК; r_0 - радиус молекулы ДНК; L - длина молекулы ДНК; ρ - число молекул ДНК в единице объема; σ - число ближайших соседей; R_0 - среднее расстояние между молекулами ДНК в образующейся фазе; b - среднее расстояние между соседними положительными зарядами молекул антибиотика.

Экспоненциальный член в уравнении (3) отвечает электростатическому экранированию отрицательных зарядов фосфатных групп ДНК противоионами, находящимися в растворе.

Шаг холестерической структуры жидкого кристалла ДНК определяется двумя факторами: параметром λ_d , зависящим от концентрации связанного антибиотика, которая влияет на величину B , и от вклада всех остальных хиральных взаимодействий между цепочками ДНК, т.е. от λ_0 .

$$2\pi/P = (\lambda_0 - \lambda_d)/K_{22}, \quad (4)$$

где P - шаг макроскопической спирали холестерической структуры, образованной молекулами ДНК.

При определенных значениях B величина $\lambda_0 - \lambda_d$ обращается в нуль, из-за чего спиральная закрутка холестерической фазы (дисперсии) комплекса (ДНК-антибиотик), исчезает, а следовательно, исчезает аномальная оптическая активность образующейся жидкокристаллической фазы (дисперсии). Более того, при определенных соотношениях между величинами λ_0 и λ_d возможно изменение знака исходной аномальной оптической активности холестерика. В работе [37] был отмечен эффект изменения знака полосы при конденсации молекул ДНК, связанных предварительно с увеличивающейся концентрацией антрациклиновых антибиотиков. (Следует отметить, что увеличение concentra-

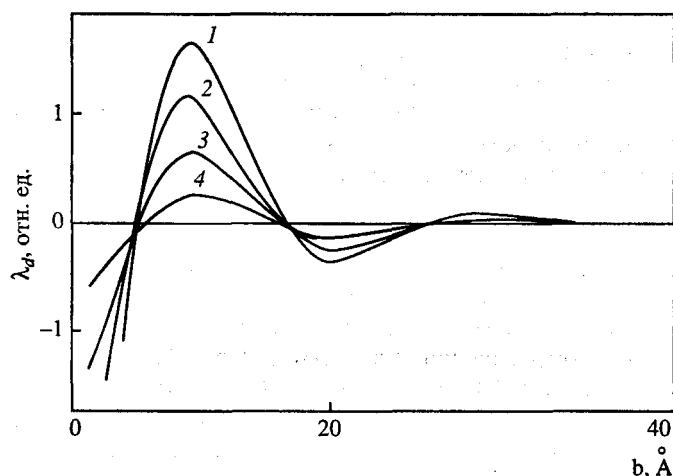


Рис. 12. Теоретические кривые изменения параметра λ_d , рассчитанные для холестерических дисперсий комплексов ДНК-Хи в зависимости от среднего расстояния, b , между положительно-заряженными аминок группами в молекулах Хи

ции антибиотика эквивалентно уменьшению расстояния между положительными зарядами на поверхности ДНК.)

Можно предположить, что аналогичный механизм имеет место и для системы (ДНК-Хи). Действительно, спиральные молекулы Хи содержат в своем составе аминок группы, несущие в использованных условиях ($pH \sim 7$) частичный положительный заряд. Однако в силу пространственных особенностей молекул Хи, аминок группы могут взаимодействовать с фосфатными группами ДНК по типу "через одну" [30, 31]. Это приводит к тому, что полимерные цепочки Хи взаимодействуя с ДНК, не только ориентируются вдоль длинной оси этой молекулы, но и образуют спиральную структуру электрических диполей. При определенном расстоянии b между заряженными аминок группами Хи, расположенными вдоль ДНК, соответствующее диполь-дипольное взаимодействие может компенсировать вклад дисперсионного хирального взаимодействия между молекулами ДНК. В этом случае направление пространственной закрутки спиральной структуры холестерической фазы (дисперсии) комплекса (ДНК-Хи) может измениться, что в свою очередь приведет к изменению знака аномальной оптической активности этой фазы (дисперсии).

Учитывая тот факт, что молекулярная масса ДНК, использованной в опытах по комплексообразованию с хитозаном составляла около $7 \cdot 10^5$ Да, что соответствует длине молекулы $L(3,5) \cdot 10^{-7}$ м; величина R_0 , оцененная при помощи рентгенографического анализа, составила $29 \cdot 10^{-10}$ м. Вычисления λ_d проводили для разных значений параметра x (определяемого ионной силой раствора) при следующих значениях остальных параметров (см. уравнение (3)): $p = 10^{25} \text{ м}^{-3}$; $r_0 = 10 \cdot 10^{-10} \text{ м}$; $a = 6$; $T = 25^\circ \text{C}$.

На рис. 12 приведены несколько теоретических кривых, рассчитанных для холестерических дисперсий комплексов (ДНК-Хи) в разных условиях. Кривые 1-4 соответствуют значениям параметра, x , рассчитанного, исходя из ионной силы растворов; кривая 1 - 0,1; кривая 2 - 0,105; кривая 3 - 0,115; кривая 4 - $0,13 \cdot 10^{-8} \text{ см}^{-1}$. Расчеты по уравнению (3) проводили при следующих значениях параметров: $r_0 = 10 \cdot 10^{-8} \text{ см}$ - радиус молекулы ДНК; $L = 3500 \cdot 10^{-8} \text{ см}$ - длина молекулы ДНК $R_0 = 29 \cdot 10^{-8} \text{ см}$ - среднее расстояние между молекулами ДНК в образующейся жидкокристаллической фазе комплекса (ДНК-хитозан) (неопубликованные данные); $d = r_0 - 4,803 \cdot 10^{-10} \text{ ед. СГСЕ}$; $p = 10^{19} \text{ см}^{-3}$ - число молекул ДНК в единице объема; $j = 1$; $\sigma = 6$ - число ближайших соседей у молекулы ДНК в жид-

кокристаллической фазе; $T = 298 \text{ K}$; $k = 1,38 \cdot 10^{-16} \text{ эрг/К}$; $q = 2(3,1315926/p_s)$; где $p_s = 34 \cdot 10^{-8} \text{ см}$ - шаг спиральной структуры В-формы ДНК.

Несмотря на тот факт, что как сама теория, использованная в работе [36], так и проведенные расчеты носят приближенный характер и не принимают во внимание такие параметры, как полимерная природа молекул Хи, возможное изменение конформации молекул хитозана в растворах разной ионной силы и т.д., из проведенного расчета вытекают несколько следствий положений.

1. Величина λ_d меняется при уменьшении расстояния между заряженными группами в молекуле Хи и При определенных расстояниях между заряженными группами в молекуле Хи величина λ_d обращается в нуль;

2. При уменьшении ионной силы растворов, в которых формируется холестерическая фаза комплекса ДНК-Хи, параметр λ_d увеличивается.

Если учесть, что параметр λ_d связан с шагом холестерической спиральной структуры согласно формуле (4), то уменьшение шага холестерической структуры дисперсии комплекса ДНК-Хи означает, что по мере уменьшения ионной силы раствора может происходить закрутка спирали холестерической структуры жидкого кристалла ДНК-Хи. В этом случае можно ожидать увеличения аномальной оптической активности этой структуры. Разумеется, что шаг холестерической структуры связан не только с величиной λ_d , но и величиной λ_0 (см. уравнение (4)). Поэтому очевидно, что теория еще не достаточно совершенна, чтобы с ее помощью предсказать знаки аномальной оптической активности холестериков образующихся из молекул комплексов ДНК-Хи, однако, вполне позволяет предсказать изменения аномальной оптической активности при изменении величины b или ионной силы растворов. Это открывает возможность для экспериментальной проверки приведенных выше следствий теории.

На рис. 10 были показаны экспериментальные кривые, характеризующие аномальную полосу в спектрах КД холестерических дисперсий комплексов ДНК-Хи, полученных в разных условиях. Из сопоставления приведенных кривых следуют несколько важных выводов:

Знак аномальной полосы в спектре КД холестерической фазы комплекса ДНК-Хи меняется при уменьшении величины b , т.е. расстояния между заряженными аминогруппами в молекуле Хи.

Если этот вывод является правильным, то он означает, что введение дополнительного числа заряженных групп в состав комплекса ДНК-Хи должно влиять на величину и даже знак аномальной полосы в спектре КД. Это положение может быть проверено экспериментально.

На рис. 13 приведены спектры КД дисперсий, образованных из комплексов ДНК-Хи (кривая 1) и этих же дисперсий, обработанных ДАУ (кривая 2, $18,5 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ ДАУ в растворе). Видно, что при концентрации Хи, превышающей

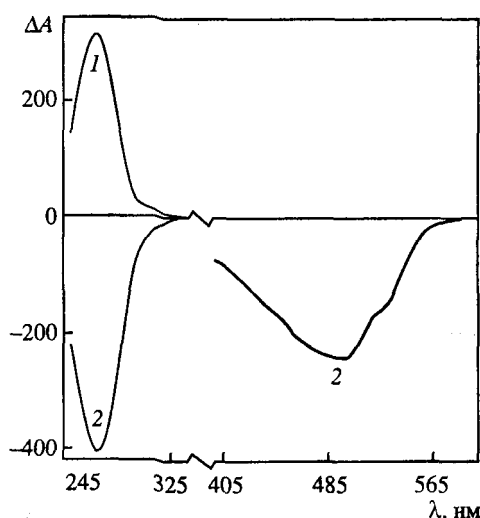


Рис. 13. Спектры КД жидкокристаллической дисперсии комплекса ДНК-Хи в отсутствие (кривая 1) и присутствии (кривая 2) ДАУ в растворе при:

$C_{\text{Хи}} = 9,98 \text{ мкг/мл}$ и $C_{\text{ДНК}} = 15,0 \text{ мкг/мл}$

$S_{кр}$, в спектре КД в области поглощения ДНК ($\lambda \sim 270$ нм) присутствует интенсивная положительная полоса, характерная для жидкокристаллической дисперсии этого комплекса. Однако, обработка дисперсии комплекса ДНК-Хи дауномицином, молекулы которого интеркалируют (встраиваются) между парами оснований ДНК, приводит не только к инверсии знака аномальной полосы в спектре КД - вместо положительного (см. рис. 13, кривая 1) знак полосы становится отрицательным (кривая 2), но и к появлению двух полос, расположенных в разных областях спектра КД. С учетом результатов теоретических расчетов [17] и полученных выше экспериментальных данных, можно сказать, что молекулы комплекса ДНК-ДАУ-Хи образуют холестерическую дисперсию, первоначальная, правая закрутка пространственной структуры которой меняется на левую при определенной степени интеркаляции молекул ДАУ между парами оснований ДНК. Следует при этом отметить, что, несмотря на изменение знака аномальной оптической активности, рентгенографические параметры фазы комплекса ДНК-Хи и фазы комплекса ДНК-ДАУ-Хи практически не различаются между собой. Следовательно, направление пространственной закрутки фазы комплекса ДНК-Хи не связано с величиной Брегговского рефлекса. Это означает, что интеркаляция молекул ДАУ, несущих положительнозаряженный аминосахарный остаток, между парами оснований ДНК в составе комплекса ДНК-Хи не оказывая влияния на расстояние между молекулами ДНК в образующейся дисперсии, может менять только характер распределения положительных зарядов вблизи поверхности ДНК. Результатом этого процесса является изменение положительного знака аномальной полосы в спектре КД на отрицательный.

В пользу правильности положения 1 свидетельствует также тот факт, что обработка ДАУ холестерической жидкокристаллической дисперсии (поли(И) х поли(Ц)-Хи) не вызывает никаких изменений ее аномальной оптической активности, поскольку молекулы ДАУ не могут интеркалировать между парами оснований этого полинуклеотида, а, следовательно, не могут влиять на характер распределения зарядов вблизи его поверхности.

При фиксированном расстоянии между аминогруппами, в частности при b равном 14 Å, уменьшение ионной силы растворов, в которых формируется холестерическая фаза комплекса (ДНК-Хи), сопровождается вначале увеличением амплитуды отрицательной полосы в спектре КД этой фазы с последующим изменением знака этой полосы при ионной силе около 0,02 (см. также рис. 11).

Этот результат вполне соответствует экспериментальным данным работы [37], согласно которым, чем меньше шаг холестерической структуры частиц жидкокристаллической дисперсии ДНК, тем выше амплитуда аномальной полосы в спектре КД.

Из комплексов (ДНК-Хи) при определенных условиях можно сформировать фазы, которые не имеют аномальной полосы в спектре КД.

Действительно, при формировании дисперсий из комплексов (ДНК-Хи) в растворах, имеющих $pH = 8$ (см. рис. 8), несмотря на появление "кажущейся" оптической плотности, форма полосы в спектре КД, характерная для исходной В-формы ДНК, не меняется и аномальная полоса в спектре КД в этих условиях не появляется. Этот факт интересен с двух точек зрения. Во-первых, он еще раз свидетельствует о том, что рассеяние само по себе не определяет появление аномальной полосы в спектре КД. Во-вторых, он показывает, что характер пространственной упаковки молекул комплексов (ДНК-Хи) в дисперсиях, связан с точным балансом сил взаимодействия между этими молекулами, причем в таком взаимодействии участвуют разные типы сил.

Таким образом, несмотря на приближенный характер проведенных расчетов, основные следствия теории [36] согласуются с экспериментальными результатами. Следовательно, существует множественность типов упаковки молекул комплексов (НК-Хи) в жидкокристаллических дисперсиях; кроме того, физико-химические свойства этих дисперсий легко меняются в ответ на изменение свойств как молекул Хи, так и свойств раствора, используемого для формирования этих дисперсий.

Приведенные в настоящем обзоре данные показывают, что взаимодействие Хи с линейными двухцепочечными молекулами НК зависит от многих факторов и приводит к образованию жидкокристаллических дисперсий комплексов (НК-Хи), которые обладают оптическими и рентгенографическими свойствами, отличающимися от свойств "классических" холестериков. Фактором управления пространственной структурой образующихся дисперсий является распределение положительных зарядов (расстояние между зарядами, конформация Хи и т.д.) в полимерной цепи молекулы Хи, взаимодействующей с молекулой НК. Такое взаимодействие обеспечивает не только нейтрализацию отрицательных зарядов фосфатных групп НК, но и позволяет "вводить" дополнительный положительный заряд в поверхностный слой молекулы НК, что, в свою очередь, определяет величину анизотропного вклада в свободную энергию взаимодействия соседних молекул НК.

В заключение можно сформулировать ряд направлений исследований, по которым могут проводиться работы, необходимые для создания эффективной системы трансфекции на основе молекул Хи:

1. Целесообразным представляется изучение возможности перехода плазмидных (кольцевых, замкнутых) молекул ДНК, т.е. тех молекул, которые наиболее часто используются для трансфекции, в жидкокристаллическое состояние при образовании комплексов с Хи, а также особенностей этого состояния в случае плазмидных ДНК.

2. Большой интерес представляет вопрос о том, зависит ли эффективность трансфекции при помощи комплексов Хи-ДНК от того, имеют ли частицы этого комплекса упорядоченную, в данном случае, жидкокристаллическую, или аморфную структуру. Интерес представляет также изучение трансфекции при помощи комплексов, имеющих разную закрутку холестерической пространственной структуры.

Очевидно, что зависимость эффективности перехода молекул ДНК в жидкокристаллическое состояние от многих факторов, делает затруднительным сопоставление результатов, получаемых в работах разных авторов. Это означает, что при выборе условий трансфекции, необходимо учитывать свойства образующихся жидкокристаллических дисперсий комплексов Хи с ДНК, кроме того, целесообразно, чтобы сами условия трансфекции были стандартизованы.

Можно добавить, что факт зависимости оптических свойств жидкокристаллических дисперсий комплексов (НК-Хи) от целого ряда параметров открывает возможность для использования оптических свойств этих дисперсий в качестве теста качества (включая определение временной стабильности) препаратов Хи перед их применением в медицинских или биотехнологических целях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Генная терапия - медицине будущего / Под ред. А.В. Зеленина. М.: ВИНТИ. 2000. 135 с.
2. Колесников В.А., Зеленина И.А., Семенова М.Л. и др. Баллистическая трансфекция клеток млекопитающих *in vivo* // Онтогенез, 1995. Т. 26. С. 476-480.
3. Подобед О.В., Жданов Р.М. // Вопр. биол. мед. и фарм. химии. 1999. № 4. С. 7-15.

4. Paul W., Sarma C.R. // S.T.P. Pharma sciences. 2000. V. 10. P. 5-22.
5. Richardson S.C.W., Kolbe H.V.J., Duncan R. // Int. J. Pharmaceutics, 1999. V. 178. P. 231-243.
6. Murper R.J., Rolland A. Chitosan-related compositions and methods for delivery of nucleic acids into a cell. PCT Int. Appl. 1997. WO 9742975.
7. Hayatsu H. Water-insoluble nucleic acid-chitosan complexes and their preparation. 1996. Appl. JP 96-254004.
8. Hayatsu H., Kubo T., Tanaka Y., Negishi K. // Chem. Pharm. Bull. 1997. V. 45. P. 1363-1368.
9. Kolbe H. PCT Int. Appl. 1998. WO 9817693.
10. Erbacher P., Zou S., Bettinger T. et al. // Pharm. Res. 1998. V. 15. P. 1332-1339.
11. Roy K., Mao H-Q., Huang S-K., Leong K.W. // Nature Medicine. 1999. V. 5. P. 387-391.
12. 1998. Pat. 57 44166. US G01 N21/00.
13. Aral C. Ozbas-Turan S., Kabasaki L. et al. // S.T.P. Pharma sciences, 2000. V. 10. P. 83-88.
14. Евдокимов Ю.М., Салянов В.И., Семенов С.В. и др. // Мол. биол. 2002. Т. 36. № 3. С. 532-541.
15. Евдокимов Ю.М., Салянов В.И., Скуридин С.Г., Дембо А.Т. Там же. 2002. Т. 36. № 4. С. 706-714.
16. Skuridin S.G., Badaev N.S., Dembo A.T. et al. // Liq. Crystals. 1988. V. 3, P. 51-62.
17. Belyakov V.A., Orlov V.P., Semenov S.V. et al. // Ibid. 1996. V. 20. P. 777-784.
18. Livolant F., Leforestier A. // Progr. Polym. Sci. 1996. V. 23. P. 1115-1164.
19. Strzelecka T.E., Rill R.L. // J. Am. Chem. Soc. 1987. V. 109. P. 4513-4518.
20. Pelta J., Durand D., Doucet J., Livolant F. // Biophys. J. 1996. V. 71. P. 48-63.
21. Yevdokimov Yu.M., Skuridin S.G., Lortkipanidze G.B. // Liq. Crystals. 1992. V. 12. P. 1-16.
22. Yevdokimov Yu.M., Skuridin S.G., Salyanov V.I. // Ibid. 1988. V. 3. P. 1443-1459.
23. Rau D.C., Parsegian V.A. // Biophys. J. 1992. V. 61. P. 260-271.
24. Евдокимов Ю.М., Скуридин С.Т., Семенов С.В. и др. // Биофизика. 1998. Т. 43. С. 240-252.
25. Domard A. // Int. J. Biol. Macromol. 1987. V. 9. P. 98-104.
26. Ong E.C., Snell C., Fasman G.D. // Biochemistry. 1976. V. 15. P. 468-476.
27. Manning G.S. // Quarterly Reviews of Biophysics. 1978. V. 11. P. 179-246.
28. Raspaud E., Olivera de la Cruz M., Sikorav J.-L., Livolant F. // Biophysical J. 1998. V. 74. P. 381-393.
29. Saminathan M., Antony T., Shirahata A. et al. // Ibid. 1999. V. 38. P. 3821-3830.
30. Okuyama K., Noguchi K., Miyazawa T. et al. // Macromolecules. 1997. V. 30. P. 5848-5855.
31. Cairns P., Miles M.J., Morris V.J. et al. // Carbohydrate Research. 1992. V. 235. P. 23-28.
32. MacLaughlin F.C., Murper R.J., Wang J. et al. // J. Controlled Release. 1998. V. 56. P. 259-272.
33. Kim Y.H. // J. Physique. 1982. V. 43. P. 559-565.
34. Ong E.C., Snell C., Fasman G.D. // Biochemistry. 1976. V. 5. P. 486-476.
35. Osipov M.A. // III nuovo cimento. 1988. V. 10. P. 1249-1262.
36. Samori B., Osipov M.A., Domiani L., Bartolini A. // Int. J. Biol. Macromol. 1993. V. 15. P. 353-359.
37. Евдокимов Ю.М., Салянов В.И., Скуридин С.Т., Бадаев Н.С. // Мол. биол. 1995. Т. 29. С. 180-191.

КОЛЛОИДНЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ ХИТИНА И ХИТОЗАНА. ТЕОРИЯ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

В.Г. Бабак

Институт элементоорганических соединений, ИНЭОС РАН Москва
babak@ineos.ac.ru

Производные хитина и хитозана считаются перспективными биоматериалами будущего. По некоторым оценкам, предполагаемый объем производства издел из этих биополимеров в 2005 г. составит \$ US ~2 млрд, из которых -75% будет использовано в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности, а также в биотехнологии, сельском хозяйстве и др. [1,2]. Для России, обладающей значительными ресурсами ракообразных для производства хитина (крабы, креветки, криль, гаммарус и др.), практическое использование производных хитина имеет особое значение [3].

Интерес к хитину и хитозану связан с их уникальными физиологическими и экологическими свойствами такими как биосовместимость, биодеструкция, физиологическая активность при отсутствии токсичности, способность к селективному связыванию тяжелых металлов и органических соединений и др. [1]. Для полномасштабного использования производных хитина в различных производствах необходимо, с одной стороны, иметь представление о коллоидных свойствах этих биополимеров в смешанных растворах с другими компонентами (например, с ПАВ) и, с другой стороны, уметь управлять этими свойствами для достижения оптимального технологического эффекта. К коллоидным свойствам полимеров мы относим прежде всего их способность к адсорбции на межфазных поверхностях различной природы, стабилизирующую способность по отношению к дисперсным системам (эмульсиям, пенам, суспензиям), а также структурообразование (агрегирование, мицеллообразование, гелеобразование) в различных физико-химических условиях.

Для увеличения растворимости хитина и хитозана в водных средах используют N- и O-карбоксиметилирование [4-6], и сульфатирование [7], что делает удобным их использование и расширяет области практического применения [8-13]. Гидрофобное модифицирование водорастворимых производных хитина и хитозана путем ковалентного присоединения алкильных или других гидрофобных функциональных групп [14-16] (рис. 1), придает этим полиэлектролитам амфифильные свойства, т.е. делает их поверхностно-активными.

Особый интерес для практических приложений имеет свойство водорастворимых анионных и катионных производных хитина и хитозана образовывать динамические ассоциаты с противоположно заряженными молекулами ПАВ в смешанных водных растворах [17-19]. Такие ассоциаты - так называемые ПАВ-полиэлектролитные комплексы (ПАВ-ПЭК), характеризуются аномально высокой (по сравнению с образующими их компонентами) межфазной активностью и стабилизирующей способностью по отношению к эмульсиям и пенам [17, 20-21]. Тонкое регулирование коллоидных свойств гидрофобизованных производных хитина и хитозана, а также их ПАВ-ПЭК, может быть осуществлено изменением длины алкильных радикалов и степени алкилирования, а также выбора оптимальных ПАВ и их концентрации в смешанных растворах [23-25].

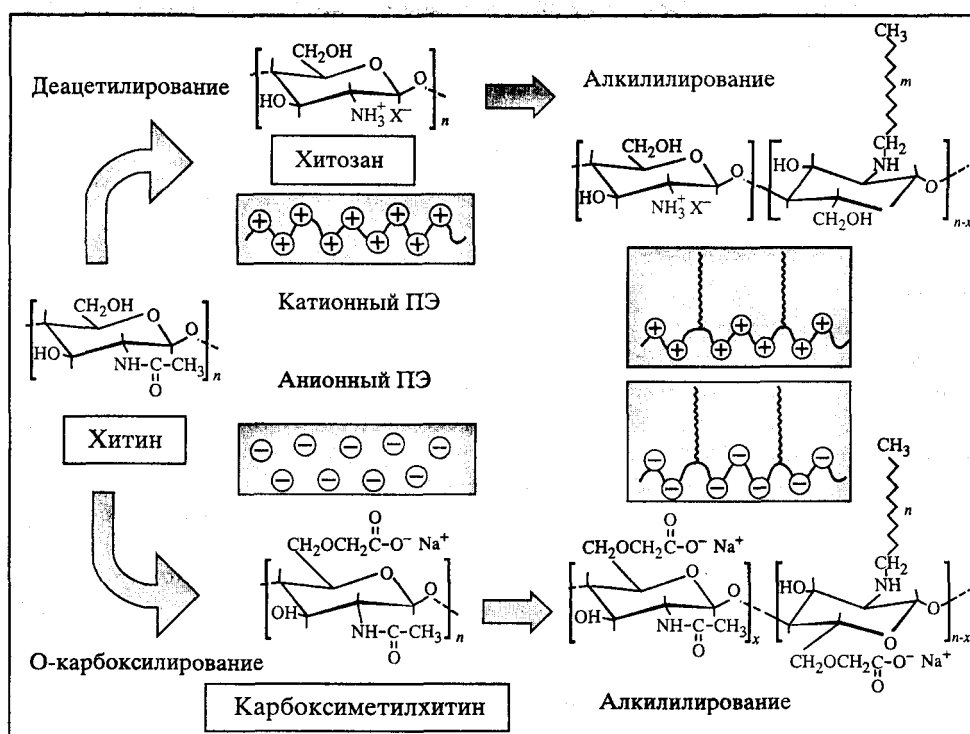


Рис. 1. Водорастворимые продукты химической модификации хитина

Большой интерес для микрокапсулирования биологически активных веществ представляет способность гидрофобно-модифицированных производных хитина и хитозана образовывать физические гели с высокоупорядоченной внутренней наноструктурой мицелярного типа [26-27]. Такие гелеподобные материалы могут найти применение в медицине для производства носителей лекарственных средств, ферментов и генетического материала пролонгированного действия [28-29].

В данном обзоре изложены коллоидные аспекты образования и свойств ПАВ-полиэлектrolитных комплексов на основе производных хитина и хитозана в связи с их применением в косметике, биотехнологии, медицине и др.

ОБРАЗОВАНИЕ И СВОЙСТВА ПАВ-ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Образование (ПАВ-ПЭК) между производными хитина и ПАВ в смешанных водных растворах имеет большое значение для различных практических приложений. Например, свойство хитозана - катионного производного хитина, - связывать свободные жирные кислоты при низких pH с образованием нерастворимых комплексов позволяет применять его в качестве "поглотителя жира" в пищевых добавках [1], для рафинирования пищевых жидкостей [30], очистки сточных вод пищевых производств [31] и др. [32].

Согласно сложившимся представлениям, процесс образования ПАВ-ПЭК в смешанных водных растворах противоположно заряженных макроионов поли-

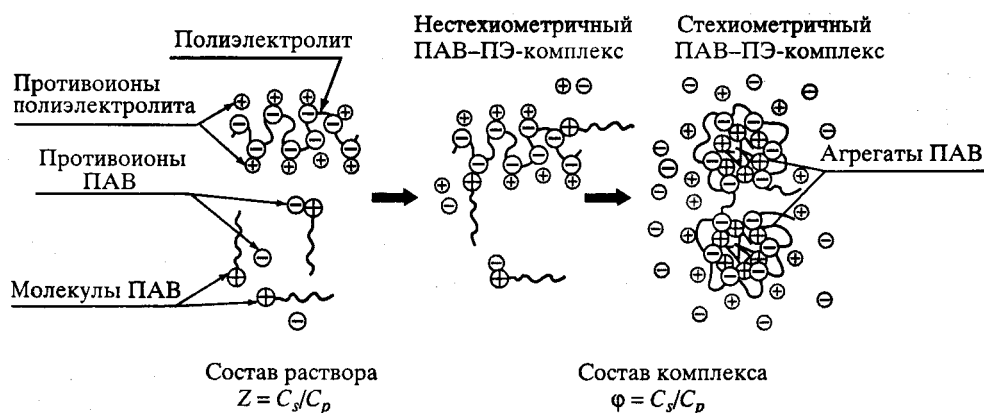


Рис. 2. Комплексообразование в смешанных растворах ПАВ и полиэлектролита

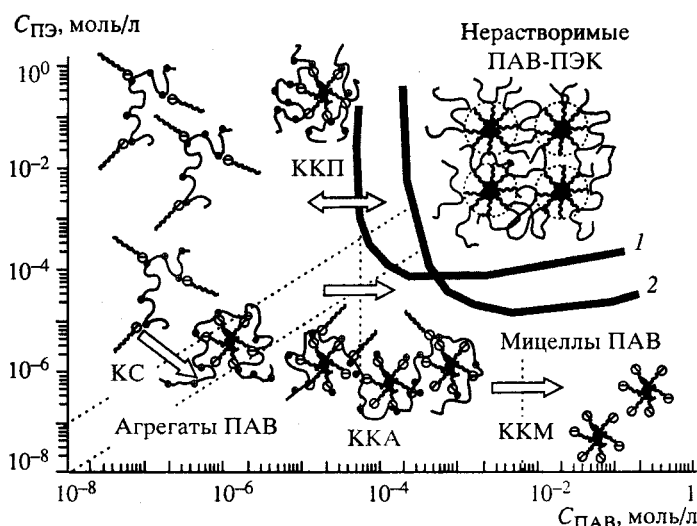


Рис. 3. Границы фазового разделения в смешанных растворах ХТЗ-ДДСН (1) и КМХТ-ЦПХ (2) [17, 49, 50]

электролита (ПЭ) и ионов ПАВ (рис. 2) является кооперативным, что обусловлено определяющей ролью гидрофобных взаимодействий между молекулами ПАВ, образующих агрегаты (мицеллоподобные кластеры), связанные с макромолекулярной цепью [33-42].

Аналогично критической концентрации мицеллообразования (ККМ) в индивидуальных растворах ПАВ, агрегирование в смешанных растворах с образованием стехиометричных по заряду комплексов происходит при критической концентрации агрегирования (ККА или $C_{сac}$), которая в 10-100 раз меньше ККМ (рис. 3). При этом, как правило, образуются нерастворимые стехиометричные ПАВ-ПЭК, которые выпадают (преципитируют) в осадок при критической концентрации преципитации (ККП). При увеличении гидрофобности полиэлектролита кооперативность агрегирования снижается [43-47], что приводит к образованию нестехиометрических ПАВ-ПЭК. Одним из доказательств образования нестехиометрических нерастворимых ПАВ-ПЭК в лабораторном масштабе времени является плавное изменение электрокинетического потенциала агрегатов, измеренного методом электрофореза [48] (рис. 4).

Количественное описание взаимодействия между ионным ПАВ и полиэлектролитом в смешанных растворах основано на рассмотрении термодинамических моделей агрегирования молекул ПАВ в присутствии макроионов и проти-

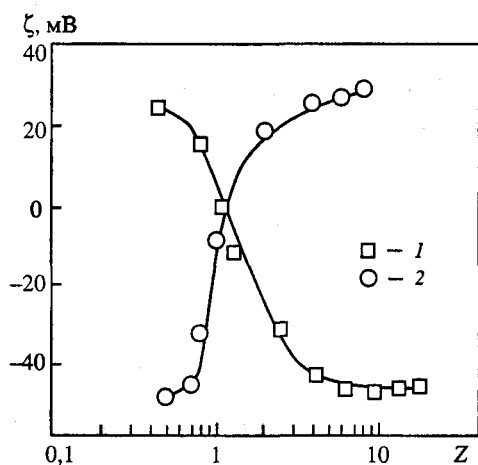
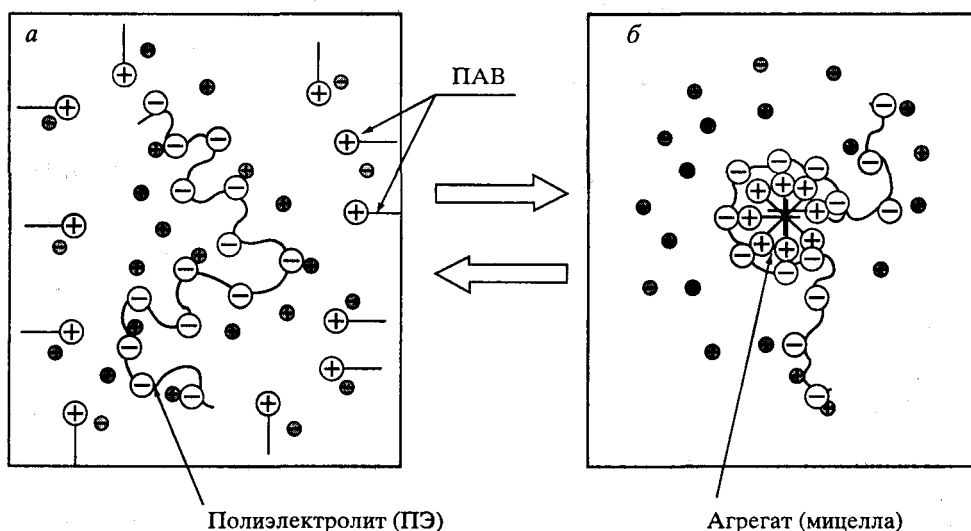


Рис. 4. ξ -потенциал в зависимости от состава смеси ХТЗ-ДДСН (1) и КМХТ-ЦПХ (2) ($C_{ПЭ} = 10^3$ осново · моль/л) [48]

Рис. 5. Термодинамический процесс агрегирования молекул ПАВ в смешанном растворе с противоположно заряженным полиэлектролитом



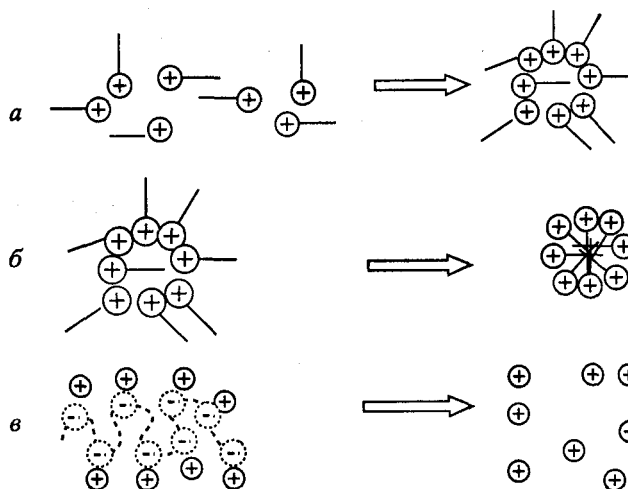
воинов в растворе [40-42, 51, 52]. Эти модели основаны на рассмотрении различных энергетических вкладов в свободную энергию комплексообразования ΔG в системах ПАВ-полиэлектролит, отличаясь деталями учета относительно вклада различных механизмов взаимодействия в таких системах (рис. 5). Целью таких моделей является объяснение влияния различных физико-химических параметров (концентраций ПАВ - C_s ("s" - surfactant) и ПЭ - C_p , pH раствора и концентрации электролита - C_{salt} , строения макромолекул ПЭ и ПАВ, например, длины алкильного радикала, и др.) на критическую концентрацию агрегирования C_{cac} ("cac" - critical aggregation concentration), в смешанном ПАВ-ПЭ-растворе.

Свободная энергия ΔG образования одного агрегата (мицеллы) из N молекул ПАВ в смешанном ПАВ-ПЭ-растворе определяется вкладом различных взаимодействий (рис. 6)

$$\Delta G = -kTN \ln(c_{cac}/c_w) - \psi Nn + kT \gamma N \ln((fC_p + C_{salt})/C_w) + \Delta G_{cor}, \quad (1)$$

где c_w и C_{salt} - концентрации молекул воды и электролита, соответственно; n - число атомов углерода в алкильной цепи молекулы ПАВ; ψ - выигрыш

Рис. 6. Вклад различных взаимодействий в свободную энергию агрегирования



в свободной энергии, приходящийся на один атом углерода алкильной цепи; f - доля первоначально конденсированных на макроионе противоионов.

Первый член в уравнении (1) представляет потерю трансляционной энтропии при перемещении N свободных ионов ПАВ (см. рис. 6, а) из объема раствора в мицеллоподобный агрегат (положительный знак этого члена означает, что этот процесс термодинамически невыгоден). Второй (отрицательный) член (см. рис. 6, б) описывает выигрыш в свободной энергии системы при конденсации N алкильных цепей длины n в углеводородное ядро мицеллы. Третий (отрицательный) член характеризует выигрыш в свободной энергии системы вследствие выигрыша в трансляционной энтропии при выделении в раствор yN противоионов (рис. 6, в). Последний (корректирующий) член в уравнении (1) характеризует сравнительно небольшой вклад в свободную энергию потери конфигурационной энтропии макроиона в результате его адсорбции на поверхности агрегата, а также энтропийные эффекты, связанные со стерическим взаимодействием углеводородных хвостов внутри и гидрофильных радикалов на поверхности агрегата.

Выражение (1) позволяет объяснить влияние различных физико-химических факторов на комплексообразование в смешанных растворах противоположно заряженных ПАВ и полиэлектролитов. Это выражение имеет вид, аналогичный для зависимости ККМ от длины n гидрофобного радикала

$$\ln C_{cac} = A - Bn, \quad (2)$$

в котором коэффициенты A и B для низкомолекулярных ПАВ в индивидуальных растворах представлены во многих обзорах [53].

В результате, из условия термодинамической равновесности процесса агрегирования $\Delta G = 0$, получим выражение для ККА

$$\ln C_{cac} = \frac{\Delta G_{cor}}{kTN} + \ln C_w + \gamma \ln \left(\frac{fC_p + C_{salt}}{C_w} \right) - \frac{\psi n}{kT}. \quad (3)$$

Первый вывод, который можно сделать на основании рассматриваемой модели состоит в том, что значение инкремента $B = \psi/kT$ для смешанных растворов ионных ПАВ и ПЭ совпадает с аналогичным инкрементом для неионных ПАВ и не зависит от концентрации соли в растворе. Экспериментальное опре-

деление параметра u , характеризующего также степень связывания молекул ПАВ макроионом, оказывается возможным на основании зависимостей ККА от концентраций соли C_{salt} , полиэлектролита C_p или выделившейся соли после комплексообразования в растворе [40, 54-56].

Представляет интерес предсказываемая выражением (3) зависимость ККА от плотности электрических зарядов на полиэлектролите, которая пропорциональна параметру f в третьем члене этого выражения. Мы получаем, что ККА увеличивается с ростом этого параметра f , что отмечается многими исследователями, работавшими с различными парами ПАВ-ПЭ [57, 58].

Таким образом, выражение (3), полученное на основе упрощенной модели агрегирования противоположно заряженных ПАВ и полиэлектролита, позволяет объяснить зависимость ККА от некоторых физико-химических параметров, таких как концентрация соли и полиэлектролита, плотность заряженных групп полиэлектролита, длина алкильных цепей молекул ПАВ. Зависимость ККА от других параметров, таких как размер макроиона, гибкость макромолекулярной цепи, специфические взаимодействия, связанные с размером ионогенных групп ПАВ и ПЭ, гидрофобные взаимодействия, может быть в принципе получена путем усложнения термодинамических моделей.

СВОЙСТВА АДСОРБЦИОННЫХ (ГИББСОВСКИХ) МОНОСЛОЕВ РАСТВОРИМЫХ ПАВ-ПЭК

Известно, что водорастворимые анионные и катионные полисахариды (производные хитина, альгинаты и др.) в отсутствие электролита и при относительно высокой степени ионизации проявляют весьма слабую поверхностную активность и стабилизирующую способность по отношению к эмульсиям и пенам. При изучении поверхностной активности анионного (КМХ, рис. 7, а) и катионного ХЗ, (рис. 7, б) полисахаридов выявлено, что они, с одной стороны, не снижают поверхностное натяжение σ в достаточно широком интервале концентраций (вплоть до 10^{-3} основ • моль/л). С другой стороны, низкомолекулярные катионный и анионный поверхностно-активные вещества - ЦПХ и ДДСН при концентрации $\sim 10^{-5}$ моль/л также не проявляют заметной поверхностной активности. В то же время, в смешанных растворах полисахаридов и ПАВ при тех же концентрациях компонентов с снижается более чем на 20 мН/м, что свидетельствует об образовании комплексов, обладающих чрезвычайно высокой поверхностной активностью [17, 19, 22, 48, 49, 59, 60].

При этом так называемые "полимыла" (алкилированные производные полисахаридов с ковалентно присоединенными гидрофобными группами), имеющие одинаковое с ПАВ-ПЭК содержание алкильных цепей, в отличие от ПАВ-ПЭК не проявляют ожидаемой высокой поверхностной активности (рис. 8) [16, 19, 24, 25, 28, 48, 50, 61]. Очевидно, что жесткость макромолекулярной цепи алкилированного полисахарида препятствует адсорбции на межфазной поверхности соседних алкильных групп макроиона, вследствие чего только относительно небольшая часть ковалентно связанных гидрофобных радикалов может локализоваться на межфазной поверхности [16, 22, 25, 28, 61, 62]. В случае ПАВ-ПЭК лабильность электростатических связей обеспечивает условия для адсорбции практически всех связанных молекул ПАВ на межфазной поверхности.

Гидрофобные взаимодействия играют заметную роль в поведении алкилированных производных полисахаридов, а также ПАВ-ПЭК, в объеме раствора и на поверхности раздела фаз. В частности, гидрофобное связывание алкиль-

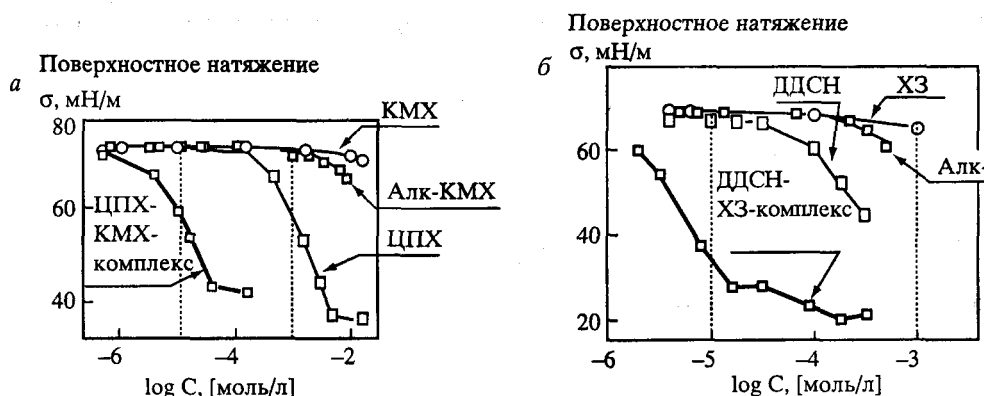


Рис. 7. Изотермы поверхностного натяжения растворов противоположно заряженных ПАВ и полиэлектролитов

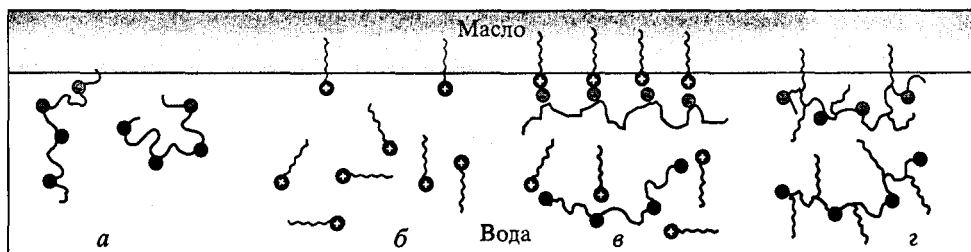


Рис. 8. Различие между механизмом адсорбции ПАВ-ПЭК (в) и алкилированных полиэлектролитов (г)

ных цепей в "полимылах" может привести к гидрофилизации полииона из-за образования мицеллоподобных кластеров в объеме раствора. В результате этого с ростом степени алкилирования, наблюдается не увеличение, а заметное снижение как поверхностной активности, так и вязкости растворов таких "полимыл". Гидрофобными взаимодействиями обусловлена также гидрофилизация алкилированных полисахаридов при образовании комплексов с противоположно заряженными ПАВ [22, 28, 62].

При снижении гидрофобности молекул ПАВ наблюдается закономерное снижение поверхностной активности как самих ПАВ, так и их электростатических комплексов с противоположно заряженным ПЭ (рис. 9). Так при переходе от алкильных ПАВ (ДДСН) к полиэтиленоксидным анионным соединениям (ОЭМС), имеющим одинаковые ионогенные группы, величина их поверхностной активности по Ребиндеру $G_{Re} = -d\sigma/dC|_{C \rightarrow 0}$ закономерно снижается. При этом величина максимальной адсорбции $\Gamma_{max} = -(d\sigma/d \ln C)/RT$, отвечающая максимальному значению $-d\sigma/d \ln C$ для изотерм поверхностного натяжения, снижается от $4,3 \cdot 10^{-6}$ моль/м² (рис. 9, кривая 7) до $1,8 \cdot 10^{-6}$ моль/м² (рис. 9, кривая 2). Одновременно, значения минимальной площади $q_{min} = 1/\Gamma_{max} \cdot N_a$ в максимально насыщенных адсорбционных слоях таких ПАВ равны 0,3 и 1,0 нм² для ДДС и ОЭМС, соответственно, т.е. определяются размерами алкильного радикала и олигоэтиленоксидной цепи (рис. 10, а и б). В то же время, свободная энергия ад-

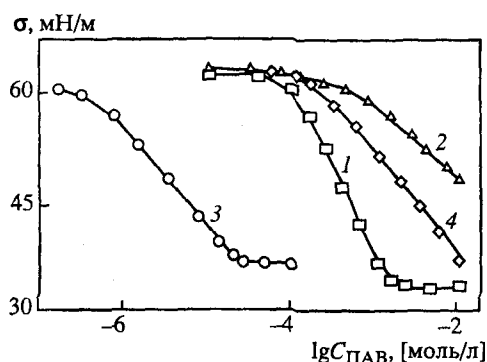
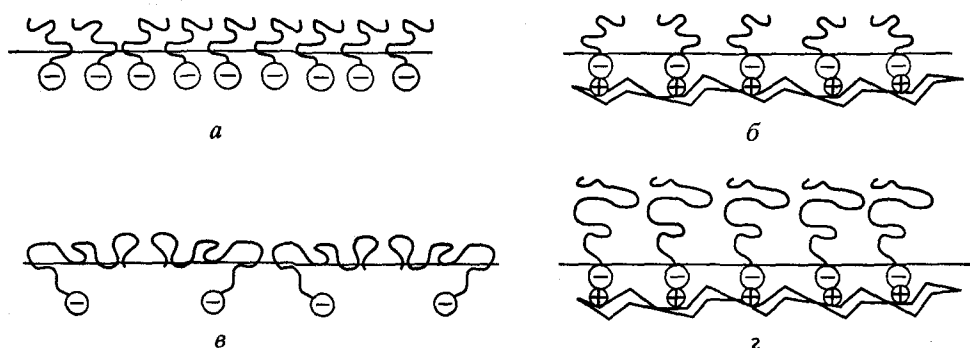


Рис. 9. Изотермы поверхностного натяжения растворов ДДСН (1), ОЭМС (2) и их смесей с хитозаном (3, 4)

Рис. 10. Адсорбция ДДСН (а) и ОЭМС (в), а также ПАВ-ПЭК на основе ДДСН и хитозана (б) и ОЭМС и хитозана (г)



сорбции $\Delta_{ad}G$ молекул ДДСН и ОЭМС, определенная согласно соотношению $\Delta_{ad}G = (RT \ln C + \Delta\sigma q) \big|_{\Delta\sigma=15 \text{ мН/м}}$ [53], соответственно равна -23,0 и -19,6 кДж/моль [48].

При адсорбции ПАВ-ПЭК площадь, приходящаяся на одну молекулу ПАВ в адсорбционном слое, определяется уже не геометрическим размером самих молекул ПАВ, а средним расстоянием между заряженными функциональными группами адсорбированных макроионов, электростатически связывающих противоположно заряженные молекулы ПАВ (см. рис. 10, б и г). Для комплекса ДДС-хитозан площадь на одну молекулу ДДСН возрастает с 0,3 до 0,7 нм², в то время как для ОЭМС-хитозановых комплексов эта площадь снижается с 1,0 до 0,7 нм². Отметим, что в обоих случаях свободная энергия адсорбции $\Delta_{ad}G$ молекул ПАВ, связанных в комплексы с хитозаном, существенно возрастает (по модулю), и становится равной -37,4 кДж/моль для ДДСН и -21,6 кДж/моль ОЭМС. Этот рост $\Delta_{ad}G$ обусловлен как снижением растворимости молекул ПАВ в результате нейтрализации их заряженных групп в контакте с противоположно заряженными функциональными группами хитозана, так и возможной адсорбцией на межфазной поверхности гидрофобных фрагментов макромолекулярной цепи хитозана.

С величиной адсорбции молекул ПАВ и свободной энергией адсорбции коррелирует их эмульгирующая и пенообразующая способность. Например, устойчивость пен закономерно выше для ПАВ-ПЭ-комплексов, чем для индивидуальных компонентов, и выше для комплексов ДДСН-хитозан, чем для комплексов ОЭМС-хитозан [17, 20-22, 48, 63] (рис. 11).

Почему эмульгирующая способность полиэлектролита значительно увеличивается при введении небольшого количества (обычно несколько %) противо-

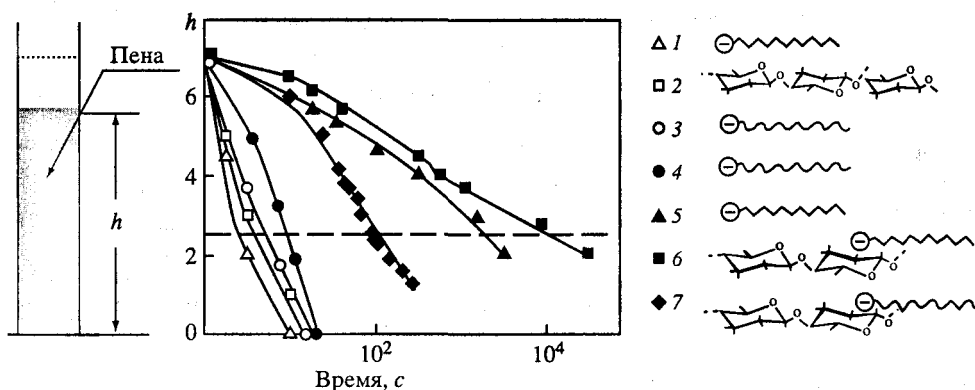


Рис. 11. Кинетические кривые устойчивости пен, стабилизированных различными ПАВ и хитозаном

1 - ДДСН ($C_s = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л); 2 - ХТЗ ($C_{ch} = 7 \cdot 10^{-3}$ осново-моль/л); 3 - ОЭМС ($C_s = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л); 4 - ОЭМС ($C_s = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л); 5 - ДДСН ($C_s = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л); 6 - ХЗ + ДДСН ($C_{ch} = 7 \cdot 10^{-3}$ осново-моль/л + $C_s = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л); 7 - ХЗ + ОЭМС ($C_{ch} = 7 \cdot 10^{-3}$ осново-моль/л + $C_s = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л)

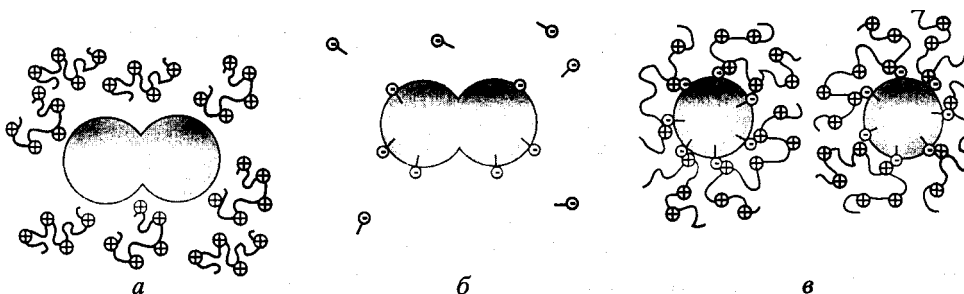


Рис. 12. Синергическое действие противоположно заряженных ПАВ и ПЭ на устойчивость эмульсий

положительно заряженного ПАВ [22] объясняет рис. 12. Например, эмульсия, которая является неустойчивой как в растворе ПЭ концентрации $C_p = 10^{-3}$ осново-моль/л из-за его низкой адсорбционной активности (рис. 12, а), так и в растворе ПАВ при выбранной низкой концентрации в растворе, $C_s = 10^{-5}$ моль/л (рис. 12, б), становится весьма устойчивой к коалесценции при тех же концентрациях компонентов в их смешанном растворе (рис. 12, в) из-за высокой кооперативной адсорбции ПАВ-ПЭК и образования защитного адсорбционного слоя из таких комплексов на поверхности капель [17, 21, 63].

Высокая поверхностная активность ПАВ-ПЭК по сравнению с образующими их компонентами обнаруживается также методом монослойной техники [17, 23, 48]. В частности, было показано [28, 48], что в отличие от индивидуальных компонентов (ЦПХ и КМХТ) адсорбционные слои их комплекса проявляют чрезвычайно высокую поверхностную активность. Поверхностное давление, будучи практически равным нулю во всей области сжатия адсорбционных слоев индивидуальных компонентов - как ЦПХ, так и КМХТ (рис. 13, а, кривые 1 и 2), резко возрастает для их комплекса, причем изотерма π -А характеризуется наличием плато при $\pi = 26$ мН/м (рис. 13, а, кривая 3).

Появление участка плато на изотерме π -А обычно интерпретируется как фазовый переход первого рода (в данном случае это свидетельствует об обра-

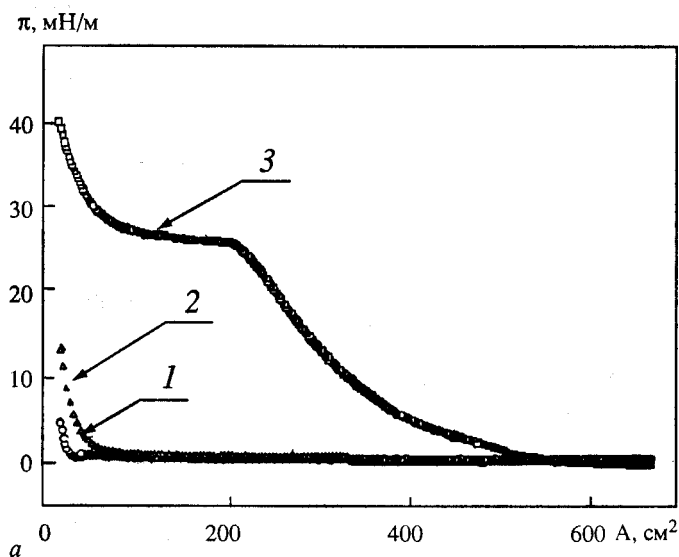


Рис. 13. Изотерма поверхностного давления (а) растворов КМХТ (1), ЦПХ (2) и их смесей (3) ($C_{\text{ЦПХ}} = 10^{-6}$ моль/л, $C_{\text{КМХТ}} = 10^{-4}$ моль/л) и схема, иллюстрирующая формирование агрегатов при сжатии адсорбционного монослоя ПАВ-ПЭК (б)

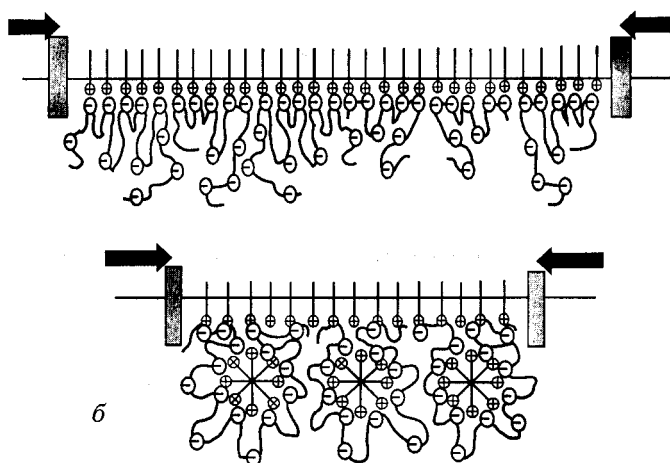
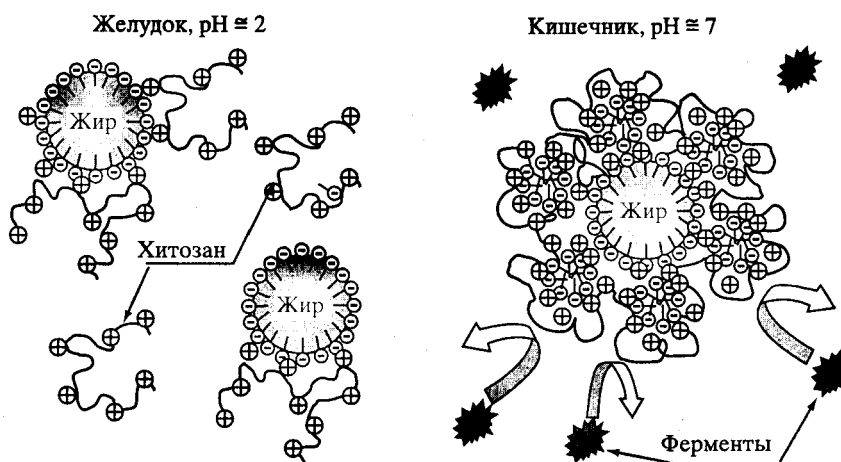


Рис. 14. Механизм ингибирования жира хитозаном в желудочно-кишечном тракте



зовании мицеллоподобных кластеров в адсорбционном монослое ПАВ-ПЭК аналогично образованию мицелл в объеме раствора (см. рис. 13, б)). Образование защитного адсорбционного слоя из таких агрегатов сопровождается существенным увеличением устойчивости эмульсий и пен [21, 22].

Стабилизирующая способность ПАВ-ПЭК на основе хитозана и ионных ПАВ используется для приготовления диетической пищи (так называемых суперпоглотителей жира, рис. 14). Ингибирующее действие хитозана объясняется тем, что на поверхности капелек жира образуются адсорбционные слои комплексов между хитозаном и жирными кислотами, которые ингибируют жир от действия панкреатических и кишечных ферментов и предотвращают его всасывание в кишечном тракте [1].

СВОЙСТВА НЕРАСТВОРИМЫХ ПАВ-ПЭК

При исследовании осадков ПАВ-ПЭК, образующихся в результате взаимодействия катионного полисахарида (хитозана) с анионным ПАВ (ДДСН), методом малоуглового рентгеновского рассеяния обнаруживается наличие на рентгенограмме характерного пика при $q = 1,71 \text{ нм}^{-1}$ (рис. 15, кривая 3), который отсутствует на рентгенограмме осадка хитозана в щелочи (рис. 15, кривая 4). Это свидетельствует о том, что при формировании осадков нерастворимых ПАВ-ПЭК возникает упорядоченная наноструктура, обусловленная образованием мицеллоподобных кластеров молекул ПАВ. Формирование упорядоченной мицеллярной наноструктуры, характерное для гибкоцепных синтетических полиэлектролитов [64], впервые обнаружено для относительно жестко цепного полиэлектролита - хитозана в работах [26, 27].

Физические гели ПАВ-ПЭК на основе хитозана с высокоупорядоченной мицеллярной структурой получают при фронтальной диффузии ПАВ и ПЭ на границе раздела их индивидуальных растворов (рис. 16). Рентгенограммы таких гелей характеризуются ярко выраженным пиком при $q = 1,68 \text{ нм}^{-1}$ (рис. 15, кривая 2). Такая же упорядоченная структура образуется в физических гелях ПАВ-ПЭК на основе алкилированных образцов водных хитозана (рис. 15, кривая 7). Согласно данным элементного анализа, состав ПАВ-ПЭК в физических гелях стехиометричен по заряду полиэлектролита. Объемная доля твердой фазы в таких гелях составляет 30-50%. В результате гидрофобных взаимодействий алкильных цепей ПАВ в мицеллоподобных кластерах ПАВ-полиэлектролитные гели не набухают и не растворяются в водно-солевых растворах, вплоть до $C_{\text{NaCl}} = 0,5 \text{ моль/л}$ и при $\text{pH} > 2$.

Обращает на себя внимание различие в скорости движения фронта гелевого слоя внутри капле концентрированного раствора хитозана при их попадании в мицеллярный раствор ДДСН и раствор щелочи (рис. 16). Процесс диффузионного формирования слоя нерастворимого геля хитозана в щелочи происходит с довольно большой скоростью и распространяет-

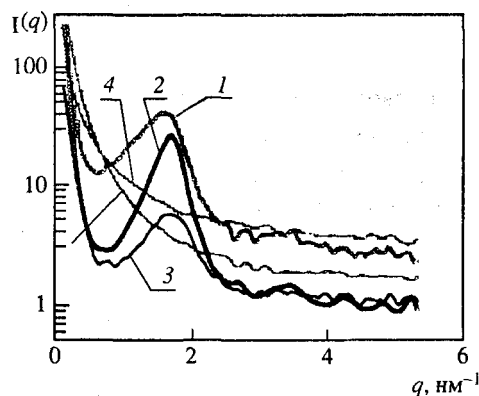


Рис. 15. Рентгенограмма гелей ПАВ-ПЭК на основе ХЗ- C_{12} (1), ХЗ (2), осадков ПАВ-ПЭК (3), ХЗ (4) и ХЗ- C_{12} (5)

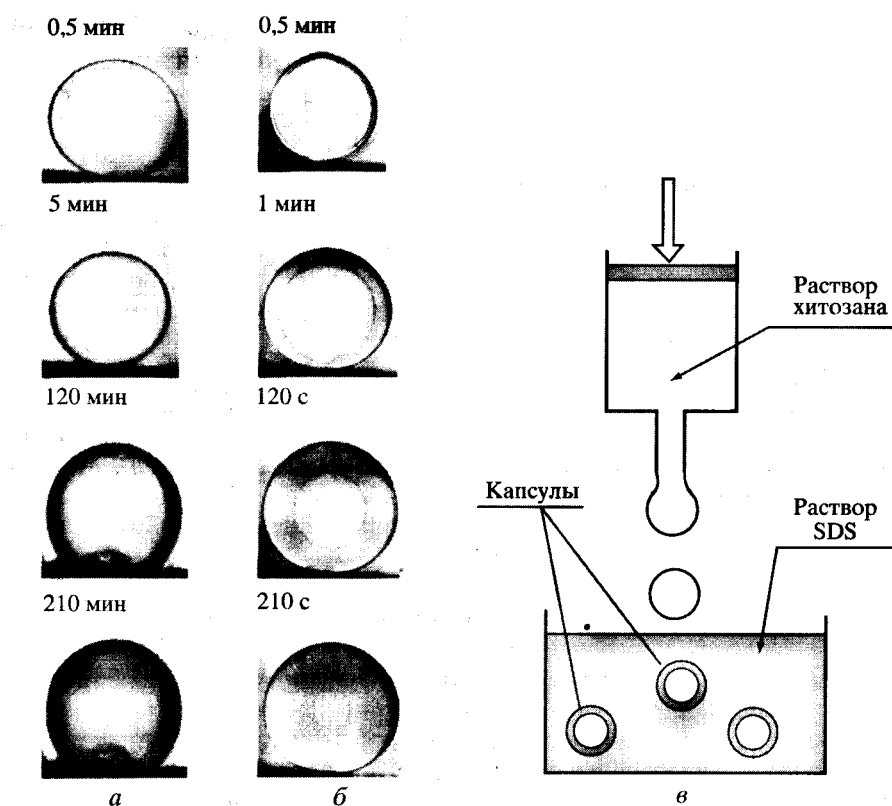


Рис. 16. Процессы, происходящие при попадании капли раствора хитозана в раствор ПАВ и в раствор щелочи [48] по схеме получения капсул прикапыванием водного раствора ХЗ в водный мицеллярный раствор ДДСН

ся за несколько минут на весь объем капли. В то же время, в растворе ПАВ за 2-3 ч образуется тонкий слой геля ПАВ-ПЭК толщиной порядка нескольких сотен микрон при размере капли порядка 1 мм [48] (рис. 17). Скорость увеличения толщины слоя геля контролируется скоростью фронтальной диффузии мицелл ПАВ внутрь высококонцентрированного водного раствора полиэлектролита, и может быть приближенно описана уравнением $\delta = \sqrt{2Dt}$, где δ - толщина гелевого слоя, D - эффективный коэффициент диффузии, t - время.

Значения измеренных по начальному наклону кривых $\delta - \sqrt{t}$ коэффициентов диффузии D находятся в пределах $10^{-13} - 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$, что совпадает с теоретическими оценками по формуле $D = kT/(6\pi\eta r)$, в которой r - радиус мицелл, η - вязкость соответствующих растворов полиэлектролитов (рис. 18).

Оценка структурно-механических (реологических) свойств гелей ПАВ-ПЭК по методу Герца [48] показывает, что их модуль эластичности имеет величину порядка $E = 10^4 - 10^5 \text{ Н/м}^2$, что характерно для физических гелей с объемной долей твердой фазы 30-50%. Эффективная (кельвинская) вязкость η этих гелей, оцененная по характерному времени релаксации напряжения $\pi = \tau_r E$, составляет $10^6 - 10^7 \text{ Па} \cdot \text{с}$. На основе модели физического геля ПАВ-ПЭК, в котором мицеллы являются узлами решетки, произведена оценка числа агрегации v мицелл по формуле $E \cong vRT \cong 20 - 50$.

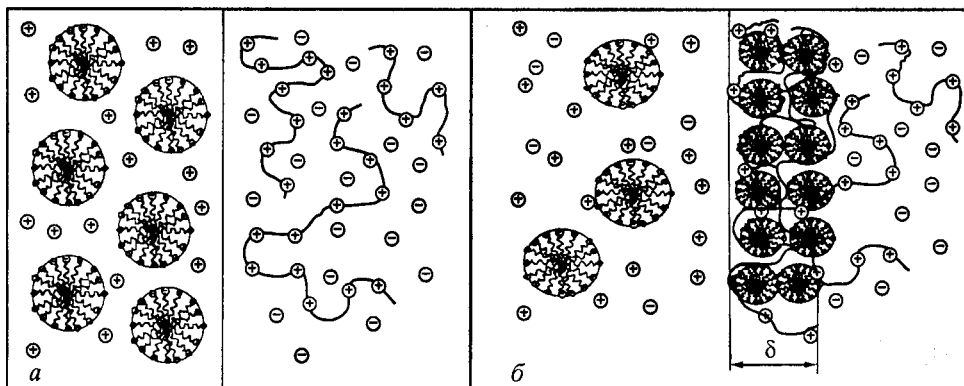
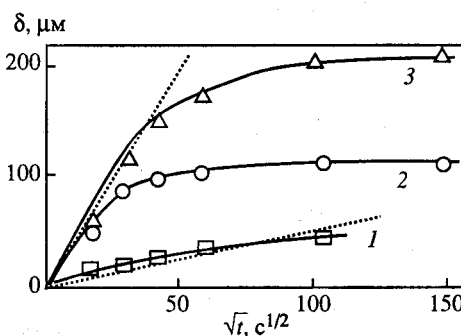


Рис. 17. Процесс гелеобразования при контакте водных растворов противоположно заряженных ПАВ и полиэлектролита в начале (а) и в конце (б) процесса

Рис. 18. Толщина гелевого слоя в зависимости от времени выдержки при $C_{\text{ДДСН}} = 0,1$ моль/л и $V_{\text{ДДСН}} = 50$ мл

1 – $C_{\text{ХТЗ}} = 0,1$ осново-моль/л; $V_{\text{ХЗ}} = 10$ мл;
2 – $C_{\text{ХТЗ}} = 0,05$ осново-моль/л; $V_{\text{ХЗ}} = 10$ мл;
3 – $C_{\text{ХЗ}} = 0,05$ осново-моль/л; $V_{\text{ХЗ}} = 20$ мл



Физические гели на основе природных биodeградируемых полимеров представляют интерес для создания оболочек капсул, содержащих в водном ядре и гелевой оболочке биологически активные компоненты (ферменты, гормоны, живые клетки). В мицеллоподобных кластерах физического геля может также происходить солубилизация маслорастворимых лекарственных веществ [26]. Капсулы, полученные на основе хитозана, могут быть использованы для селективной сорбции тяжелых металлов [48].

Устойчивые сферические капсулы образуются в узкой области концентраций (на фазовой диаграмме системы раствор ХЗ-раствор ДДСН (рис. 19, область 4). В то же время вне этой области имеет место сжатие капсул или разрыв их оболочек под действием осмотического давления. Осмотическое давление, играющее важную роль при формировании сферических капсул, можно контролировать с помощью низкомолекулярных добавок, в частности, глюкозы. В частности, отрицательный эффект контракции капсул, наблюдаемый при увеличении концентрации ПАВ во внешней среде, желательном для увеличения скорости гелирования (рис. 20, кривая 7), можно предотвратить добавлением во внутреннюю фазу глюкозы (кривая 2) [48].

Предложенный метод формирования ПАВ-ПЭК капсул был использован для получения инкапсулированных ферментов различной молекулярной массы (уреазы и трипсина [65, 66]). Показано, что ферменты, находящиеся в водорастворимом внутреннем ядре капсул, практически не теряют ферментативной активности. Частичная инактивация ферментов наблюдалась лишь в нерастворимом в воде гелеобразном поверхностном слое капсул, состоящем из ПАВ-ПЭК хитозана и белка с ДДСН.

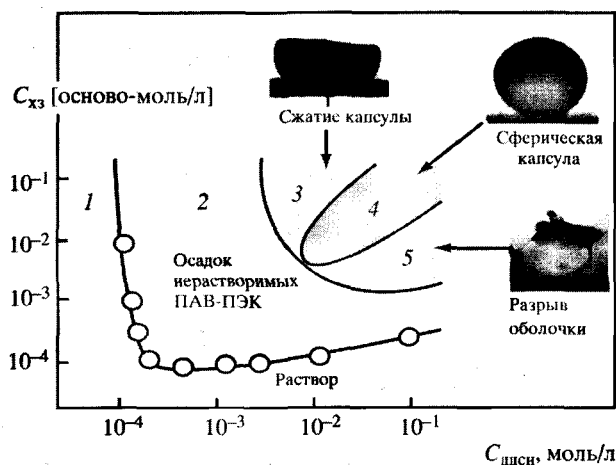
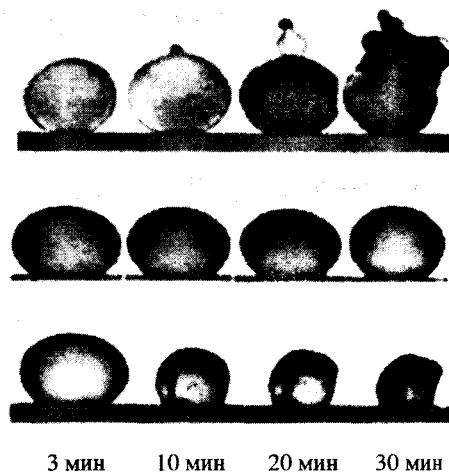
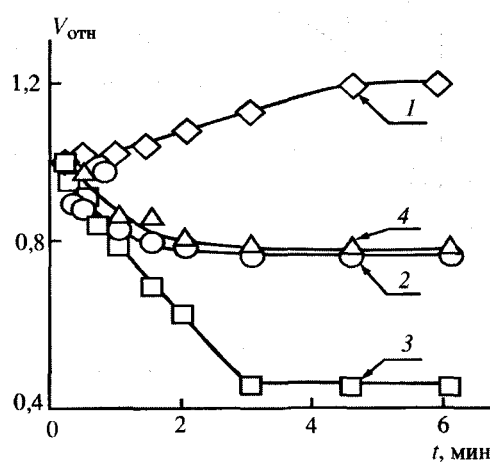


Рис. 19. Концентрационная область получения капсул из ПАВ-ПЭК

Рис. 20. Влияние осмотического давления на зависимость относительного объема капсулы от времени ее выдержки

- 1 - $C_{хз} = 0,15$ осново-моль/л,
 $C_{дсн} = 0,1$ моль/л;
 2 - $V_{хз} = 0,10$ осново-моль/л,
 $C_{дсн} = 0,1$ моль/л;
 3 - $C_{хтз} = 0,05$ осново-моль/л,
 $C_{дсн} = 0,1$ моль/л;
 4 - $C_{хз} = 0,05$ осново-моль/л,
 $C_{дсн} = 0,1$ моль/л,
 $C_{гд} = 0,1$ моль/л



Согласно полученным данным при иммобилизации в капсулах сравнительно высокомолекулярного фермента - уреазы ($MM = 400\,000$), фермент необратимо включается в состав капсул и не переходит в 1М раствор NaCl даже в течение суток. Для фермента с относительно небольшой молекулярной массой (трипсин, $MM = 25\,000$) показана возможность регулирования скорости выделения белка из капсул путем варьирования параметров их получения, приводящих к изменению толщины нерастворимой в воде гелеобразной оболочки капсул.

ЛИТЕРАТУРА

1. Muzzarelli R.A.A. // Carbohydrate Polymers. 1996. V. 29. P. 309-316.
2. Paul W., Sharma C.P. // I I S.T.P. Pharma Sciences, 2000. V. 10. N 1. P. 5-22.
3. Албулов А.М., Самуйленко А., Варламов В.П. и др. // Материалы VI Междунар. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 2001. С. 9-11.
4. Гладышев Д. Разработка способов получения карбоксиметилловых эфиров хитина и хитозана и изучение их комплексообразующих свойств. Дисс.... канд. хим. наук. М: МТИ, 1990. 155 с.
5. Пат. 1666459 РФ. С 08В 37/08.
6. Muzzarelli R., Delben F., Ilari P., Tomasetti M. // Chim. Oggi. 1993. V. 11. N 10. P. 31-35.

7. Gamzazade A., Sklyar A., Nasibov S. et al. // Carbohydrate Polymers. 1997. V. 34. P. 113-116.
8. Muzzarelli R.A.A., Tanfani F., Emanuelli M. et al. // Carbohydr. Res. 1984. V. 126. P. 225-231.
9. Muzzarelli R.A.A., Gracomelli G. // Carbohydrate Polymers. 1987. V. 7(2). P. 87-96.
10. Baschong W., Huglin D., Maier T., Kulik E. // SOFW-journal. 1999. V. 125. P. 22-24.
11. Inoue K., Yoshizuka K., Ohto K. // Anal. chim. acta. 1999. V. 388. N 1-2. P. 209-218.
12. Muzzarelli R., Weckx M., Bicchiera V. // Chim. Oggi. 1991. V. 9. N 4. P. 33-40.
13. Shafiqul Alam M., Inoue K., Yoshizuka K., Ishibashi H. // Sep. sci. technol. 1998. V. 33. N 5. P. 655-662.
14. Nishimura S.-I., Mima Y., Longdi Ren M. et al. // Chem. Lett. 1993. V. 9. P. 1623-1628.
15. Yoshioka H., Nonaka K., Fukuda K., Kazama S. // Biosci. Biotech. Biochem. 1995. V. 59. P. 1901-1904.
16. Desbrieres J., Rinaudo M., Babak V., Vikhoreva G. // Polymer Bull. 1997. V. 39. P. 209-215.
17. Babak V.G., Vikhoreva G.A., Lukina I.G. // Colloids & Surfaces A: Physicochem. and Eng. Aspects. 1997. V. 128. N 1-3. P. 75-89.
18. Vikhoreva G.A., Babak V.G., Galich E.F., Galbraikh L.S. // Polymer Science. Ser. A. 1997. V. 39. P. 617-622.
19. Babak V.G., Lukina I.G., Vikhoreva G.A. et al. // Colloids & Surfaces A: Physicochem. and Eng. Asp. 1999. V. 147. P. 139-148.
20. Babak V.G., Lukina I.G., Bodorev M.M., Klementjev V.G. // Colloid J. Engl. Tr. 1996. V. 58. N 6. P. 707-712.
21. Babak V.G., Lukina I.G., Vikhoreva G.A. // Mendeleev Commun. 1996. V. 6. P. 235-237.
22. Babak V.G. // Food Colloids. Fundamental of Formulation / Eds. Dickinson E., Miller R. P. 91. Cambridge: The Royal. Society of Chemistry, 2001. P. 91-115.
23. Babak V.G., Kalabina N.N., Vikhoreva G.A. et al. // Mendeleev Commun. 1997. N 5. P. 202-203.
24. Babak V.G. // Proc. 5th World Surfactants Congress. Vol. 1. CESIO, Firenze, Italy, 2000. P. 563.
25. Babak V.G., Rinaudo M., Desbrieres J. et al. // Mendeleev Commun. 1997. N 4. P. 149-151.
26. Babak V.G., Merkovich E.A., Desbrieres J., Rinaudo M. // Polymer Bulletin 2000. V. 45. P. 77-81.
27. Babak V.G., Merkovich E.A., Galbraikh L.S. et al. // Mendeleev Commun. 2000. V. 3. P. 94-95.
28. Babak V.G., Kildeeva N.R., Merkovich E.A. et al. // Euroforum "Biopolymer: Food and Cosmetic Applications" (Polymerix 2000), Rennes, France. P. 27-38.
29. Babak V.G., Merkovich E.A. et al. // Proc. of 5th World Surfactants congress Firenze: CESIO. V. 1. P. 657-663.
30. Damodaran S. // Biotechnol. Adv. 1996. V. 14. P. 596-599.
31. Lalov I.G., Guerginov I.I., Krysteva M.A., Fartsov K. // Water Research. 2000. V. 34. P. 1503-1507.
32. Tengamnuav P., Sahamethapata A., Sailasutab A., Mitrac A.K. // Int. J. of Pharmaceutics. 2000. V. 197. P. 53-57.
33. Goddard E. // Colloids and Surfaces. 1986. V. 19. P. 301-329.
34. Касаикин В.А. Полимер-коллоидные комплексы. Получение, строение, свойства. Дисс.... док. хим. наук. М.: МГУ, 1988. 298 с.
35. Рябина В.Р., Стародубцев С.Ф., Хохлов А.Р. // Высокомол. соедин. 1990. Т. 32. А(5). С. 969-974.
36. Goddard E.D. // JAOCS. 1994. V. 71. N 14. P. 1-15.
37. Hansson P., Lindmann B. // Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 1996. V. 1. P. 604-613.
38. Anthony O., Zona R. // Langmuir. 1996. V. 12. N 8. P. 1967-1975.
39. Касаикин В.А., Ефремов В.А., Захарова А. и др. // Докл. РАН. 1997. Т. 354. № 4. С. 498-501.
40. Hansson P. // Langmuir. 1998. V. 14. N 9. P. 2269-2277.
41. Wallin T., Linse P. // Ibid. 1998. V. 14. N 11. P. 2940-2949.
42. Konop A.J., Colby R.H. // Ibid. 1999. V. 15. N 1. P. 58-65.
43. Magny B., Iliopoulos I., Zona R., Audebert R. // Ibid. 1994. V. 10. N 9. P. 3180-3187.
44. Ибрагимова З.Х., Касаикин В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомол. соедин. 1986. Т. 28. А(8). С. 1640-1646.
45. Коробко Т.А., Изумрудов В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Там же. 1994. Т. 36. А(2). С. 223-228.
46. Anthony O., Zona R. // Langmuir. 1996. V. 12. N 15. P. 3590-3597.
47. Philippova O.E., Hourdet D., Audebert R., Khokhlov A.R. // Macromolecules. 1996. V. 29. P. 2822-2830.
48. Меркович Е.А. // Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГТУ, 2000. 150 с.
49. Вихорева Г.А. // Дис. ... док. хим. наук. М.: МГТУ, 1998. 316 с.

50. *Бабак В.Т., Риного М.* // Материалы V конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО. С. 206-210.
51. *Василевская В.В., Крамаренко Е., Хохлов А.Р.* // Высокомол. соедин. 1991. Т. 33 А(5). С. 1062-1069.
52. *Nikas Y.J., Blankstein D.* Complexation of Nonionic Polymers and Surfactants in Dilute Aqueous Solutions // *Langmuir*. 1994. V. 10. N 10. P. 3512-3528.
53. *Rosen M.J.* Surfactants and Interfacial Phenomena // Ed. N.-Y.: Wiley Interscience, 1989. 431 p.
54. *Hayakawa K.* *II J. Phys. Chem.* 1983. V. 87. N 2. P. 506-510.
55. *Malovikova A., Hayakawa K., Kwak J.C.T.* *II J. Phys. Chem.* 1984. V. 88. P. 1930-1933.
56. *Hansson P., Almgren M.* // *Langmuir*. 1994. V. 10. P. 2115-2124.
57. *Третьякова А., Биланов А.В., Барабанов В.Р.* // Высокомол. соедин. 1992. Т. 34 А(5). С. 86-90.
58. *Chen L., Shuyan Y., Kagami Y.* et al. // *Macromolecules*. 1998. V. 3. N 3. P. 787-794.
59. *Babak V.G., Vikhoreva G.A., Anchipolovskiy M.A.* // *Mendeleev Commun.* 1996. P. 73-75.
60. *Вихорева Г.А., Анчиполовский М.А., Бабак В.Г., Гальбрайт Л.С.* // Высокомол. соедин. 1997. Т. 39 А(2). С. 231-236.
61. *Лукина И.Г., Бабак В.Т.* // Материалы V конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. С. 236-238.
62. *Babak V.G., Skotnikova E.A., Lukina I.G.* et al. // *J. Colloid Interface Sci.* 2000. V. 225. P. 505-510.
63. *Babak V.G., Vikhoreva G.A., Lukina L.G., Kuznezova L.V.* // *Colloid Journal*. 1997. V. 59. N 2. P. 131-133.
64. *Хандурина В., Рогачева В.Б., Зезин А.Б., Кабанов В.А.* // Высокомол. соедин. 1994. Т. 36 А(2). С. 229-234.
65. *Кульдеева Н.Р., Бабак В.Т., Вихорева Т.А.* и др. // Вест. МГУ. Сер. Химия. 2000. Т. 6. С. 423-425.
66. *Кульдеева Н.Р., Бабак В.Т., Меркович Е.А.* и др. // Материалы VI Междунар. конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО. С. 350-352.

СОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ХИТИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Л.Ф. Горовой

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев

gorovoj@iicb.kiev.ua

В.Н. Косяков

РНИЦ "Курчатовский институт", Москва

kosyakow@mail.ru

Длительные техногенные нагрузки на окружающую среду привели к ее значительному, а во многих районах даже критическому загрязнению тяжелыми металлами, радионуклидами, нефтепродуктами и другими вредными для живой природы и человека веществами, причем загрязнению подвергаются все три среды - воздух, вода и почва.

Тяжелые металлы особенно опасны потому, что, в отличие от многих других веществ, они не разлагаются и имеют тенденцию к накоплению. Они включаются в биологический круговорот веществ на длительные периоды времени и могут переноситься водотоками на большие расстояния. Поэтому только природоохранные мероприятия не способны в ближайшей перспективе радикально решить проблему защиты от губительного загрязнения тяжелыми металлами. Для этого необходимы активные действия по удалению тяжелых металлов, как на путях их попадания в организм человека, так и из основных источников их поступления в природную среду - промышленных стоков и выбросов. Особую опасность представляют такие металлы, как ртуть и кадмий, поскольку из биологических объектов они практически не выводятся. Однако и такие широко распространенные металлы, как медь, никель, хром и цинк тоже представляют большую опасность, так как, попадая в обычные канализационные стоки, они нарушают работу систем очистки сточных вод, и отравляют поля орошения и водоемы.

На предприятиях атомной энергетики в России к настоящему времени накоплены сотни миллионов кубометров жидких радиоактивных отходов (ЖРО) низкого и среднего уровня активности с суммарной активностью во многие миллионы кюри.

Проблема усугубляется еще и тем, что большая часть таких ЖРО находится в совершенно неконтролируемом состоянии (в открытых водоемах или в глубинных скважинах). Огромные регионы России, Украины и Белоруссии оказались загрязненными в результате Чернобыльской катастрофы. Основу долгосрочных радиоактивных загрязнений составляют долгоживущие радионук-

лиды, такие как Cs-137, Sr-90, Zr-93, -95, Ru-106, Ce-144, Sm-151, Eu-154, изотопы трансурановых элементов (Np-237, Pu-238, -239, -240, Am-241, -243, Cm-244) и радиоактивные изотопы, образующиеся в конструкционных материалах в результате взаимодействия с нейтронами (Co-60, Mn-54). Большинство этих элементов относятся к числу тяжелых металлов или переходных элементов.

Переработка отходов с таким широким спектром химических элементов с целью их выделения, концентрирования и дальнейшего безопасного хранения представляет собой сложнейшую технологическую задачу. Сложность задачи состоит и в том, что большинство тяжелых металлов, и особенно радионуклидов, проявляют свою токсичность в весьма низких концентрациях, составляющих доли миллиграмма на килограмм воды или почвы. Извлечение таких малых количеств обычными химическими методами неэффективно и дорого. Наиболее перспективны в этом отношении сорбционные методы и селективные сорбенты.

Известно большое число минеральных, синтетических и органических сорбентов, специфичных по отношению к тяжелым металлам и радионуклидам. Единственным преимуществом минеральных сорбентов является их низкая стоимость, тогда как их недостатки (низкая эффективность, параллельный захват биологически важных микроэлементов, необходимость иметь дело с большим набором различных сорбентов и низкий коэффициент компактирования) заставляют искать другие виды сорбентов.

Органические сорбенты перед минеральными имеют уже то преимущество, что обеспечивают эффективное компактирование отработанных материалов путем их сжигания. Среди органических сорбентов особое место занимают природные полимеры, хитин и его производное - хитозан. Хитин является основным структурным компонентом клеточных стенок грибов и наружных покровов ракообразных и насекомых и ресурсы его производства могут быть отнесены к числу возобновляемых. У этих организмов хитин выполняет, в основном, защитную функцию, предохраняя внутренние органы и живой протопласт клеток от проникновения всякого рода токсинов в том числе и тяжелых металлов. Особенно сильно сорбционные свойства хитина проявляются у грибов, которые, как широко известно, могут накапливать тяжелые металлы и радионуклиды в количествах, в сотни раз превышающих их содержание в окружающей среде [1-10]. Хитозан является еще более эффективным сорбентом тяжелых металлов и легко получается в результате дезацетилирования хитина при щелочной обработке.

Пожалуй, первой работой, где автор имел дело с соединением хитозана и переходного металла (меди) можно считать использование этого соединения для окончательной обработки тканей [11]. Позднее Майская и др. [12], исследуя распределение металлов в геологических образцах, обнаружили, что хитин, полученный из грибов, сорбирует уранил (ион из водных растворов) более эффективно, чем хитин, полученный из панцирей крабов. Затем были опубликованы более подробные данные по сорбции урана хитином и его производными [13].

Хитин и хитозан содержат несколько функциональных групп - гидроксильные, карбинольные, амино-, ацетиламидные группы и кислородные мостики, поэтому механизм сорбции тяжелых металлов этими полимерами имеет довольно сложный характер. В зависимости от условий он может включать комплексобразование, ионный обмен и поверхностную адсорбцию, однако большинство исследователей в последнее время склоняются к тому, что чаще всего преобладает хелатное комплексобразование, обусловленное высокой электронодонорной способностью атомов азота и кислорода [14-22]. Благодаря это-

му хитиновые сорбенты обладают удивительно широким спектром сорбируемых элементов. Практически это ионы всех металлов, за исключением щелочных и щелочноземельных. При этом хитозан в большинстве случаев является более эффективным сорбентом, чем хитин, и по своей хелатирующей способности не уступает хорошо известной смоле Дауэкс-1 [23, 24].

Хитиновые сорбенты могут успешно применяться для очистки водных растворов от самых различных загрязнений: практически от всех тяжелых металлов, многих радионуклидов, бактерий, многих органических примесей, пестицидов и других соединений. Они могут быть использованы для очистки питьевой воды, сточных вод различных производств, технологических растворов и других жидких систем. В последние годы найдены технические решения для очистки шламов, донных отложений и почв с использованием хитиновых материалов, обладающих ферромагнитными свойствами [25]. По ряду технологических показателей сорбенты на основе хитина и его производных превосходят многие другие известные сорбенты. В связи с недостаточными объемами производства хитиновых материалов на мировом рынке еще недавно отмечался большой неудовлетворенный спрос на хитиновые сорбенты, применимые для очистки сточных вод.

Высокие сорбционные характеристики, низкая зольность и постоянно снижающиеся цены на хитин и хитозан позволяют также высоко оценивать потенциальные возможности использования этих сорбентов в гидрометаллургических процессах для промышленного выделения особо ценных металлов из производственных жидких отходов или из морской воды.

Со времени первых работ прошло уже 50 лет. Опубликована масса работ, посвященных исследованиям взаимодействия хитина и его производных с переходными металлами, изучение практических проблем сорбции этих металлов на хитиновых сорбентах, разработке методов выделения и разделения тяжелых металлов и некоторых радионуклидов, опубликовано несколько исчерпывающих обзоров, обобщающих эти работы [14, 15, 26]. В США, Европе, Азии и России было организовано несколько международных конференций, посвященных хитину и его производным [27-34]. И тем не менее для промышленного использования хитиновых сорбентов в решении насущных экологических проблем предстоит еще очень многое сделать. Мы надеемся, что предлагаемый обзор будет способствовать расширению исследований в этой интересной и важной области, что, в свою очередь, существенно приблизит реализацию огромных потенциальных возможностей, заложенных самой природой в эти широко распространенные и весьма доступные полимеры - хитин и хитозан.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОРБЕНТОВ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ

В настоящее время существуют два основных источника получения хитина - это панцири морских ракообразных и грибы. Правда в последние годы в качестве альтернативных источников всерьез рассматриваются также мелкий пресноводный рачок, гаммарус, и пчелиный подмор [35, 36]. Однако работы в этой области еще только начинаются и в основном в России. Принято считать, что хитин, получаемый, как из живых организмов, так и из грибов, по химическим свойствам почти идентичен [15], и тем не менее многими исследователями показано, что их сорбционные способности существенно неодинаковы. Отличия наблюдаются и внутри каждой из этих групп, но они обычно незначительны.

Таблица 1. Сорбция ионов переходных металлов хитозаном, полученным из различного сырья морского происхождения [44]

Источник сырья	Сорбированный металл на 1 г хитозана, мг				
	Fe ³⁺	Co ²⁺	Ni ²⁺	Hg ²⁺	Cu ²⁺
Краб	23,4	5,9	64,6	321	39,3
Креветка	23,4	7,1	82,1	341	66,4
Кальмар	23,4	7,4	82,1	366	60,4
Криль	29,3	4,7	76,3	411	60,4

Сорбенты из панцирей ракообразных. Химическая переработка панцирей ракообразных обычно производится традиционным кислотно-щелочным способом, который включает следующие этапы: деминерализацию, депротеинизацию и деацетилирование [37, 38]. Деминерализацию проводят промывкой исходного сырья слабым раствором (примерно 2%) соляной кислоты, а депротеинизацию - 2% раствором NaOH. Как правило, окончательным продуктом переработки является хитозан, и процесс заканчивается стадией деацетилирования хитина. Для этого используют концентрированные растворы щелочи (40-50%) и нагревание выше 100 °С. Все виды сырья существенно отличаются друг от друга по содержанию хитина, минеральных примесей, белка, липидов и т.д., поэтому для каждого вида сырья используется свой метод, учитывающий эти различия [38-40]. Совсем недавно для переработки гаммаруса предложен весьма прогрессивный электрохимический метод, который не требует больших расходов кислоты и щелочи [41]. Хотя этот метод и не дает чистого хитозана, однако получаемый продукт обладает довольно обнадеживающими сорбционными свойствами [42]. И все же основное внимание исследователей привлекает хитозан [43].

Сравнительные исследования сорбционной способности хитозана, полученного из крабов, креветок, криля и кальмаров, по отношению к ряду металлов показали отсутствие принципиальной зависимости ее от источника хитозана [20, 44]. Из табл. 1 видно, что даже при некотором различии в цифрах сохраняются определенные соотношения между сорбируемостью различных металлов. Так лучше всего обычно сорбируется ртуть, хуже всего - кобальт.

Изучение кинетики сорбции металлов из водных растворов показало, что лимитирующей стадией процесса является диффузия [26,43]. Сорбционное равновесие достигается примерно за 1 ч и мало зависит от pH среды.

Сорбенты из низших грибов. Давно было замечено, что хитин грибного происхождения обладает более высокой сорбционной способностью по отношению к тяжелым металлам, чем хитин ракообразных [12, 45]. Преимущества "грибного" хитозана по сравнению с "животным" были показаны на примере сорбции таких металлов, как цинк, никель, кобальт. Несколько худшие показатели наблюдались только для меди. Особенно эффективным "грибной" хитозан оказался по отношению к марганцу. Он сорбировал до 82% этого металла, в то время, как "животный" хитозан в тех же условиях удерживал менее 10% [46].

В табл. 2 показано, что хелатирующие полимеры, полученные из разных групп грибов, практически полностью поглощают ионы Си и в значительной степени - ионы Pb, Cr, Ni, Co, Mn, Hg, Zn. Однако при проведении сравнительных исследований следует иметь в виду, что получить чистый хитин из грибов обычными методами химической обработки на самом деле не удастся, а в каче-

Таблица 2. Сорбция ионов металлов сорбентом, полученным из различного сырья грибного происхождения (200 мг порошкообразного сорбента в 50 мл 0,5 мМ раствора при 20 °С [47])

Исходное сырье	Извлечение, %							
	Cr ³⁺	Mn ²⁺	Co ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Hg ²⁺	Pb ²⁺	Ni ²⁺
<i>Mucor rouxii</i>	84	48	58	100	70	85	90	58
<i>Phycomices blakaslea nus</i>	98	73	87	100	–	50	95	87
<i>Choanephora cucubitarum</i>	74	42	44	100	60	70	70	50
<i>Streptomicetas</i>	100	95	100	100	100	0	99	100
<i>Aspergillus niger</i>	91	–	75	99	50	93	100	95

стве продукта получается не чистый хитин, а комплекс биополимеров клеточной стенки грибов. Для гифомицетов - это в основном хитин-глюкановый комплекс, а для муковых грибов - это хитозан-хитин-глюкановый комплекс.

Следует также отметить, что в некоторых публикациях к числу грибов часто относят стрептомицеты (*Streptomyces*) [47, 48], а наиболее эффективная сорбция металлов достигается с помощью хитозан-глюканового комплекса, получаемого именно из этого сырья. Источником получения такого сорбента могут служить отходы микробиологической промышленности, доступные в больших количествах [49]. Однако по современным представлениям стрептомицеты грибами не являются. По основным признакам они ближе к бактериальным организмам.

Установлено, что хитозан-глюкановый комплекс, получаемый из низших грибов, может успешно использоваться для извлечения ионов переходных металлов из водных растворов. Однако на эффективность сорбции существенно влияет способ их получения [50-52]. Это влияние было детально изучено на примере *A. niger*. При этом учитывались такие факторы, как концентрация и температура раствора NaOH, а также продолжительность обработки при доступе воздуха и в атмосфере азота. Более высокие сорбционные характеристики наблюдались у образцов, полученных наиболее жесткой обработкой исходного сырья (40%-ный раствор щелочи при температуре кипения). Примечательной особенностью полученных таким образом препаратов является способность сорбировать Mn, который практически не сорбируется хитозаном животного происхождения [50]. Это объясняется увеличением выхода хитозана при более жесткой обработке биомассы грибов.

Интересно также отметить, что хитозан, выделенный из грибного мицелия, обладает еще более высокой сорбционной способностью, чем хитозан, выделенный из клеточной стенки грибов. Об этом свидетельствует исключительно высокая сорбционная способность такого хитозана по отношению к мышьяку [53]. Показано, что химически обработанный мицелий некоторых видов низших грибов эффективно извлекает ионы Ag, Zn, Pb, Cu, Ni, Co, Cd, Cr, Mn и др. металлов из водных растворов. Высокой сорбционной способностью по отношению к тяжелым металлам обладает также бумага, приготовленная с добавлением такого мицелия.

В большинстве исследований сорбенты, получаемые из клеточных стенок грибов, используются в виде порошка, которым можно заполнять эксперимен-

тальные фильтрационные колонки. Предпринимаются попытки улучшить эксплуатационные характеристики таких сорбентов. В частности, аналогично мембранам из хитозана [54], непосредственно из гиф получать материал, подобный фильтровальной бумаге [55], или нетканые материалы с добавками других волокон. Известны также попытки использовать для извлечения тяжелых металлов нативный грибной мицелий, который во многих случаях оказывается достаточно эффективным для извлечения ионов Cr, Au, Co, Ag, As, Pt и др. [4, 7, 56, 57].

Хитозан-глюкановый комплекс, получаемый из низших грибов, позволяет удалять из воды также грамположительные бактерии [58]. Нативный мицелий ряда базидиальных грибов способен разлагать в почве и, возможно, в воде многие органические токсичные вещества, например, диоксин, ДДТ, нафталин, бензопирин и др. [59].

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что грибной хитин и хитозан имеют существенные преимущества перед соответствующими сорбентами, получаемыми из ракообразных. Эти преимущества можно, скорее всего, объяснить различиями в надмолекулярной структуре полимеров. В панцирях ракообразных макромолекулы хитина находятся в виде хаотично переплетенных и плотно упакованных микрофибрилл. При такой структуре эффективная сорбционная поверхность микрофибрилл невелика, так как внутренняя поверхность волокон сорбента трудно доступна для жидкости.

В клеточной стенке грибов микрофибриллы расположены более рыхло в виде пространственной решетки, а промежутки между ними заполнены глюканами, обладающими высокой проницаемостью для водных растворов. Благодаря этому обстоятельству и субмикронной толщине клеточной стенки в процессе сорбции эффективно участвует вся поверхность микрофибрилл, площадь которой может превышать 1000 м^2 на грамм сорбента. Достичь таких показателей путем измельчения хитина ракообразных не удастся.

Основным недостатком низших грибов является слабая механическая прочность их мицелиальных волокон. Кроме того, при высыхании волокна склеиваются между собой. В сухом состоянии такие материалы становятся хрупкими, легко растрескиваются и пылят, а во влажном - заметно набухают и закупоривают колонки. Поэтому хитинсодержащую мицелиальную массу низших грибов обычно использовали как добавку к другим волокнам или наносили на различные подложки [54].

Для улучшения технологических характеристик усилия многих исследователей были направлены на получение пленок или волокон непосредственно из хитин-хитозановых полимеров. Для этого сначала получали вязкие растворы хитина, хитозана или их производных, затем формовали пленки или вытягивали нити и, наконец, полученный материал снова переводили в твердое состояние. Все это, естественно, увеличивает стоимость таких сорбентов. Видимо, этим и объясняется тот факт, что до сих пор не разработано ни одной реальной технологии промышленного применения хитин-хитозановых сорбентов, полученных из панцирей ракообразных, или низших грибов. Из этого следует, что для реализации потенциальных возможностей хитиновых сорбентов необходимо искать более совершенные технические решения.

Сорбенты из высших грибов. Анализ потенциальных источников хитина показывает, что большая группа высших грибов (*Higher Basidiomycetes*) долгое время оставалась практически без внимания. В то же время известно, что именно среди высших грибов встречаются виды с уникально высоким содержанием хитина в клеточной стенке [60]. Почти у половины изученных видов высших грибов содержание хитина в клеточной стенке превышает 50%, а у гриба *Fomes*

endopolus достигает 65%, и по этому важному показателю высшие грибы значительно превосходят низшие грибы. Уже первые исследования высших грибов [61, 62] показали, что создать волокнистые хитинсодержащие материалы можно просто за счет сохранения природного строения соматических структур грибов - гиф. Из высших грибов можно подобрать грибы-продуценты, имеющие высокое содержание хитина в клеточных стенках гиф и хорошие физико-механические качества мицелиальных волокон. Имеющееся разнообразие видов высших грибов позволяет также обеспечить возможность их выращивания в промышленных масштабах [63].

Хорошо известно, что вегетативные гифы грибов - это линейные или разветвленные нити, имеющие цилиндрическую форму с гладкой поверхностью. Для получения волокнистого хитинсодержащего материала из гиф необходимо удалить живой протопласт и убрать другие растворимые компоненты клеточной стенки. Нерастворимая часть клеточной стенки высших грибов представляет собой комплекс двух полисахаридов - хитина и глюканов [60]. У некоторых видов имеются также пигменты - меланины. Хитин в клеточной стенке грибов имеет микрофибриллярную форму с толщиной микрофибрилл 15-25 нм и длиной до 1-2 мкм. Микрофибриллы представляют собой линейные пучки макромолекул хитина. Глюканы являются аморфной матрицей, обеспечивающей связь между микрофибриллами. Такое сочетание компонентов придает клеточной стенке хорошие физико-механические свойства и обеспечивает сохранение ее природной структуры. Меланины в основном растворены в глюкановой матрице, но могут находиться и в виде микрокристаллов. Биологическая роль меланинов заключается, вероятно, в обеспечении устойчивости клеточной стенки к действию литических ферментов и других химических реагентов в окружающей среде. Кроме того, меланиновые пигменты, являясь антиоксидантами, защищают живую клетку от воздействия УФ и более жесткого проникающего излучения. Поэтому целесообразно не удалять полностью меланины из клеточной стенки в процессе химической переработки исходной биомассы.

Для сохранения нативного волокнистого строения были разработаны специальные способы механической и химической обработки биомассы грибов [25]. В результате удалось получить волокнистый хитинсодержащий материал с толщиной волокон 3-5 мкм и длиной до нескольких миллиметров. Эти волокна представляют собой полые трубки с толщиной стенки от 0,2 до 1 мкм. В зависимости от требований химический состав волокон можно менять в довольно широких пределах изменением режима обработки сырья. При этом содержание хитина может меняться от 60 до 95%, глюканов - от 5 до 35% и меланинов - от 0 до 10%. Рентгеновские- и ИК-спектры полученных препаратов показывают характерные для хитина максимумы. В сухом состоянии материал обладает высокой пористостью с преобладанием пор размером 5 нм [62].

Материалы на основе хитина и хитозана базидиальных грибов получили название "Микотон". Базовый материал на основе хитина имеет индекс "Ch" (Микотон-Ch). Используя метод Музарелли [64], хитин базового материала можно модифицировать, переведя его в хитозан, и получить хитозан-глюкановые или хитозан-глюкан-меланиновые волокна. В зависимости от температуры, продолжительности обработки и концентрации щелочи хитозан будет иметь разную степень дезацетилирования. Волокнистый материал на основе хитозана получил индекс "Chs" - (Микотон-Chs). В отличие от других хитиновых сорбентов, получаемых из панцирей ракообразных и низших грибов. Микотон обладает прочной тонковолокнистой структурой и практически не набухает в водной среде, что обеспечивает ему весьма ценные технологические качества. В нем

полностью отсутствуют минеральные примеси, что делает материал практически беззольным (менее 1%) и обеспечивает дополнительное компактирование вторичных отходов за счет сжигания. Микотон имеет очень развитую поверхность (до 1000 м² на грамм) и высокую гигроскопичность. Его волокна отличаются высокой механической прочностью и эластичностью, устойчивы к действию сильных кислот и щелочей, органических растворителей, УФ и ионизирующего излучения, биологически инертен. Материал не теряет указанных свойств до температуры 150 °С. Волокнистая структура и развитая поверхность Микотона определяют такие важные особенности, как высокие кинетические параметры процесса сорбции, возможность производить бумагоподобные и нетканые материалы заданной плотности и пористости, а также способность к образованию разнообразных композитов и модификаций, что открывает практически неограниченные возможности получения материалов с заданными сорбционными и технологическими характеристиками.

Исследования сорбционных свойств Микотона и его модификаций показали весьма высокую эффективность полученных материалов по отношению к актинидам (уран, нептуний, плутоний, америций, кюрий), многим долгоживущим продуктам деления (цезий, стронций, редкие земли, цирконий, палладий и др.) [65], а также тяжелым металлам (свинец, ртуть, хром, кадмий, висмут) [66].

МОДИФИКАЦИЯ ХИТИНОВЫХ СОРБЕНТОВ

Под модификацией подразумевается в первую очередь химическая обработка исходного хитина, приводящая к изменению отношения amino- и ацетиламидных групп и к получению в итоге хитозана. В большинстве известных случаев хитин и его простейшую модификацию - хитозан - использовали в относительно чистом виде, однако в настоящее время известно довольно много химических модификаций этих биополимеров, полученных введением новых функциональных групп, улучшающих общие сорбционные показатели или открывающих принципиально новые возможности для решения специальных задач.

Адсорбционные свойства хитозана по сравнению с хитином выражены сильнее, благодаря наличию первичных аминных групп. Поэтому способность хитозана сорбировать тяжелые металлы во многом зависит от степени деацетилирования исходного материала и распределения ацетильных групп вдоль полимерной цепи [20]. При переходе от хитина к хитозану может меняться даже порядок адсорбируемости различных металлов. Так в случае хитина это - $Pb > Cd > Hg > Cr$, тогда как в случае чистого хитозана наблюдается другая последовательность: $Hg > Pb > Cd > Cr$ [67, 68].

Из других модификаций хитин - хитозановых полимеров с целью улучшения сорбционных свойств, судя по числу публикаций, на первое место следует поставить получение поперечно-сшитых полимеров. Для этого проводят обработку сшивающими агентами, например, эпихлоргидрином или глутаральдегидом [67,69-82]. Относительно хорошо изучены сорбционные свойства сульфатных, сульфитных, хлоридных и фосфатных производных хитина и хитозана [69-71, 76, 83-98]. Все эти производные во многих случаях проявляют гораздо более высокую сорбционную способность по сравнению с чистым хитином и хитозаном (см. табл. 3). Дополнительным преимуществом многих модификаций является существенное улучшение кинетических характеристик за счет изменения кристалличности [99]. Высокую эффективность при сорбции некоторых щелочноземельных металлов показал карбоксиметилированный хитин [26, 100-102] (см. табл. 4). N-метил-, N-этил-, N-пропил-, N-бутил-, N-гексил-, N-кар-

Таблица 3. Сорбция ионов металлов на хитине, хитозане и их поперечносшитых фосфатных производных [88]

Сорбент	Сорбционная емкость для Me^{2+} , мг.экв./г								
	Mn	Ni	Cu	Zn	Cd	Mg	Ca	Sr	Ba
Хитин	0,3	0,5	0,3	0,4	0,4	0,6	0,4	0,4	0,4
Хитинфосфат	1,1	1,6	1,0	2,1	0,9	1,1	1,4	1,4	1,3
Хитозан (0,55)	1,1	3,5	5,3	5,5	6,5	0,3	0,8	1,5	1,1
Хитозанфосфат (0,55)	2,2	1,7	2,0	1,5	1,9	2,4	1,9	2,2	0,4
Хитозан (0,03)	2,3	4,8	3,2	4,9	0,5	0,4	0,6	0,8	0,5
Хитозанфосфат (0,03)	2,3	2,6	2,7	3,0	1,3	1,5	1,7	2,0	1,8

Таблица 4. Коэффициенты распределения ЦЗМ в питьевой воде при сорбции Микотон-ом и его модификациями

Сорбент	Коэффициент распределения, мл/г				
	Pu-239	Am-241	Cs-137	Sr-90	Co-60
Микотон-Ch	970	6800	30	300	320
Микотон-Cs	600	2500	25 000	350	280
Микотон-Sr	800	3500	45	1100	–
Микотон-Cs, M40	3800	6700	14 000	400	–

боксиметил-, N-О-карбоксибензилхитозан показали высокую избирательность в сорбции отдельных элементов, а диметил- и триметилхитозан оказались хорошими флокулянтами [72, 76, 80, 103-116].

Производное хитина с дитиокарбаматом является хорошим сорбентом по отношению к ряду металлов [117], сохраняя свою высокую эффективность в широком диапазоне pH (от кислых до щелочных растворов) [106]. Дитиокарбоксихитозан представляет собой водорастворимое соединение и может использоваться как в качестве флокулянта, так и сорбента [118], хитозандитиокарбамат является хорошим сорбентом с высокими кинетическими характеристиками [86].

Известно также много других производных хитозана, обладающих улучшенными сорбционными характеристиками [16, 22, 26, 77, 127-134]. Например, обработкой эпихлоргидрином и тиомочевинной получено меркаптопроизводное хитозана, обладающее очень высокой сорбционной способностью [119]. Из хитозана получены глутамат-глюкан и аминоклутамат-глюкан, хелатирующие полиамфолиты [120], а также Na-2,3-эпоксипропилсульфонат хитозана, эффективно извлекающий тяжелые металлы [121]. Хитозан, содержащий в качестве функциональной группы иминодиуксусную кислоту, показал высокую сорбционную эффективность по отношению к металлам платиновой группы [122-125]. Галактозилпроизводные хитина и хитозана, а также полимерные кетиминовые производные хитозана проявляют повышенную сорбционную способность по отношению к тяжелым металлам [126]. Получены производные хитозана и салицилальдегида с улучшенными сорбционными характеристиками [113]. Наконец, сам хитозан-глюкановый комплекс, получаемый из грибной биомассы, в целом ряде случаев проявляет более высокие сорбционные характеристики, чем чистый хитин или хитозан [47, 52].

Хитин-глюкановый комплекс "Микотон", получаемый из высших базидиальных грибов, тоже может быть модифицирован дезацетилированием. Однако получаемый хитозан остается в виде хитозан-глюкан-меланинового комплекса. В отличие от чистого продукта он практически не растворяется в кислотах и не меняет первичную волокнистую структуру матрицы. Возможна и химическая прививка дополнительных функциональных групп, однако это дорогой и трудоемкий процесс. Более экономичным и не менее эффективным способом получения других модификаций оказалось получение композитов путем объединения с другими волокнами или неорганическими соединениями, придающими материалу дополнительные сорбционные или технологические свойства. В частности для усиления сорбционной способности по отношению к цезию был разработан весьма устойчивый композит с ферроцианидом меди. Этот сорбент получил название Микотон-Cs. Обработкой Микотона перманганатом калия получена модификация, обладающая повышенными сорбционными свойствами по отношению к стронцию, получившая название Микотон-Sr [63, 66, 135].

Для придания материалу магнитных свойств был разработан способ, основанный на том, что волокна полые. Для этого кристаллы ферромагнитных материалов вводятся внутрь волокон и сорбент приобретает способность притягиваться к магниту [25]. Композитная модификация с магнетитом получила название Микотон-M. Разработана также комплексная модификация Микотон-Cs-M. Как видно из табл. 4, приобретая дополнительные сорбционные свойства, композит практически не теряет сорбционных характеристик исходного материала.

Получен композит Микотона с углеродным волокнистым материалом, обладающий повышенной электропроводностью. Разрабатываются также другие модификации хитиновых сорбентов (Микотона), обладающих заданными сорбционными и технологическими характеристиками.

СОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ХИТИНОВЫХ СОРБЕНТОВ

Механизм сорбции ионов металлов. Понимание механизма сорбции металлов тем или иным сорбентом имеет не только теоретическое значение. С одной стороны оно позволяет управлять процессом сорбции, добиваясь максимальной эффективности оптимизацией условий, а, с другой стороны, позволяет целенаправленно подбирать соответствующие пути и методы модификации исходного материала. Уже накоплен большой практический и теоретический материал, который требует обобщения, уточнения и дополнения. В последние годы опубликован ряд монографий, обзоров и статей, в которых рассматриваются общие вопросы, связанные с механизмом сорбции металлов [14, 15, 17, 19, 26, 56, 110, 136-142]. Тем не менее до сих пор нет глубокого понимания процессов взаимодействия большинства ионов металлов с хитином и его производными в зависимости от физико-химических условий. Одной из причин здесь, по-видимому, являлось отсутствие до последнего времени хорошо очищенных и сертифицированных образцов самих базовых сорбентов - хитина и хитозана, с которых нужно начинать. Другие проблемы связаны с полифункциональностью рассматриваемых сорбентов и многообразием химических элементов, с которыми хитин и его производные вступают во взаимодействие. Поэтому переход к более глубокому изучению механизма сорбции отдельных элементов определенными сорбентами позволил получить довольно много интересных результатов и сделать важные выводы [23, 144-150]. Так, сравнивая сорбционные свойства природных полимеров и их полиаминных производных по отношению к ртути, авторы [23] убедительно показали, что ответственной за сорбцию ртути является

аминогруппа. И особенно следует отметить работу [146], которая демонстрирует хорошо продуманную постановку эксперимента и тщательный анализ результатов, полученных на сложном современном оборудовании. Авторы провели совместное рассмотрение характера изотерм сорбции Cr^{3+} хитином и хитозаном, а также данных, полученных с помощью сканирующего электронного микроскопа, анализатора дисперсии энергии рентгеновских лучей и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии. Это позволило не только убедиться в сосуществовании поверхностной адсорбции агрегатов нерастворимых соединений хрома параллельно с образованием комплексных соединений сорбента с металлом в объеме сорбента, но и определить атомы в составе сорбента, ответственные за образование таких комплексов.

Учитывая результаты приведенных работ, естественно предположить, что кроме состава и чистоты используемого сорбента большое влияние на механизм сорбции будет оказывать природа и валентное состояние сорбируемого металла, а также химический состав и pH среды. Уже сейчас в литературе имеется достаточно много данных по сорбции металлов, представляющих практически все группы Периодической Таблицы Менделеева и мы надеемся, что предложенная ниже систематика этих данных позволит выявить некоторые полезные закономерности.

Сорбция тяжелых металлов. Сорбция целых групп тяжелых металлов сорбентами на основе хитин-хитозана изучена достаточно широко как в теоретическом, так и в прикладном плане [3, 14, 15, 19, 20, 26, 127, 151]. Однако, чтобы проследить закономерности сорбции, связанные с электронной структурой рассматриваемых металлов, а также с зарядом и структурой сорбируемых ионов, на наш взгляд, было бы полезнее систематизировать имеющиеся экспериментальные данные в порядке расположения этих металлов в Периодической Таблице Менделеева.

Металлы первой группы. Хорошо известно, что хитин и хитозан вообще не сорбируют щелочные металлы или сорбируют крайне слабо [15]. Не сорбирует щелочные металлы, включая цезий, и хитин-глюкан-меланиновый комплекс Микотон, получаемый из высших грибов [66], хотя живые грибы способны накапливать радиоактивный цезий в больших количествах [5] и причины этого явления пока не установлены.

В отличие от щелочных металлов, элементы подгруппы меди (Cu, Ag, Au) относятся к числу переходных металлов, отличительной особенностью которых является наличие в электронной оболочке d-электронов. Все эти элементы хорошо сорбируются и именно с медью проведено наибольшее число работ по изучению механизма сорбции ионов двухвалентных металлов хитином, хитозаном и их производными [19, 26, 75, 110, 116, 150, 152-154]. В большинстве проведенных исследований показано, что хитозан сорбирует медь лучше, чем хитин [14, 15, 139, 155]. Изучение кинетики сорбции показало, что лимитирующим фактором является процесс диффузии ионов металла внутрь сорбента [15, 43, 139]. Хитин и хитозан, модифицированные поперечным сшиванием, проявляют по отношению к меди более высокие сорбционные способности [67, 69, 74], что объясняется уменьшением кристалличности хитозана в результате сшивания. Кроме того, в случае поперечно сшитого хитина расширяется эффективный интервал pH, что существенно облегчает возможность решения практических задач [156]. При этом сшивание хитозана не только изменяет эффективность сорбции меди, но и приводит к изменению относительной сорбции других двухвалентных металлов. Следует заметить, что среди других металлов медь оказалась гораздо более чувствительной по отношению к сшивке хитозана, чем хи-

тина. Поэтому эффективность сорбции меди иногда связывают с содержанием первичных аминогрупп в полимерах [67]. Поперечно сшитый хитозан с введенными в смолу ионами металлов, например, Cd, Ni, Fe и др., показал еще более высокую сорбционную способность по отношению к меди [157].

Для практических целей, связанных с очисткой сточных вод от меди, авторы рекомендуют несколько разновидностей применения хитин-хитозановых сорбентов. В том числе:

1) проточная колоночная система с использованием порошкообразного хитозана [43];

2) пористые хитиновые и хитозановые пленки, нанесенные на твердую основу, например, угольный сорбент [111];

3) диспергированный гелеобразный хитозан для очистки сточных вод гальванического производства, содержащих много меди и других металлов [158].

Химическая модификация хитина и хитозана также может существенно усилить их сорбционные свойства по отношению к меди [77, 107, 110]. Полученные N-алкилхитозаны продемонстрировали высокую специфичность по отношению к меди. Высокую способность извлекать из растворов ионы меди и других металлов также показал N-дитиокарбоксихитозан, получаемый введением в скелет молекулы хитозана карбоксиметильных групп [80, 122, 123]. В результате сочетания хитина с малеонитрилдитиолат ионом получен сорбент, обеспечивающий возможность эффективного предварительного концентрирования следовых количеств меди и других металлов для аналитических целей. В результате становится возможным спектрофотометрическое определение меди при ее концентрации в интервале от 10^{-7} до 10^{-3} моль/л [159]. Практически полное удаление меди из водных растворов обеспечивает сорбент на основе хитозана, модифицированного Na-2,3-эпоксипропилсульфонатом [121].

Сорбция двух других металлов из подгруппы меди - серебра и золота - изучена значительно слабее. Известно, что серебро сорбируется на хитозане немного лучше, чем медь - 3,3 и 3,1 ммоль катиона/г сорбента соответственно. Правда, в литературе имеются и противоречивые данные [24]. Взаимодействуя с хитозаном, серебро образует прочное труднорастворимое соединение, которое может быть использовано для удаления из водных растворов цианид-ионов [160]. Как и в случае меди, гораздо более эффективными сорбентами серебра являются продукты химической модификации хитина и хитозана. В частности, дитиокарбамат хитина [117] или измельченный сорбент на основе поперечно сшитого хитозана [161] сорбируют серебро намного лучше, чем обычный хитин или хитозан. Высокие сорбционные показатели по отношению к серебру и золоту достигнуты на ионообменной смоле на основе хитозана [162, 163]. Обменная емкость по золоту обычно значительно лучше, чем по серебру в аналогичных условиях и здесь она составляет 5,8 ммоль/г [18, 69]. Исключительно высокой сорбционной способностью по отношению к золоту обладают N-(2-пиридилметил-, N-(2-тиэнилметил-) и N-{3-(метилтио)пропил}хитозан [115] и другие производные хитозана [162, 164]. Предпринята попытка использования природного хитозана в качестве сорбента для извлечения золота из природных вод и отработки оптимальных условий проведения этого процесса [136].

Подводя итоги по сорбции элементов первой группы, следует отметить, что хитин и хитозан хорошо сорбируют только ионы переходных металлов, имеющие в своей структуре d-электроны. Причем эффективность сорбции хитозаном увеличивается в ряду Cu^{2+} , Ag^+ , Au^{3+} [136], т.е. с увеличением ионного радиуса сорбируемого иона.

Металлы второй группы. Сорбция основных представителей второй группы Периодической Таблицы Менделеева, щелочноземельных элементов (Be, Mg, Ca, Sr, Ba, Ra), хитином и его производными изучена относительно слабо. Связано это с тем, что элементы этой подгруппы, так же, как и щелочные металлы, на хитине и хитозане сорбируются очень плохо, или не сорбируются вообще [15, 165]. Тем не менее, имеются сообщения о том, что можно повысить сорбционную способность хитина по отношению к кальцию и магнию путем нанесения пористой хитиновой пленки на твердую подложку с развитой поверхностью. Сорбция стронция хитинсодержащим сорбентом Микотон подробно изучалась в связи с проблемой дезактивации ЖРО [166]. В результате было установлено, что с увеличением pH раствора сорбция стронция существенно усиливается. Так, при изменении pH с 5 до 11 коэффициент распределения стронция увеличивается с 300 до 2000. Заметное увеличение сорбционной способности по отношению к магнию, кальцию и барии обнаружено в исследованиях с использованием фосфорилированного хитина и хитозана [88]. При этом было показано, что сорбция кальция увеличивается при повышении pH, а в связывании ионов металлов участвуют не только радикалы, привитые в результате фосфорилирования, но и ОН-группы, а также ацетилированные радикалы.

Относительно хорошие сорбционные свойства по отношению к кальцию и барии проявил 6-0-карбоксиметилированный хитин, хотя и отмечено, что кальций сорбируется заметно хуже бария [100]. Методами потенциометрии и микрокалориметрии было показано, что сорбция кальция на N-карбоксиметилхитозане происходит не по хелатному механизму, как для других двухвалентных металлов [141], а вероятней всего за счет поверхностной абсорбции агрегатов трудно растворимых соединений. Судя по наблюдающейся тенденции увеличения сорбируемости элементов при переходе сверху вниз, еще большее увеличение сорбируемости можно ожидать для радия, экспериментальные данные для которого пока отсутствуют.

Вторая подгруппа (цинк, кадмий, ртуть) состоит из представителей переходных металлов - носителей d-электронов, отличающихся повышенной сорбируемостью на хитине и его производных. Поэтому сорбционные свойства этих элементов исследованы очень подробно. При этом наибольшее внимание уделено ртути, что, вероятно, объясняется большой опасностью ее попадания в водные системы и изучением возможностей использования хитиновых сорбентов для ее удаления. В работах отмечается большая способность к накоплению кадмия и ртути в живых грибах [1, 4, 6]. Очевидно, что эта способность связана с наличием хитина в клеточных стенках грибов.

Особенности сорбции цинка и кадмия исследованы достаточно подробно, как на разных хитиновых и хитозановых сорбентах, так и при разных физико-химических условиях. На хитине и хитозане цинк и кадмий обычно сорбируются хуже, чем ртуть при тех же условиях [15, 70, 71, 167], но при оптимизации условий сорбируемость этих металлов можно повысить, например за счет повышения pH [168]. Сорбционная способность природного хитозана по отношению к цинку и кадмию настолько высока, что его можно использовать для удаления этих элементов из сточных вод на фильтрационных колонках [43]. Для набивки колонки можно использовать хитозановые гранулы с высокой пористостью, обладающие по отношению к кадмию хорошими кинетическими и емкостными характеристиками. Обменная емкость гранул может достигать 518 мг кадмия на 1 г сорбента [169, 170]. Близкие значения сорбционной емкости по кадмию были получены также на хитине при его извлечении из морской воды [151, 171].

Существенно повысить сорбцию кадмия можно физической модификацией природного хитозана, улучшающей кинетические характеристики сорбента [172], или использования 6-О-карбоксиметилированного хитина [100]. Для удаления из сточных вод кадмия особенно эффективным оказалось применение хитинового комплекса с малеонитрилдитиолятом [159]. Фосфорилирование хитина также заметно улучшает сорбцию кадмия [88]. Сорбируемость кадмия на хитиновом сорбенте "Микотон-Сн" при низких значениях pH невелика, однако при $\text{pH} > 4$ коэффициент распределения кадмия превышает 1000. В хлоридной и сульфатной среде сорбция кадмия повышалась, а в нитратной и ацетатной среде - слегка понижалась по сравнению с водой [63, 173].

Исключительно высокая сорбционная способность немодифицированных хитина и хитозана по отношению к ртути отмечается всеми авторами [67, 69, 174-178]. Как и следовало ожидать, аналогично цинку и кадмию [179], ртуть лучше сорбируется хитозаном, чем хитином и это различие увеличивается с повышением pH [129]. Поэтому хорошим сорбентом для ртути может быть, например, активированный уголь, импрегнированный хитозаном.

Специальные модификации хитина или хитозана позволяют повысить сорбционные свойства этих сорбентов по отношению к цинку, кадмию и ртути. В частности, определенные преимущества дают поперечно сшитые полимеры. Например, на поперечно сшитом хитозане ртуть сорбировалась лучше других тяжелых металлов [67]. Максимальную эффективность по отношению к ртути показал кадмий-хитозановый комплекс в виде ионнообменной смолы [157]. Исключительно высокая обменная емкость по отношению к ртути (более 2 г на 1 г сорбента) была достигнута на поперечно сшитом пористом хитозане с удельной поверхностью 84 м²/г. Высокие емкостные характеристики показали также N-алкилхитозаны [107]. Меркаптопроизводные хитозана удаляют ионы ртути из водных растворов с большим содержанием СГ в широком интервале pH [119, 177]. Водорастворимые производные хитозана также эффективны для удаления ртути из сточных вод, содержащих взвешенные частицы [118, 121].

Весьма высокой сорбционной способностью по отношению к ртути обладает также волокнистый хитиновый сорбент, Микотон-Сн [63, 173]. Коэффициент распределения ртути достигает величины порядка 10⁴ мл/г в широком диапазоне pH (от 2 до 6). Причем наличие в растворах анионов Cl⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻ и Ac⁻ не существенно влияют на сорбцию этого металла.

Как и в случае элементов первой группы Периодической Таблицы, хитозан гораздо лучше сорбирует ионы переходных металлов, обладающие б²-электронами. При этом эффективность сорбции заметно увеличивается в ряду: цинк-кадмий-ртуть [136], что полностью коррелирует с увеличением ионного радиуса сорбируемого металла.

Элементы третьей группы. В состав третьей группы Периодической Таблицы Менделеева входит наибольшее число элементов. Основная подгруппа включает пять *s,p*-элементов (бор, алюминий, галлий, индий, таллий). Подгруппа переходных металлов включает четыре основных *d*-элемента (скандий, иттрий, лантан, актиний) и две дополнительные серии *f*-элементов (лантанидная и актинидная), по 14 элементов каждая. В сумме это более трети всей Периодической Таблицы. Поэтому сорбционное поведение элементов актинидной серии, имеющих большое значение, будет рассмотрено отдельно.

Сведения о сорбции алюминия хитином и его производными весьма немногочисленны и противоречивы. По данным одних авторов этот металл не сорбируется ни хитином, ни хитозаном [15, 180]. И в то же время хорошая сорбционная способность по отношению к алюминию отмечена на пористых хитиновых плен-

ках, нанесенных на твердую подложку [181]. Кроме того, был разработан Fe(II)-хитозановый комплекс, обладающий высокими сорбционными свойствами по отношению к алюминию и предложенный в качестве энтеросорбента для устранения побочных явлений, связанных с продолжительным лечебным приемом алюминийсодержащих фосфатов [182]. Поперечно сшитый Cu(II)-хитозановый комплекс предложен для отделения алюминия от других металлов [112]. Этот же комплекс использовался для отделения галлия и индия от цинка [112, 183].

Сорбция металлов подгруппы скандия на хитине и хитозане изучена слабо. Все немногочисленные сведения относятся к сорбции лантанидов, в частности церия, европия, тербия и туллия [184]. По отношению ко всем четырем элементам хитозан проявил, хотя и умеренную, но более высокую сорбционную способность, чем хитин. Отмечено, что четырехвалентный церий сорбируется лучше, чем трехвалентный. Большой интерес для сорбционного выделения и разделения лантанидов между собой представляет хитозан, модифицированный комплексономами типа этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) [133, 134]. Сорбция церия, прометия и европия изучалась также на хитиновом сорбенте, Микотон, в зависимости от pH раствора [66]. Установлено, что максимальные значения коэффициентов распределения (более 1000 мл/г) для всех исследованных лантаноидов наблюдаются в интервале pH от 4 до 7. В случае церия замечено повышение коэффициентов распределения при увеличении $pH > 7,5$, что может быть связано с окислением церия до четырехвалентного состояния в щелочной среде.

К сожалению следует отметить, что имеющихся в литературе данных явно недостаточно для подробного рассмотрения общих закономерностей сорбционного поведения элементов третьей группы.

Металлы четвертой группы. Из металлов основной подгруппы s, p-элементов (Ge, Sn, Pb) достаточно хорошо изучена сорбция свинца, представляющего наибольшую опасность для окружающей среды и здоровья человека. Поведение свинца в сорбционных системах, использующих хитин или его производные, неоднозначно и в значительной степени зависит от типа модификации и химического состава растворов. При сорбции чистыми хитином и хитозаном свинец извлекается довольно умеренно [15, 69, 144, 167, 180, 185], располагаясь в конце ряда Cu, Zn, Cr, Cd в случае хитина в колоночном варианте [43]. Хитин в виде тонкой пористой пленки дает гораздо лучшие результаты [181], особенно в интервале pH 1,5-6 [186]. При использовании хитозана этот интервал сдвигается в более щелочную область (pH 2,5-7,0). Как и в случае с другими металлами, поперечно сшитые модификации хитина и хитозана обладают более высокой сорбционной способностью по отношению к свинцу [67, 69, 186]. Различные химические модификации хитина и хитозана также хорошо сорбируют свинец. Например, N-дитиокарбоксихитозан показал высокую степень извлечения металла из водных систем [118], N-карбоксиметилхитозан хорошо сорбирует ионы свинца при повышенной температуре [116], а N-алкилхитозаны имеют высокие емкостные характеристики [127]. Хитиновый сорбент Микотон-Ch также показал очень высокие сорбционные способности по отношению к свинцу - $K_d > 10^4$ мл/г при $pH > 3$ [63, 66]. Наличие в растворе анионов Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} и ацетат-иона лишь незначительно снижает эффективность сорбции.

Была предпринята попытка использовать хитозан для извлечения олова из водных растворов [187]. Полученные результаты подтвердили такую возможность и в то же время показали, что олово сорбируется несколько хуже, чем свинец. Чистые хитин и хитозан плохо сорбируют германий, поэтому для его селективного извлечения авторы работы [188] использовали специально синтезированную модификацию, N-2,3-дигидроксипропил-хитозан. На колонке, запол-

ненной этим "сорбентом, проводили отделение германия от теллура и бора. Сорбцию проводили в слабо щелочной среде, пропуская через колонку до 90 колоночных объемов. Обменная емкость сорбента составила 1,4 ммоль/г.

Из подгруппы d-элементов в сорбционных системах с хитином и хитозаном Исследовались титан и цирконий [180, 184]. Ни один из этих сорбентов в чистом виде титан практически не сорбирует. Его сорбция несколько улучшается лишь при использовании модифицированного хитозана. В отличие от титана цирконий прекрасно сорбировался на обоих полимерах без всякой модификации.

В заключение можно сказать, что ионы металлов, представляющих обе подгруппы, хитином и хитозаном сорбируются примерно одинаково, причем эффективность сорбции увеличивается при переходе в нижнюю часть группы, т.е. с увеличением ионного радиуса металла.

Металлы пятой группы. Из шести металлов пятой группы Периодической Таблицы практически только два представителя подгруппы *sp*-элементов (мышьяк и висмут) и один представитель переходных d-элементов (ванадий), удостоились внимания исследователей, занимающихся сорбцией переходных металлов с использованием хитина и хитозана. Причиной интереса и здесь является принадлежность этих элементов к числу ядовитых и необходимость тщательной очистки некоторых промышленных отходов, особенно от мышьяка.

Известно, что многие грибы обладают способностью накапливать большие количества мышьяка из почвы [189]. Поэтому не случайно хитин-хитозановая смесь показала хорошие результаты при очистке подземных вод от мышьяка [190]. Высокую эффективность при извлечении мышьяка из сбросных вод проявил также хитин, применяемый в виде пористой пленки на твердой подложке [181]. Довольно эффективная сорбция мышьяка из водных растворов наблюдалась также при использовании хитозана, полученного из грибов [53]. Пожалуй наилучшие результаты были получены на колонке, заполненной гелеобразным хитозаном, модифицированным молибдатом [191]. Наиболее эффективная сорбция наблюдалась при pH3. До протекания через колонку можно было пропустить до 200 колоночных объемов. Обменная емкость в этих условиях составила 200 мг мышьяка на 1 г молибдена. И в то же время, высокопористая смола на основе хитозана, модифицированного полиэтиленгликолем и хорошо зарекомендовавшая себя при сорбции ртути, урана, кадмия, цинка, меди и никеля, совсем не сорбировала мышьяк [165].

Сорбция висмута из растворов различного состава исследовалась на хитиновом сорбенте Микотон-СН [63, 66]. Коэффициенты распределения были достаточно высокими (около 500 мл/г) в широком диапазоне pH (от 2 до 6). Различная природа анионов, присутствовавших в растворе, заметного влияния на сорбцию висмута не оказывала.

Ванадий является самым легким представителем в подгруппе d-элементов (V, Nb, Ta) и по его сорбционному поведению можно судить о поведении остальных металлов в подгруппе. Для всех трех элементов характерно образование оксианионов, с которыми хитозан реагирует с образованием труднорастворимых соединений, аналогичных полимолибдату [15], обсуждаемому в следующем разделе. На этой основе разработан простой и эффективный метод предварительного концентрирования молибдена при определении его содержания в морской воде [192]. Максимальное извлечение на колонке, заполненной хитозаном наблюдается при pH4. Аналогичная колонка может использоваться также для очистки жидких отходов от ванадия [193]. Предварительно синтезированный поливанадат хитозана рассматривается как самостоятельный весьма эффективный сорбент для очистки загрязненных вод от тяжелых металлов [194].

К сожалению, имеющихся литературных данных пока не достаточно для серьезного обобщения сорбционного поведения элементов пятой группы. Можно лишь предположить, что по аналогии с другими группами, ниобий и тантал должны сорбироваться лучше ванадия.

Металлы шестой группы. Что касается представителей главной подгруппы, *sp*-элементов (кислород, сера, селен, теллур, полоний), то их сорбция на хитине и хитозане практически не исследована. Да и трудно говорить об их самостоятельной сорбции, поскольку эти элементы, как правило, входят в состав анионов.

Из металлов подгруппы *d*-элементов лучше всего исследован хром. Следует иметь в виду, что хром может выступать в двух валентных состояниях: в качестве катиона Cr^{3+} и в качестве аниона Cr_2O_7 . Большинство исследований посвящено сорбции трехвалентного хрома. Надо сразу сказать, что чистые хитин и хитозан трехвалентный хром сорбируют не очень активно [15, 24]. Если сравнить его сорбцию, например, с рядом двухвалентных металлов (Hg, Pb, Zn, Cu, Cd), то сорбируемость хрома как на хитине, так и на хитозане будет наихудшей [186]. И все же относительное преимущество остается за хитозаном. Поперечное сшивание хитина или хитозана практически не дает улучшения сорбционных способностей исходных сорбентов [67]. Изменяя условия сорбции за счет введения в раствор различных солей и кислот, можно изменять эффективность извлечения хрома в широких пределах, доведя ее до практически полного [15, 146]. Поэтому хитин и хитозан все же используются для очистки сточных вод, загрязненных хромом [43, 195]. Высокая сорбционная способность по отношению к хрому была продемонстрирована на хитозане, модифицированном анионными реагентами типа сульфитов, сульфатов, хлоридов, боратов и т.п. и дополнительно обработанных глютаровым альдегидом [70, 71, 87]. После такой обработки эффективность извлечения хрома достигала значений, близких к 100%. Сорбцию Cr^{3+} изучали также на хитиновом сорбенте Микотон-Ch, который показал весьма высокую эффективность извлечения в интервале pH от 3 до 6. Коэффициент распределения при этом приближался к 10^4 мл/г. Наличие в растворе ионов Cr, NO_3^- , Ac^- и SO_4^{2-} лишь незначительно ухудшало сорбцию этого металла [63, 66].

Как уже говорилось, шестивалентный хром присутствует в растворах в виде оксигенированного бихромат-иона, взаимодействующего с хитозаном с образованием нерастворимого соединения, что может быть использовано для его выделения с помощью хитозана [15]. Аналогичная реакция имеет место и в случае шестивалентного молибдена, где образуется полимолибдат хитозана с весовым соотношением Мо/хитозан - примерно 1/1 [15, 196, 197]. Это обстоятельство используется для эффективного выделения молибдена из промышленных отходов и морской воды [180]. В присутствии комплексообразователей, например тиоцианата, происходит селективное осаждение молибдена с очисткой от многих других тяжелых металлов. Полученный полимолибдат может в свою очередь использоваться в качестве селективного сорбента мышьяка [191] и фосфат-иона с которым образуется нерастворимый полифосформолибдат хитозана [198].

К сожалению, о каких-либо закономерностях здесь говорить трудно, поскольку сорбция элементов этой группы в катионной форме исследована только для одного хрома.

Элементы седьмой группы. Элементы основной подгруппы - галогены - имеют большое разнообразие валентных состояний, но чаще всего входят в состав анионов и принимают косвенное участие в процессах сорбции ионов металлов. Однако, находясь в элементарном состоянии, бром и йод могут непосредст-

венно сорбироваться хитозаном [199, 200]. При этом иод сорбируется более эффективно, поскольку он вступает во взаимодействие с хитозаном, образуя довольно прочный комплекс [147]. Наилучшие результаты по сорбции брома и иода были получены при использовании в качестве сорбента хитозана с привитыми полистирольными группами [201].

Из подгруппы d-элементов исследована сорбция практически только одного марганца, причем только в двухвалентном состоянии. Mn^{2+} на хитине и хитозане сорбируется относительно плохо, даже в хлоридной и сульфатной среде [15, 144], располагаясь в конце ряда двухвалентных металлов между кобальтом и железом. Обменная емкость хитозана по отношению к марганцу составляет всего лишь 0,2 ммоль/г [24]. Ни увеличение удельной поверхности хитозана, ни поперечное сшивание не дали существенного увеличения сорбционных показателей [88, 172]. Высокая степень извлечения марганца была достигнута лишь в результате комбинирования хлоридной модификации хитозана и сшивания глутаральдегидом [70]. Использование такого сорбента позволяет количественно извлекать марганец из водных растворов. В результате исследований по извлечению тяжелых металлов из илов с использованием магнитных модификаций хитиновых сорбентов Микотон-Cs-M и Микотон-M были также получены высокие показатели по очистке от марганца [63].

Что касается марганца в семивалентном состоянии, то ион MnO_4^- является сильным окислителем, особенно по отношению к ацетиламидным и аминным группам хитина и хитозана. В результате их взаимодействия марганец восстанавливается до диоксида и прочно удерживается сорбентом. Поэтому исследовать сорбцию собственно иона MnO_4^- хитином и хитозаном не удастся. Однако эта реакция была использована для получения модификации Микотона, обладающей повышенной сорбционной способностью по отношению к стронцию [66]. Сорбционное поведение представителей d-элементов может быть продемонстрировано на сорбции пертехнетат-иона, окислительная способность которого выражена гораздо слабее, не является сильным. Оказалось, что ион TcO_4^- плохо сорбируется, как хитином, так и хитозаном [202].

Металлы триад. Сорбируемость элементов восьмой группы хитином и хитозаном лучше всего изучены на триаде железо-кобальт-никель. Несмотря на значительное сходство химических свойств этих элементов, эффективность их сорбции на хитозане в 0,1 М растворе хлорида калия заметно отличается: хуже всего сорбируется двухвалентное железо и лучше всего - никель [15]. В таком же порядке увеличиваются и емкостные характеристики хитозана по отношению к этим элементам. Отличается сорбция и по кинетике. Быстрее всего равновесие достигается в случае железа и медленнее всего - в случае кобальта. Максимальная сорбция Fe^{2+} была получена на хитозане в 0,1 М растворе сульфата аммония [15]. В этих условиях железо и никель сорбируются примерно одинаково. Также как и во всех остальных случаях, сорбция элементов первой триады на хитине менее эффективна, чем на хитозане [176], однако использование хитина в виде пористой пленки, нанесенной на твердую подложку, существенно улучшает сорбируемость этих металлов.

Фосфорилирование хитина и хитозана с последующим сшиванием биополимеров оказалось весьма эффективным для повышения сорбционной способности по отношению к никелю [88]. N-карбоксиметилхитозан и N-сульфофурфурил хитозан также обладают более высокими сорбционными способностями по отношению к рассматриваемым элементам [105, 116].

Сорбция металлов второй триады - рутения, родия и палладия - изучена несколько хуже. Известно, что рутений относительно слабо сорбируется из водных растворов как хитином, так и хитозаном. Обнаружено, что при использовании дитиокарбамата хитина [163] сорбция рутения существенно повышается. Улучшение сорбции на хитозане наблюдалось также в присутствии KMnO_4 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ [184], однако это, по-видимому, связано с окислением рутения в этой среде до RuO_4 , который либо сорбируется, либо улетучивается, поскольку это легко летучее соединение. Для эффективного извлечения родия (с выходом до 99,9%) предлагается использовать фильтрационную колонку, заполненную поперечно сшитым хитозаном [122, 125]. После насыщения родием хитозан сжигается при 400 °С. Хорошие результаты по сорбции родия и других платиновых металлов были получены при использовании хитозана, модифицированного обработкой сильными комплексообразователями типа полиаминполиуксусных кислот [123, 124, 203]. Палладий показал исключительно высокую способность сорбироваться на хитозане. Поперечно сшитый хитозан способен удерживать до 480 мг этого металла на 1 г сорбента, т.е. около 4,5 ммоль/г [161]. Причем в присутствии меди сорбент проявлял высокую селективность по отношению к палладию, который также хорошо сорбировался на ионообменной смоле, полученной на основе хитозана по методике, описанной в работе [164]. Существенно улучшить сорбцию палладия позволяет карбоксиметилирование хитозана [112], а также использование для этой цели N-(2-пиридилметил)-, N-(2-тиэнилметил)- и M-3-(метилтиопропил)хитозана [115] или других производных [195]. Высокие сорбционные характеристики по отношению к палладию продемонстрировал также Микотон-Сh. Коэффициент распределения палладия при сорбции в слабо кислых нитратных растворах достигает 10^4 мл/г.

Сорбция металлов последней триады (Os, Ir, Pt) изучена в основном на платине. Сорбция этого металла хитозаном показала высокие емкостные характеристики сорбента - до 4,5 ммоль/г [136]. Отличные результаты были получены при использовании N-(2-пиридилметил)-, N-(2-тиэнилметил)- и N-(3-метилтиопропил)хитозана [115]. Наивысшие сорбционные показатели по отношению к платине были получены при использовании хелатирующей смолы на основе эпихлоргидрин-хитозана [162, 164]. Улучшение сорбционных свойств по отношению к металлам платиновой группы достигнуто также за счет модификации хитозана иминодиуксусной кислотой [79, 122-124]. Кроме того, было показано, что с помощью такой модификации можно отделять трехвалентный иридий от других металлов платиновой группы.

Некоторые закономерности сорбции элементов этой группы можно проследить на триаде (Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}) и последних элементах триад (Ni^{2+} , Pd^{2+} , Pt^{4+}). В первом случае увеличение числа d-элементов приводит к увеличению сорбируемости, несмотря на то, что ионный радиус при этом несколько уменьшается. Во втором - увеличение порядкового номера элемента сопровождается увеличением сорбируемости, хотя строго говоря сравнивать можно только ионы никеля и палладия, имеющие одинаковый заряд, а здесь переход сопровождается увеличением ионного радиуса.

Актиниды. Группа актинидов включает 14 химических элементов, начиная с тория и кончая лауренцием (элемент № 103), главной особенностью которых является заполнение электронами внутренней 5f-оболочки. Все изотопы этих элементов радиоактивны. Большинство из них получены искусственно и в нормальных условиях в природе не встречаются, вернее не должны встречаться. Именно техногенные актиниды, попадая в окружающую среду, представляют наибольшую опасность, поскольку это в основном наиболее долгоживущие, а

некоторые и наиболее легко мигрирующие альфа-излучатели. К их числу относятся уран и все трансурановые элементы, включая кюрий. До сих пор трансурановые элементы, кроме, пожалуй, плутония, считаются совершенно не постижимой экзотикой, и мало кто знает, что, например, в течение нескольких месяцев после Чернобыльской катастрофы наибольший вклад в альфа-активное загрязнение окружающего района вносил кюрий-242, а сейчас, спустя 16 лет, наибольший вклад вносит и еще много лет будет вносить - америций-241 [204]. С переходом на смешанное уран-плутониевое топливо выход трансплутониевых изотопов многократно увеличится [205].

Актиниды в окружающей среде представлены большим разнообразием катионов, различных по структуре и заряду. Так, наиболее устойчивые катионы урана и трансуранов - это соответственно: UO_2^{++} , NpO_2^+ , Pu^{++++} , Am^{+++} и Cm^{+++} . Поэтому подобрать среди известных реагентов какой-либо соосадитель, экстрагент или сорбент общий для всех этих разновидностей ионов казалось бы просто невозможно. Однако именно таким сорбентом оказался хитин и его производные. Вначале это было показано на сорбции урана и тория хитозаном [15, 128, 206], а позднее - в результате весьма подробных и систематических исследований по сорбции урана и трансурановых элементов хитином и его производными [65, 207, 208, 209]. Показано, что хитин и хитозан, и особенно хитин-глюкановый комплекс, получаемый из высших грибов [210], весьма эффективно сорбируют всю эту группу актинидных катионов (коэффициенты распределения в интервале 10^3 - 10^5 мл/г) в широком диапазоне pH 3-8 и концентрации солей легких металлов (до 400 г/л NaNO_3). При этом характер зависимости значений коэффициентов распределения (Kp) от pH для всех видов ионов примерно одинаков (с максимумом в районе pH 5). Кроме того порядок сорбируемости катионов актинидов в области максимальных значений Kp ($\text{Cm}^{3+} = \text{Am}^{3+} > \text{Pu}^{4+} > \text{UO}_2^{++}$) совершенно не соответствует общепринятым представлениям о способности этих катионов к комплексообразованию ($\text{M}^{4+} > \text{MO}_2^{++} > \text{M}^{3+}$) [211]. Однако если принять во внимание наблюдавшуюся в других группах корреляцию сорбируемости катионов с ионным радиусом, то все легко объясняется, поскольку ионные радиусы Cm^{3+} , Am^{3+} , Pu^{4+} , NpO_2^+ и UO_2^{++} довольно близки (соответственно: 0,98, 0,99, 0,90, 0,88 и 0,83) [211] и уменьшаются в том же порядке, что и соответствующие коэффициенты распределения актинидов.

Результаты последних работ [142, 212] показывают, что хитин и хитозан хорошо сорбируют трансурановые элементы не только из растворов с относительно высокими значениями pH, но и растворов с концентрацией щелочи до 4 моль/л, что очень важно для дезактивации щелочных отходов.

ПРИМЕНЕНИЕ ХИТИН-ХИТОЗАНОВЫХ СОРБЕНТОВ

Применение в аналитической химии. Высокая сорбционная избирательность хитина и его производных по отношению к тяжелым металлам делает их уникальными сорбентами для выделения этих металлов из сильно солевых растворов, поскольку, как правило это соли щелочных или щелочноземельных металлов. К тому же отдельные химические модификации обладают специфической селективностью по отношению к индивидуальным металлам. Эти особенности позволяют выделять тяжелые металлы непосредственно из жидких промышленных отходов и морской воды [117, 213]. Поэтому хитин - хитозановые сорбенты могут использоваться в качестве беззольных реагентов для выделе-

ния, разделения и предварительного Концентрирования, как целых групп определенных металлов, так и некоторых индивидуальных элементов при их аналитическом определении в жидкой среде. В качестве примеров можно привести выделение и предварительное концентрирование меди, цинка, кадмия и свинца при их определении в морской воде [167] с использованием хитозана, или выделение меди, кобальта и никеля при определении их содержания в марганцевых конкрециях, используя хелатную хроматографию на колонке с хитозаном [214]. Хитин хорошо сорбирует кадмий и свинец и также используется для их определения в морской воде [171]. Хитозан селективно сорбирует уран и ванадий из водных растворов с низкой концентрацией этих металлов [193]. Волокнистый хитин, содержащий сорбент Микотон, эффективно использовался для пробоотбора с одновременным концентрированием при определении содержания актинидов и тяжелых металлов в аэрозолях воздуха, в пресной и морской воде, а также в ЖРО и почве [204]. Хитозан, модифицированный комплексоном семейства полиаминполиацетатов, применялся для предварительного концентрирования некоторых металлов платиновой группы [124]. Дитиокарбамат хитозана весьма эффективно сорбирующий благородные металлы, может быть рекомендован для предварительного концентрирования при определении золота рутения и палладия [163]. Не менее эффективно для выделения благородных металлов может использоваться хитозановая смола, модифицированная пропансульфоном [215]. Железо можно быстро и просто определить спектрофотометрически после предварительного концентрирования в виде хитинового комплекса с О-фенантролином [216]. Спектрофотометрический метод может использоваться также для изучения взаимодействия некоторых окрашенных ионов металлов с хитозаном [217]. Селективная сорбция меди достигается благодаря использованию комплекса трехвалентного железа с пиридиловой функциональной группой [218]. Возможности использования хитина для определения стронция-90 в морской воде рассматриваются в работе [219].

После проведения предварительного концентрирования хитозан, содержащий определяемый элемент, может сжигаться непосредственно в установке для атомно-абсорбционной спектрометрии. Такой прием удачно использовался при определении молибдена и ванадия в морской воде [180, 192]. Для увеличения чувствительности ВА-метода за счет предварительного накопления определяемого металла, пленка модифицированного хитозана может наноситься непосредственно на рабочий электрод [111].

Выделение тяжелых металлов из промышленных отходов. Выделение тяжелых металлов из промышленных сточных вод может оказаться полезным, как с целью их очистки от токсичных металлов [71], так и с целью устранения потерь ценных компонентов, например, благородных металлов [215]. Данные, приведенные выше, свидетельствуют о том, что хитин - хитозановые сорбенты демонстрируют уникальные возможности для решения обеих задач.

Для выделения ядовитых металлов из промышленных отходов можно использовать, как чистые хитин и хитозан [118, 181, 220], так и более сложные модификации [90, 91]. Понимая, что для промышленного применения экономически более целесообразно использовать дешевый сорбент, для переработки отходов гидрометаллургических предприятий некоторые авторы рекомендуют использовать биологически активные отходы производства антибиотиков [56]. Для регенерации ценных металлов можно использовать и более дорогие модификации, например, сложные производные хитозана для выделения платины [221] и редкоземельных металлов [134]. Однако, несмотря на обилие и разнообразие данных по сорбции тяжелых металлов хитином, хитозаном и их производ-

ными, пока не работает ни одной, хотя бы полупромышленной установки по очистке жидких отходов. Причин тому, по-видимому, две - имеющиеся сорбенты либо слишком дороги, либо не обладают приемлемыми технологическими характеристиками.

Дезактивация жидких радиоактивных отходов. Одной из первых работ, посвященных применению хитиновых сорбентов для дезактивации ЖРО можно считать изучение возможности удаления плутония из радиоактивных отходов с помощью хитина [222]. Затем последовал ряд работ, связанных с использованием производных хитозана для очистки уран содержащих отходов [49, 128, 223]. Дальнейшие исследования показали, что хитин содержащие сорбенты могут использоваться для дезактивации природных объектов, загрязненных не только актинидами, но и другими радионуклидами [224], и поэтому их применение может способствовать усовершенствованию существующей технологии переработки жидких отходов низкого и среднего уровня активности [225]. Наиболее перспективным сорбентом для этой цели представлялся Микотон и его модификации [210], промышленное производство которых было организовано в Украине. Их применение может позволить практически полностью дезактивировать солевые отходы атомных электростанций, достигая при этом высокой степени компактирования радиоактивности, что было подтверждено испытаниями, проведенными на Чернобыльской, Хмельницкой и Мангышлакской АЭС [226, 227]. Возможности сравнительно простого получения модификации Микотона, обладающих заданными сорбционными и технологическими характеристиками, позволяли реализовать концепцию полной дезактивации ЖРО низкого и среднего уровня активности [66, 135]. Этому во многом способствовали результаты систематических исследований сорбционных свойств Микотона и его модификаций по отношению к основным радионуклидам представленным в ЖРО, выполненных в РНЦ "Курчатовский Институт". Исследования включали не только определение коэффициентов распределения большого числа радионуклидов в зависимости от химического состава и pH модельных растворов, но также изучение кинетики сорбции радионуклидов и проведение экспериментов на фильтрационных колонках, как с модельными растворами, так и с реальными ЖРО атомных электростанций в Украине и Китае, а также завода по переработке ОЯТ во Франции [166, 228]. Для промышленного использования Микотона и его модификаций предложена непрерывная, многоступенчатая, противоточная схема на основе центробежных сорберов [229]. При финансовой поддержке германской компании Нукем Нуклеар в НИКИМТе (Москва) по этой схеме разработана, изготовлена и испытана пятиступенчатая демонстрационная установка, производительностью 50 л/ч.

Все приведенные коэффициенты распределения и закономерности сорбции имеют смысл только тогда, когда рассматриваемые элементы находятся в ионной форме или, по крайней мере, в виде истинных растворов. Однако в реальных ЖРО некоторые радионуклиды часто находятся в виде коллоидного раствора и тогда никакие ионообменные или хелатирующие сорбенты не в состоянии обеспечить необходимую степень дезактивации. Наиболее часто коллоидные формы образуют кобальт и плутоний в долго хранившихся щелочных отходах [230]. Для решения проблемы более полной дезактивации таких ЖРО весьма перспективной представляется комбинация сорбционного метода с предварительной флокуляцией коллоидов и взвешенных частиц на свежесаженном хитозане [231, 232, 233]. По сравнению с неорганическими соосадителями хитозан обладает следующими преимуществами: 1) образуется более объемистый осадок и требует меньшего количества флокулянта; 2) является не толь-

ко флокулянт, но и весьма активным сорбентом; 3) представляет собой беззольный материал, обеспечивающий эффективное компактирование выделенных радионуклидов за счет сжигания.

Исследовались возможности применения флокуляционной технологии с использованием некоторых видов водорастворимого хитозана [234] для дезактивации ЖРО. Было выбрано несколько долгоживущих радионуклидов, являющихся типичными представителями ЖРО различного происхождения (^{137}Cs , ^{90}Sr , ^{60}Co , ^{54}Mn , ^{239}Pu). На примере кобальта были показаны преимущества использования водорастворимого хитозана в качестве флокулянта по сравнению с его же использованием в качестве сорбента. В результате показано, что наилучшими флокуляционными свойствами обладают высокомолекулярные хитозаны с максимальной степенью дезацетилирования [235]. При этом оптимальный расход флокулянта составляет не более 1 г/л.

Высокие сорбционные характеристики по отношению к актинидам [128, 207] свидетельствуют о том, что хитозан с ионами урана и трансурановых элементов образует очень прочные комплексы. Это обстоятельство может быть использовано для выделения урана и трансурановых элементов из растворов методом ультрафильтрации в виде комплексов с высокомолекулярными водорастворимыми хитозанами [236].

В результате удалось разработать, на наш взгляд, весьма перспективный флокуляционно-сорбционный метод дезактивации ЖРО низкого и среднего уровня активности, основанный на том, что в качестве сорбента используются различные модификации волокнистого хитинсодержащего материала Микотон, получаемые в ИКБГИ АН Украины, а в качестве флокулянта - водорастворимые или кислоторастворимые хитозаны, производимые также в промышленных масштабах в России [166]. Эта взаимодополняющая комбинация беззольных природных полимеров позволяет достигать высокой степени очистки ЖРО от целого комплекса долгоживущих радионуклидов, включая актиниды, продукты деления и элементы с наведенной активностью, а также эффективно компактировать выделенные радионуклиды за счет сжигания.

Основными источниками сорбентов на основе хитина и его производных служат панцири морских членистоногих, а также биомасса, получаемая из низших и высших грибов. Для увеличения сорбционной способности хитина производится модифицирование. Основной модификацией хитина является продукт его дезацетилирования - хитозан. Синтезировано большое количество всевозможных модификаций хитина и хитозана, начиная с простого фосфорилирования и кончая химической прививкой сложных органических радикалов. Повышенными сорбционными свойствами по отношению к тяжелым металлам обладают также природные хитин-глюкановые комплексы, получаемые из биомассы низших и высших грибов. Хитинсодержащие материалы волокнистой структуры позволяют проводить композитное модифицирование, придавая материалу заданные сорбционные и технологические свойства.

Поскольку в составе хитина и его производных имеется несколько функциональных групп, механизм сорбции тяжелых металлов имеет довольно сложный характер и требует серьезных систематических исследований. Тем не менее, можно считать установленным, что в сорбционном процессе принимают участие, в основном, ацетиламидные и аминокрупы, а также связеобразующие атомы кислорода.

Имеющиеся многочисленные данные по сорбции ионов самых различных металлов позволяют выявить некоторые закономерности. Так главной особенностью хитина и хитозана является тот факт, что они совершенно не сорбиру-

ют легкие или биогенные элементы, а их сорбционная способность начинает проявляться лишь с переходных металлов, обладающих d-электронами. Общим для элементов каждой из групп Периодической Системы являются: повышенная сорбируемость представителей d-элементов по сравнению с s-элементами и увеличение сорбируемости с увеличением порядкового номера элемента, что в свою очередь коррелирует с увеличением ионного радиуса. Однако и здесь для окончательных выводов еще предстоит закрыть множество "белых пятен" и провести более строгие сравнительные эксперименты в идентичных условиях.

По сорбции тяжелых металлов существует масса данных, свидетельствующих о перспективности применения хитиновых сорбентов, как в аналитической практике, так и для переработки промышленных отходов с целью удаления опасных примесей и регенерации ценных металлов. Некоторые из полученных сорбентов, обладающих хорошими технологическими характеристиками, в частности волокнистый сорбент Микотон, в самое ближайшее время могут найти применение для дезактивации ЖРО и реабилитации загрязненных территорий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Seeger R. // Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 1977. V. 73, N 5. P. 160-162.
2. Klan J., Randa Z., Benada J., Horvna J. // Ceska Mykol. 1988. V. 42. N 3. P. 158-169.
3. Gadd G.M., White C. // Proc. Symp. "Metal-Microbe Interactions", Oxford: Pergamon Press 1989. P. 19-38.
4. Azab M.S., Peterson P.J., Young T.W.K. // Microbios. 1990. V. 62. N 250. P. 23-28.
5. Bern H., Lasota W., Kusmierek E., Witusik M. // J. Radional. Nucl. Chem. Lett. 1990. V. 145, N 1. P. 39-46.
6. Zabowski D. // IL Environ. Qual. 1990. V. 19. N 3. P. 273-377.
7. Жданова Н.Н., Василевская А.М., Гаврилюк В.И. и др. // Микология и фитопатология. 1990. V. 24. № 2. С. 106-111.
8. Clint G.M., Dighton J., Rees S. // Mycol. Res. 1991. V. 95. N 9. P. 1047-1051.
9. Kalac P., Burda J., Staskova J. // Sci. Total Environ. 1991. V. 105. P. 109-119.
10. Евдокимова Г.А., Мозговая Н.П. // Микробиология. 1991. V. 60. № 5. С. 801-807.
11. Садов Ф.И. // Текстильная Промышленность. 1941. № 2. С. 52-54.
12. Майская С.М., Дроздова Т.В., Емельянова М.П. // Геохимия. 1956. № 4. С. 10-23.
13. Андреев П.Ф., Плиско Е.А., Рогозина Е.М. // Геохимия. 1962. № 6. С. 536-539.
14. Muzzarelli R.A.A. Natural chelating polymers. - Oxford: Pergamon Press, 1973. P. 55-83.
15. Muzzarelli R.A.A. Chitin - Oxford: Pergamon Press, 1977. 305 p.
16. Muzzarelli R.A.A. New derivatives of chitin and chitosan: properties and applications // New Dev. Ind. Polysaccharides Proc. Conf. 1984. - Abstr. - N.Y.: Gordon & Breach. 1985. P. 207-231.
17. Park Joon Woo, Park Myung Ok, Park Kwanghee Koh // Bull. Korean Chem. Soc. 1984. V. 5. N 3. P. 108-112.
18. Kawano Kentaro, Yoshinaga Tetsutaro, Iwakiri Rumi, Kawakami Ichiro // Kyushu Kogyo Daigaku Kenkyu Hokoku Kogaku. 1986. N 53. P. 81-92.
19. Tsezos M., Mattar S. A further insight into mechanism of biosorption of metals, by examining chitin EPK spectra // Talanta. 1986. V. 33. N 3. P. 225-232.
20. Onsoyen E., Skaugrud O. // J. Chem. Technol. and Biotechnol. 1990. V. 49. N 4. P. 395-404.
21. Lopez de Alba P.L., Pacheco M.A., Andreu de Riquer G.A. // Bol. Soc. Chil. Quim. 1988. V. 33. N 1. P. 59-64.
22. Gomez-Guillen M., Gomez-Sanchez A., Martin-Zamora M.E. // Carbohydr. Res. 1994. V. 258. P. 313-319.
23. Masri M.S., Friedman M. // Environ. Sci. Technol. 1972. N 6. P. 745-746.
24. Koshijima Tetsuo, Tanaka Ryutaro, Muraki Einosuke et al. // Cellulose Chem. Technol. 1973. V. 7. P. 197-208.
25. Горовой Л.Ф., Косяков В.М. // Пат. 2073015 РФ, C08B37/08.
26. Roberts G.A.F. Chitin chemistry. Basingstoke: Macmillan Press, 1992. 352 p.
27. Muzzarelli R.A.A., Jeuniaux C., Gooday G.W. // Proc. 3rd Int. Conf. "Chitin in Nature and Technology". N.Y.: Plenum Press, 1986. 584p.

28. Domard A., Jeunidux C., Muzzarelli R.A.A. et al. // *Advances in Chitin Science*. V. I. Proc. the 1st Int. Conf. of European Chitin Soc, Lyon: Jacques Andre Publisher, 1995. 513 p.
29. Domard A., Roberts G., Varum K.M. (Ed.) // *Ibid.* 1997. V. II. 962 p.
30. Rong H., Chen, Hsing C, Chen. // *Advances in Chitin Science*. V. III. Proc. of 3^d Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symp. Taiwan: NTO Univ., 1998. 517 p.
31. Peter M.G., Domard A., Muzzarelli R.A.A. (Ed.) // *Advances in Chitin Science*. V. IV. Proc. of the Int. Conf. of European Chitin Soc, Potsdam: Potsdam Universitaet. 2000. 650 p.
32. Muzzarelli R.A.A. (Ed.) // *Abstracts of 4th Conf. of European Chitin Soc*. Ancona: Ancona University, 2001. 582 p.
33. Варламов В.П., Быкова В.М., Немцев С.В. и др. (ред.) // *Материалы V конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана"*. М.: ВНИРО, 1999. 296 с.
34. Варламов В.П., Быкова В.М., Немцев С.В. и др. (ред.) // *Материалы VI Междунар. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана"*. М.: ВНИРО, 2001. 398 с.
35. Иванов А.В., Смирнов И.В., Раевских В.М. и др. // *Материалы Шестой Междунар. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана"*. М.: ВНИРО, 2001. С. 24[^]-25.
36. Немцев С.В., Зуева О.Ю., Хисматуллин Р.Г. и др. // Там же. С. 39-42.
37. Кочетков Н.К. (Ред.) // *Методы химии углеводов*. М.: Мир, 1967. 512 с.
38. Немцев С.В. Разработка комплексной технологии хитина и хитозана из панцирьсодержащего сырья и крыля с применением ферментных препаратов и криоактивации // *Авто-реф. дис. ... канд. техн. наук*. М.: ВНИРО, 1997. 23 с.
39. Голицын В.П., Цветков В.Г., Иванов А.В. и др. // Пат. 2065447 РФ, C08B37/08.
40. Быков В.П., Фурман Д.И. // *Материалы Пятой конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана"*. М.: ВНИРО, 1999. С. 18-21.
41. Куприна Е.Э., Водолажская СВ., Няникова Г.Г. и др. // *Материалы VI междунар. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана"*. М.: Изд-во ВНИРО, 2001. С. 31-34.
42. Maslova G., Krasavtsev V. // *Advances in Chitin Science*, V. II. Proc. of the 2^d Int. Conf. on Chitin, and Chitosan "EUCHIS"-97, Lyon: Jacques Andre Publisher, 1997. P. 554-557.
43. Yang T.C, Zall R.R. // *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 1984. V. 23. N 1. P. 168-172.
44. Ramachandran N.K., Madhavan P. // *Proc. 2nd Int. Conf. "Chitin and Chitosan"*. Sapporo: 1982. P. 187-190.
45. Shimahara K. Repts. Asahi Class Found., 1990. N 57. P. 423-III.
46. Venkatesverlu C, Stotzky G. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1989. V. 31. N 5/6. P. 619-625.
47. Muzzarelli R.A.A., Tanfani F. // *Ibid.* 1982. P. 183-186.
48. Muzzarelli R.A.A., Tanfani F., Emanuelli M. // *J. Appl. Biochem.* 1981. V. 3. N 4. P. 322-327.
49. Glombitza F., Iske U., Bullmann M., et al. // *Abstr. 9 Int. Symp. "75th Event. Eur. Fed. Biotechnol."* (Biohydromet-91). Troia: 1991. P. 48.
50. Muzzarelli R.A.A., Tanfani F., Scarpini G., et al. // *J. Appl. Biochem.*, 1980. V. 2. N 1. P. 54-59.
51. Muzzarelli R.A.A., Tanfani F., Scarpini G. // *Biotechnol. Bioeng.* 1980. V. 22. N 4. P. 885-896.
52. Тесленко А.Я., Воеводина И.Н., Галкин А.В. и др. // Пат. 2043995 РФ, C08B37/08, C12P19/04.
53. Plonski B.A., Luong G.H.V., Brown E.J. // *Biorecovery*. 1990. V. 1. N. 4. P. 239-254.
54. Liang K., Chang B., Lin J. // *"Advances in Chitin Science"*, V. III. Proc. of 3^d Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symp. Taiwan: NTO Univ., 1998. P. 261-263.
55. Wales D.S., Sagar B.F. // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1990. V. 49. N 4. P. 345-356.
56. Siegel S.M., Galun M., Siegel B.Z. // *Water Air Soil Poll.*, 1990. V. 53. P. 335-344.
57. Rumpel T., Schinner F. // *FEMS Microbiol. Rev.*, 1993. V. 11. N 1-3. P. 159-164.
58. Velichkov A.D., Nikolova S.F., Veljanov D.K. // *CR Acad. Bulg. Sci.* 1989. V. 42. N 3. P. 81-84.
59. Zadrzil F. // *Champignon*, 1991. N 364. P. 16-19, 22-25, 28.
60. O'Brien R.W., Ralph B. J. // *Ann. Bot.* 1966. V. 30. N 120. P. 831-843.
61. Горовой Л.Ф., Сытник К.М., Даниляк Н.И. и др. // А.с. 1575552 РФ, C08B37/08.
62. Даниляк М.И., Горовой Л.Ф., Баглай В.О. // *Укр. бот. журн.* 1992. Т. 49. № 1. С. 68-71.
63. Горовой Л.Ф., Косяков В.Н. // *Биополимеры и клетка*. 1996. Т. 12. № 4. С. 49-59.
64. Muzzarelli R.A.A. // Пат. 2.923802 DE, CI. C08B37/08.
65. Косяков В.Н., Яковлев Н.Г., Велешко И.Е. и др. // *Радиохимия*. 1997. Т. 39. № 6. С. 540-543.
66. Kosyakov V.N., Yakovlev N.G., Gorovoy L.F. // *Biotechnology for Waste Management and Site Restoration*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997. P. 119-131.
67. Kim Y.M., Choi K.S. // *Pollimo*. 1985. V. 9. N 5. P. 417-434.

68. *Феофилова Е.П., Марьин А.П., Ушанова А.Е. и др. // Изв. АН СССР. Сер. Биологич. 1982. № 3. С. 361-370.*
69. *Masri M.S., Randal V.G., Pittman A.G. II Polym. Prepr., Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem. 1978. V. 19. N L.P. 483-488.*
70. *Masri M.S., Randal V.G. II Pat. 4125708 US, C08B37/08.*
71. *Masri M.S., Randal V.G. // Proc. First Int. Conf. "Chitin and Chitosan" - MIT Sea Grant Rep. MITSG. 1978. P. 277-287.*
72. *Koshugi Junichi. // Pat. 18131 EP, C08B37/08.*
73. *Koshugi Junichi. // Pat. 28216 Eur., C08B37/08.*
74. *Koyama Yoshiyuki, Taniguchi Akihiko. // J. Appl. Polym. Sci. 1986. V. 31. N 6. P. 1951-1954.*
75. *Kurita Keisuke, Chikaoka Satoyuki, Koyama Yoshiyuki. II Chem. Lett. 1988. N 1. P. 9-12.*
76. *Kurita K. II Proc. 3rd Int. Conf. "Chitin in Nature and Technology". N.Y.: Plenum Press, 1986. P. 287-293.*
77. *Kurita K. II Prog. Biotechnol. 1987. V. 3 (Ind. Polysaccharides). P. 337-346.*
78. *Kelkenberg H. // Pat. 4318094 DE, B01J20/30.*
79. *Inoue Katsutoshi, Baba Yoshinari, Yoshizuka Kazuharu II Bull. Chem. Soc. Jap. 1993. V. 66. N 10. P. 2915-2921.*
80. *Inoue Katsutoshi, Ohio Keisuke, Yoshizuka Kazuharu et al. // Bunseki Kagaku. 1993. V. 42. N 11. P. 725-731.*
81. *Weltrowski M., Saint-Andre R., Patry J. et al. // Proc. 6th Int. Conf. "Chitin and Chitosan". Gdynia: Pol. Chitin Soc, 1994. P. 27.*
82. *Yoshida Hiroyuki. // Yosui to Haisui. 1994. V. 36. N 4. P. 303-307.*
83. *Sakaguchi Takashi, Horiyoshi Takao, Nakajima Akira // Nippon Nogei Kagaku Kaishi, 1979. V. 53. N 5. P. 149-156.*
84. *Seo Toshihiro, Iijima Toshiro. // Biotechnol. Polym. Proc. Am. Chem. Soc. Symp. Polym. Biotechnol., 1990. N.-Y.: Plenum Abstr., 1991. P. 215-227.*
85. *Sakaguchi T., Nakajima A. // Proc. 2nd Int. Conf. "Chitin and Chitosan". Sapporo: 1982. P. 177-182.*
86. *Lopez de Alba P.L., Pacheco M.A., Urbina B., Alvarado C // Biol. Soc. Chil. Quim. 1987. V. 32. N2. P. 81-87.*
87. *Lopez de Alba P.L., Lopez-Martinez L., Ramirez-Quiroz J.M. // Chem. Speciation Bioavailability. 1991. V. 3. N 2. P. 55-59.*
88. *Nishi Norio, Maekita Yoshihiro, Nishimura Shinichiro et al. // Int. J. Biol. Macromol. 1987. V. 9. N2. P. 109-114.*
89. *Kim Yong Moo, Choi Kyu Suck, Chung Taik Sang, Kim et al. // Pollimo. 1988. V. 12. N. 1. P. 86-98.*
90. *Muzzarelli R.A.A., Weckx M., Filippini O., Sigon F. II Carbohydr. Polym. 1989. V. 11. N 4. P. 293-306.*
91. *Deans J.R. // Pat. 5336415 US, C02F1/54.*
92. *Muzzarelli R.A.A. // Talanta, 1974. V. 21. P. 1137-1143.*
93. *Rathke T.D., Hudson S.M. II J. Macromol. Sci., Rev. Macromol. Chem. Phys. 1994. V. 34. N 3. P. 375-437.*
94. *Noguchi J., Tokura S., Inomata M. et al. // Kogyo Kagaku Zasshi, 1965. V. 68. P. 904-908.*
95. *Sum K., Khor C.E. // "Advances in Chitin Science". V. IV. Proc. of the 3^d Int. Conf. of European Chitin Soc, Potsdam: Potsdam Universitaet, 2000. P. 355-360.*
96. *Hirano S., Kondo J., Fuketa M. et al. // Proc. 2nd Int. Conf. "Chitin and Chitosan". Sapporo: 1982. P. 57-62.*
97. *Kurita K. // "Advances in Chitin Science". V. IV. Proc. of the 3^d Int. Conf. of European Chitin Soc. Potsdam: Potsdam Universitaet, 2000. P. 389-394.*
98. *Struszczyk H. // Там же. P. 395-398.*
99. *Марьин А.П., Феофилова Е.П., Генин Я.В. и др. // Высокомогл. соединения. Сер. В., 1982. Т. 24. № 9. С. 658-662.*
100. *Uraki Yasumitsu, Nishi Horio, Hishimura Sinichiro et al. // Proc. 4th Int. Conf. "Chitin and Chitosan". Sapporo: 1989. P. 537-540.*
101. *Mane B., Weltrowski M., Morcellet M., et al. // "Advances in Chitin Science". V. I. Proc. of the 1st Int. Conf. of European. Chitin Soc, Lyon: Jacques Andre Publisher, 1995. P. 291-295.*
102. *Han S.M., Kim J.B., Tokura S. // "Advances in Chitin Science". V. HI. Proc. of 3^d Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symp. Taiwan, NTO Univ., 1998. P. 153-156.*
103. *Muzzarelli R.A.A., Tanfani F., Emanuelli M. et al. // Carbohydr. Res. 1982. V. 107. N 2. P. 199-214.*

104. Muzzarelli R.A.A., Tanfani F. // Proc. 2 Int. Conf. "Chitin and Chitosan". Sapporo: Japan, 1982. P. 45-53.
105. Muzzarelli R.A.A., Tanfani F. // Pure Appl. Chem. 1982. V. 54. N 11. P. 2141-2150.
106. Muzzarelli R.A.A., Tanfani F., Mariotti S. et al. // Carbohydr. Res. 1982. V. 104. N 2. P. 235-243.
107. Muzzarelli R.A.A., Tanfani F., Emanuelli M. et al. // J. Membr. Sci., 1983. V. 16. P. 295-308.
108. ParkJoon Woo, Park Dong Mee, Park Kwanghee Koh // Pollimo. 1986. V. 10. N 6. P. 641-645.
109. Баран А.А., Величанская Л.В., Соломенцева И.М. и др. // Укр. хим. журн., 1986. Т. 52. № 1. С. 18-21.
110. Delben F., Muzzarelli R.A.A. // Carbohydr. Polym. 1989. V. 11. N 3. P. 221-232.
111. Kurauchi Yoshiaki, Tsurumori Eiichi, Ohya Kazuya. // Bull. Chem. Soc. Jap. 1989. V. 62. N 4. P. 1341-1342.
112. Inoue Katsutoshi, Yoshizuka Kazuharu, Baba Yoshinari. // Proc. Int. Conf. "New Dev. Ion Exch.". Tokyo: Kodansha, 1991. P. 543-548.
113. Baba Yoshinari, Hirakawa Hiroyuki, Yoshizuka Kazuharu et al. // Там же. P. 199-204.
114. Baba Yoshinari, Hirakawa Hiroyuki, Yoshizuka Kazuharu et al. // Anal. Sci. 1994. V. 10. N 4. P. 601-605.
115. Baba Yoshinari, Kawano Yoshinobu, Hirakawa Hiroyuki. // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1996. V. 69. P. 1255-1260.
116. Dobetti L., Delben F. // Carbohydr. Polym. 1992. V. 18. N 4. P. 273-282.
117. Hase Akiko, Kawabata Toshie, Terada Kikuo // Anal. Sci. 1990. V. 6. N 5. P. 747-751.
118. Asao Yoshiichi, Ishigiro Masao. // Pat. 262743 JP, B01J20/22.
119. Peniche-Covas C, Arguelles-Monal W. // Abstr 33ul. UP AC Int. Symp. Macromol., Montreal, Montreal Univ. Publ., 1990. P. 627.
120. Muzzarelli R.A.A., Zattoni A. // Int. J. Biol. Macromol. 1986. V. 8. N 3. P. 137-141.
121. Asao Yochiichi, Ui Naoya, Aikubo Akira // Pat. 118485 JP, C90K3/00.
122. Inoue Katsutoshi, Yoshizuka Kazuharu. // Pat. 04.141533 JP, C22B11/00.
123. Inoue Katsutoshi, Yoshizuka Kazuharu. // Pat. 04.254535 JP, C22B11/00.
124. Inoue K., Yamaguchi T., Iwasaki M. et al. // Separ. Sci. Technol., 1995. V. 30. N 12. P. 2477-2489.
125. Inoue Katsutoshi, Yoshizuka Kazuharu, Baba Yoshinari // Pat. 04.36425 JP C22B11/00.
126. Muzzarelli R.A.A., Tanfani F., Emanuelli M. // Carbohydr. Polym. 1984. V. 4. N 2. P. 137-151.
127. Muzzarelli R.A.A. // Carbohydr. Polym. 1983. V. 3. N 1. P. 53-75.
128. Muzzarelli R.A.A. // Carbohydr. Polym. 1985. V. 5. N 2. P. 85-89.
129. Choi Kyn Suk. // Makromol. Chem., 1990. V. 33. P. 55-63.
130. Thome J.P., Hugla J.L., Weltrowski M. // Proc. 5th Int. Conf. "Chitin and Chitosan". London: Elsevier, 1992. P. 639-647.
131. Dingilian E.O., Heinsohn G.E. // Pat. 92.08742 WO, C08B37/08.
132. Gomez-Guillen M., Gomez-Sanchez A., Marlin-Zamora M.E. // Carbohydr. Res., 1992. V. 233. P. 255-259.
133. Inoue Katsutoshi, Ohio **Keisuke**, Yoshizuka Kazuharu et al. // Bunseki Kagaku, 1995. V. 44. N 4. P. 283-287.
134. Pat. 07.62465 JP, C22B59/00.
135. Косяков В.Н., Яковлев Н.Г., Горовой Л.Ф. и др. // Тез. Докл. Первой Росс. конф. по радиохимии. М.: РНЦ Курчатовский Ин-т, 1994. С. 154.
136. Masri M.S., Reuter F.W., Friedman M. // J. Appl. Polym. Sci., 1974. V. 18. P. 675-681.
137. Volesky B. // "Biosorption of Metals Recovery" Elsevier Publication. Cambridge 1987. N 5. P. 96-101.
138. Горовой Л.Ф., Петюшенко А.П. // Материалы Пятой конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана." М.: ВНИРО, 1999. С. 134-136.
139. Blair H.S., Ho Ting-Chung. // Chem. Technol. Biotechnol. 1981. V. 31. N 1. P. 6-10.
140. Domard A. // "Advances in Chitin Science". V. IV. Proc. of the 3rd Int. Conf. of European Chitin Soc, Potsdam, Potsdam Universitaet. 2000. P. 295-301.
141. Delben F., Muzzarelli R.A.A., Terbojevich M. // Carbohydr. Polym., 1989. V. 11. N 3. P. 205-219.
142. Piron E., Domard A., Federici V. // "Advances in Chitin Science". V. II. Proc. of the 2nd Int. Conf. on Chitin, Chitosan and EUCHIS-97", Lyon, Jacques Andre Publisher. 1997. P. 462-465.
143. Heppe A. // Abstr. of 4th Conf. of European Chitin Soc, Ancona, Ancona University, 2001. P. 38.
144. Eiden C.A., Jewell C.A., Wightman J.P. // J. Appl. Polym. Sci., 1980. V. 25, N 8. P. 1587-1599.
145. Findou A., McKay G., Blair H.S. // J. Environ. Sci. Health. Part A., 1993. A. 28, N 1. P. 173-185.
146. Maruca R., Suder B. J., Wightman J.P. // J. Appl. Polym. Sci., 1982. V. 27, N 12. P. 4827-4837.

147. Shigeno Yasuhiro, Kondo Koichi, Takemoto Kiichi. // *Angew. Makromol. Chem.*, 1980. N 91. P. 55-67.
148. Епилов Б.Г., Селиверстов А.Ф., Сухов Н.Л. и др. // *Изв. АН. Сер. Хим.*, 1992. № 10. С. 2305-2311.
149. Tzu-Yang Hsien, Rorrer L. // "Advances in Chitin Science". Vol. III. Proc. of 3^d Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symp. Taiwan, NTO Univ., 1989. P. 111.
150. Kurita Keisuke, Koyama Yoshiyuki, Chikaoka Sutoyuki. // *Polym. J. (Tokyo)*, 1988. V. 20. N 12. P. 1083-1089.
151. Muzzarelli R.A.A., Rocchetti R. // *Spec. Publ. R. Soc. Chem.* 1986. 61 (Trace Met. Removal Aqueous Solution). P. 44-57.
152. Zhuang G., Wightman J.P. // *Wuli Huaxue Xuebao*. 1989. V. 5. N 5. P. 600-603.
153. Gonzalez-Davila M., Millero F.J. // *Geochim. Cosmochim. Acta.*, 1990. V. 54. N 3. P. 761-768.
154. Mokhtar M.B., Sharif S., Jopony M. // *Pertanika*, 1991. V. 14. N 2. P. 187-191.
155. Muzzarelli R.A.A., Tanfani F., Emanuelli M. et al. // *J. Appl. Biochem.*, 1980. V. 2. N 5. P. 380-389.
156. Kurita Keisuke, Koyama Yoshiyuki, Taniguchi Akihiko. // *J. Appl. Polym. Sci.*, 1986. V. 31. N 5. P. 1169-1176.
157. Ohga Kazuya, Kurauchi Yoshiaki, Yanase Hiroshi // *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1987. V. 60. N 1. p. 444-446.
158. Struszczyk H., Kivekas O., Niekrazewicz A. // "Advances in Chitin Science". Vol. I. Proc. of the 1st Int. Conf. of European Chitin Soc, Lyon, Jacques Andre Publisher. 1995. P. 482-484.
159. Komori Kazunori, Igarashi Shukuro, Yotsuyuagi Takao. // *Bunseki Kagaku*, 1986. V. 35. N 10. P. 890-892.
160. Muzzarelli R.A.A. // *Rev. Intl. Oceanogr. Medicae*. 1971. V. 21. P. 93-96.
161. Huang Jinming, Jin Xinrong. // *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao*, 1992. V. 13. N 4. P. 535-536.
162. Ni Caihua, Xu Yuwu. // *Xuaxue Tongbao*. 1992. N 7. P. 36-37.
163. Terada Kikuo, Kawamura Hiroo. // *Anal. Sci.*, 1991. V. 7 (Suppl., Proc. Int. Congr. Anal. Sci., 1991. Pt. 1). P. 71-74.
164. Ni Caihua, Xu Yuwu. // *Huaxue Shiji*, 1992. V. 14. N 3. P. 153-154.
165. Kawamura Yoshihide, Mitsuhashi Masaki, Tanibe Hiroaki, et al. // *Ind. Eng. Chem. Res.*, 1993. V. 32, N 2. P. 386-391.
166. Косяков В.Н., Велешко И.Е., Яковлев Н.Г. и др. // *Материалы Шестой междунар. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана"*. М.: ВНИРО, 2001. С. 287-290.
167. Muzzarelli R.A.A., Sipos L. // *Talanta*, 1971. V. 18. P. 853-858.
168. Jha I.N., Iyengar L., Rao A.V. et al. // *J. Environ. Eng.*, 1988. V. 114. N 4. P. 962-974.
169. Rorrer G.L., Hsien Tzu Yang, Way J.D. // *Ind. Eng. Chem. Res.*, 1993. V. 32. N 9. P. 2170-2178.
170. Hsien T.V., Rorrer G.L. // *Separ. Sci. Technol.*, 1995. V. 30. N 12. P. 2455-2475.
171. Gonzalez-Davila M., Santana-Casiano J.M., Millero F.J. // *J. Colloid Interface Sci.*, 1990. V. 137. N 1. P. 102-110.
172. Mitani Tomoya, Moriyama Ayumi, Ishii Hiroshi. // *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 1992. V. 5. N 6. P. 985-988.
173. Gorovoj L., Kosyakov V. // "Advances in Chitin Science". V. II. Proc. of the 2^d Int. Conf. on Chitin, Chitosan and EUCHIS"-97, Lyon, Jacques Andre Publisher. 1997. P. 858-861.
174. Muzzarelli R.A.A., Rocchetti R. // *J. Chromatogr.* 1974. V. 96. P. 115-121.
175. Pius T., Yeldho K.M., Babu P. // "Advances in Chitin Science". V. II. Proc. of the 2^d Int. Conf. on Chitin, Chitosan and EUCHIS"-97, Lyon, Jacques Andre Publisher. 1997. P. 485-487.
176. McKay G., Blair H.S., Hindon A. // *Indian J. Chem. Sect. A*. 1989. 28 A, N 5. P. 356-360.
177. Peniche-Covas C., Alvarez L.W., Arguelles-Monol W. // *J. Appl. Polym. Sci.* 1992. V. 46. N 7. P. 1147-1150.
178. Kobayashi Yoshitaka, Nakayama Takashi // *Mizu Shori Gijutsu*. 1985. V 26. N 5. P. 303-308.
179. Suber B.J., Wightman J.P. // *Proc. Adsorpt. Solution Symp. (Ed.) Ottewill R.H., Rochester C.H., Smith A.L., L.: Academic Pr.*, 1983. P. 235-244.
180. Muzzarelli R.A.A., Rocchetti R. // *Anal. Chim. Acta*. 1973. V. 64. P. 371-379.
181. Portier R.J. // *Pat. US N 4.775650*, 1988 (CI. B01J20/22).
182. Jing Shi Bing, Yamaguchi Tatsuaki // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1992. V. 65. N 7. P. 1866-1870.
183. Inoue Katsutoshi, Baba Yoshinari, Yoshizuka Kazuharu et al. // *Chem. Lett.* 1988. N 8. P. 1281-1284.
184. Muzzarelli R.A.A., Rocchetti R., Marangio G. // *J. Radioanal. Chem.* 1972. V. 10. P. 17-26.

185. Селиверстов А.Ф., Емельянова А.К.У., Ершов Б.Г. // Журн. прикладн. химии. 1993. V. 66. № 10. С. 2331-2336.
186. Choi K.S., Chung T.S., Kim Y.M. // Polimo. 1983. V. 7. N 6. P. 372-379.
187. Meinhard S. // Pat. N 4.141889. 1993 (Cl. A62D3/00).
188. Inukai Y., Kaida T., Yasuda S. // Advances in Chitin Science. V. II. Proc. of the 2^d Int. Conf. on Chitin, Chitosan and EUCHIS"-97, Lyon, Jacques Andre Publisher. 1997. P. 513-515.
189. Stijve T., Vellinga E.C., Herrmann A. // Persoonia. 1990. V. 14. N 2. P. 161-166.
190. Elson C.M., Davies D.H., Hayes E.R. // Water Res. 1980. V. 14. N 9. P. 1307-1311.
191. Dambies L., Roze A., Guibal E. // "Advances in Chitin Science". V. IV. Proc. of the 3d Int. Conf. of European Chitin Soc, Potsdam, Potsdam Universitaet. 2000. P. 302-309.
192. Muzzarelli R.A.A., Rocchetti R. // Anal. Chim. Acta. 1974. V. 70. P. 283-289.
193. Jansson-Charrier M., Guibal E., Cloirec P.L. // Chitin World. Proc. 6th Int. Conf. "Chitin and Chitosan". Abstr. Aug 16-19. 1994. Gdynia. Poland. 1994. P. 43.
194. Micera G., Deiana S., Dessi A. et al. // Chitin Nat. Technol. Proc. 3rd Int. Conf. "Chitin and Chitosan" 1985. Plenum Abstr. N.Y., 1986. P. 565-568.
195. Yang T., Zall R.R. // Ind. Water Eng. 1984. V. 21. N 4. P. 16-20.
196. Udaybhaskar P., Iyengar L., Rao A.V.S.P. // J. Appl. Polym. Sci. 1990. V. 39. N 3. P. 739-747.
197. Lopez de Alba P.L., Lopez-Martinez L., Ramirez-Quiroz J.M. // Rev. Soc. Quim. Mex. 1994. V. 38. N 2. P. 74-86.
198. Muzzarelli R.A.A., Spalla B.J. // Radioanal. Chem. 1972. V. 10. P. 27-33.
199. Shigeno Yasuhiro, Kondo Koichi, Takemoto Kiichi. // Angew. Makromol. Chem. 1980. V. 90. P. 211-215.
200. Shigeno Y., Kondo K., Takemoto K. // J. Appl. Polym. Sci. 1980. V. 25. N 5. P. 731-738.
201. Shigeno Yasuhiro, Kondo Koichi, Takemoto Kiichi // Macromol. Chem. Phys. 1981. 182. N 2. P. 709-712.
202. Ершов Б.Г., Быков Г.Л., Селиверстов А.Ф. // Тезисы докладов Первой Российской конференции по радиохимии. М. РНЦ "Курчатовский Институт". 1994. С. 137.
203. Inoue K., Yamaguchi T., Shinbaru R. et al. // "Advances in Chitin Science". Vol. I. Proc. of the 1st Int. Conf. of European Chitin Soc, Lyon, Jacques Andre Publisher. 1995. P. 271-274.
204. Kosyakov V.N. // "Radionuclides and Heavy Metals in Environment". Proc. NATO Advanced Research Workshop 3-6 October 2000. Dubna, Kluwer Academic Publishers. 2001. P. 37^2.
205. Косяков В.Н., Швецов И.К. // Атомная Энергия. 1978. Т. 44. № 4. С. 315-320.
206. Tsezos M., Volesky B. // Biotechnol. Bioeng. 1981. V. 23. P. 583-604.
207. Ершов Б.Г., Быков Г.Л., Селиверстов А.Ф. // Радиохимия. 1992. V. 34. № 6. С. 64-69.
208. Kosyakov V.N., Yakovlev N.G., Gorovoj L.F. // Actinides'93: Int. Conf. Santa Fe, N. M., Sept. 19-24. 1993. Final Program and Abstr. Los Angeles, 1993.
209. Косяков В.М., Горовий Л.Ф. // Чернобыльская авария, и наслідки та проблеми їх подолання. Тези конф. Кшв, 20-21 квгенья 1994. Кшв, 1994. С. 97-98.
210. Горовой Л.Ф. // Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана. Материалы Пятой конференции. М.: ВНИРО. 1999. С. 130-134.
211. Сиборг Г.Т., Кац Дж.Дж. // Химия актинидных элементов. М.: Атомиздат. 1960. 542 с.
212. Селиверстов А.Ф., Ершов Б.Г., Тананаев И.Г. // Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана. Материалы Пятой конференции. М.: ВНИРО, 1999. С. 252-253.
213. Muzzarelli R.A.A., Tubertini B. // Talanta 1969. V. 16. P. 1571-1577.
214. Muzzarelli R.A.A., Rocchetti R., Accoroni V. // Sep. Sci. Technol. 1978. V. 13. N 2. P. 163-173.
215. Kondo K., Kido T. // Abstracts of 4th Conf. of European Chitin Soc, Ancona, Ancona University. 2001. P. 67.
216. Hoshi Suwaru, Yamada Masato, Inoue Sadawobu et. al. // Talanta. 1989. V. 36. N 4. P. 606-608.
217. Lopez de Alba P.L., Urbina Z.B., Lopez-Martinez L. // Bol. Soc. Chil. Quim. 1989. V. 34. N 3. P. 165-172.
218. Baba Y., Masaaki K., Kawano Y. // Chem. Lett. 1994. N 12. P. 2389-2392.
219. Васюкевич Т.А. // Материалы Пятой конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО. 1999. С. 217-219.
220. Li Chunfang, Li Bangliang. // Huaxue Shijie. 1990. V. 31. N 2. P. 69-70.
221. Guibal E., Larkin A., Contandriopoulos Y., et al. // Advances in Chitin Science. Vol. III. Proc. of Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symp. Taiwan, NTO Univ., 1998. P. 456-458.
222. Pat. 4.120933 US, 1978. Cl. C 01G56/00.
223. Saucedo I., Guibal E., Roulph C. et al. // Environ. Technol., 1992. V. 13. N 12. P. 1101-1115.

224. Кулаков В.М., Величко Б.А., Горовой Л.Ф. и др. // Экология промышленного производства. 1993. №2. С. 31-34.
225. "Advances in technologies for the treatment of low and intermediate level, radioactive wastes". Technical Rep. Series N 370. Vienna, International Atomic Energy Agency. 1994. 102 p.
226. Горовой Л.Ф., Косяков В.Н., Сулімов В.П. // Чорнобильська аварія, // наслідки та проблеми їх подолання. Тези конф. Київ, 20-21 квітня 1994. Київ, 1994. Т. 3. Т. 93-94.
227. Горовой Л.Ф., Косяков В.Н., Кривенко П.В. и др. // Тез. Докл. 5 Междунар. н.-т. конф. "Чернобыль-96". Киев. Сильвер Полиграф. 1996. С. 147.
228. Gorovoj L., Kosyakov V., Veleshko I. // Chitosan in Pharmacy and Chemistry, (Eds.) Muzzarelli R.A.A., Muzzarelli C, Proc. of 4th Conf. of European Chitin Soc. 524 p., Ancona, Atec Edizioni. 2002. P. 353-358.
229. Горовой Л.Ф., Косяков В.Н., Кузнецов Г.И. и др. // Пат. 2165284 РФ., B01 D15/00, G21F9/12.
230. Technique for Identifying Transuranic Speciation in Aquatic Environments, Panel Proceedings Series N 613, Vienna, International Atomic Energy Agency. 1981. 114 p.
231. Wu Changxian, Li Rongchun. // Huanjing Kexue. 1986. V. 7. N 1. P. 81-85.
232. Muzzarelli R.A.A. // Anal. Chim. Acta. 1971. V. 54. P. 133-142.
233. Klopotek A., Wlasiuk D., Klopotek B.B. // Chitin World. Proc. 6th Int. Conf. "Chitin and Chitosan". Aug 16-19. 1994. Gdynia. Poland. Abstr. Poland. 1994. P. 33.
234. Чернецкий В.Н., Нифантьев Н.Э. // Пат. 2099351 РФ. C08B37/08.
235. Косяков В.Н., Велешко И.Е., Чернецкий В.Н. и др. // Пат. 2110858 РФ. G21 F9/10.
236. Taha S., Bouver P., Corre G. et al. // Advances in Chitin Science. V. I. Proc. of the 1st Int. Conf. European Chitin Soc, Lyon: Jacques Andre Publisher. 1995. P. 389-392.

ХИТОЗАН В ХРОМАТОГРАФИИ

С.А. Лопатин

Центр "Биоинженерия" РАН, Москва
lopatin@biengi.ac.ru

Уникальные свойства хитина и хитозана определяют широкое их использование в различных видах хроматографии в качестве структурного компонента хроматографических носителей, в качестве специфических лигандов, а иногда одновременно сочетая обе эти функции. Хитозан находит также применение в качестве спейсера, соединяющего носитель и лиганд. В этой главе будут рассмотрены некоторые примеры применения хитина и хитозана в колоночной жидкостной хроматографии именно в том классическом варианте хроматографии, в котором она была открыта в начале XX в. русским ученым М.С. Цветом как способ разделения веществ.

АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В основе принципа аффинной хроматографии (от affinity (англ.) - сродство) лежит способность биологически активных веществ образовывать стабильные, специфические и обратимые комплексы. Это могут быть пары природных соединений, таких как фермент-субстрат, фермент-ингибитор, фермент-кофактор и др. В этом случае один из компонентов комплекса может быть иммобилизован на поверхности носителя и использоваться в качестве лиганда для очистки второго. Аффинный лиганд также может быть искусственной природы, например объемные молекулы красителей или хелатирующие агенты, заряженные ионами переходных металлов. В аффинной хроматографии, как правило, взаимодействие между сорбатом и лигандом происходит одновременно по нескольким механизмам, преимущественно по ионному, гидрофобному и координационному. Следует сказать, что, как и большинство хроматографических методов выделения биополимеров, аффинная хроматография осуществляется в режиме сорбция-десорбция.

Хитин является потенциально возможным сорбентом для аффинной очистки ферментов, способных катализировать его синтез или деполимеризацию. При этом он может одновременно выполнять роли и носителя, и аффинного лиганда. В этом случае хитин называется макролигандом [1]. Однако получение таких сорбентов связано с рядом проблем. Во-первых, кристаллический хитин является непористым материалом и, как следствие, имеет незначительную удельную поверхность и низкую сорбционную емкость по белкам. Во-вторых, являясь субстратом для выделяемых ферментов, может подвергаться энзиматическому расщеплению в процессе хроматографической очистки. Для устранения первого недостатка требуется получать макропористые сорбенты, что достигается растворением полисахаридной основы с последующим ее переосаждением в специально подобранных условиях. Главным препятствием при реализации этого подхода является практически полная нерастворимость хитина. На сегодняшний день существует несколько различных способов получения крупнопористого хитина. Можно растворять непосредственно хитин в диметилацетамиде-LiCl [2] или в той же системе с добавлением N-метил-2-пирролидона [3]. Проблему нерастворимости хитина можно решить и с помощью его химиче-

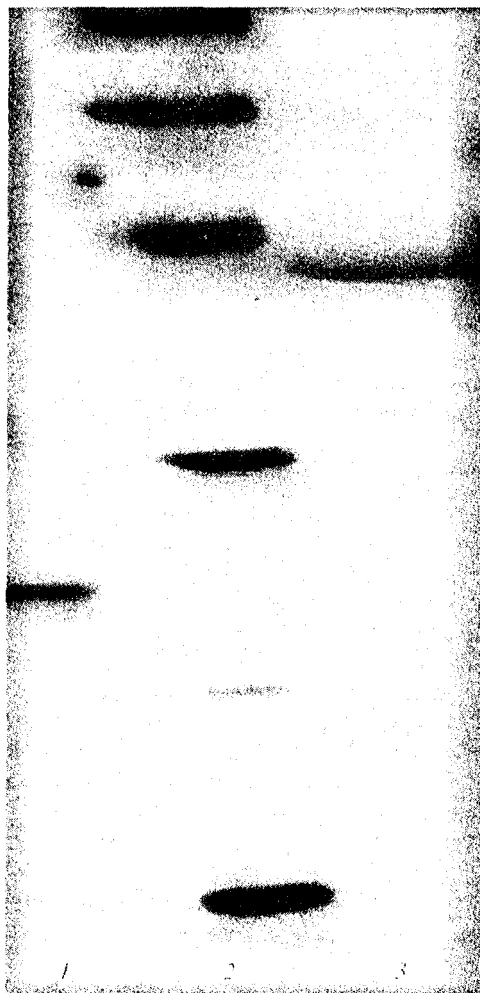


Рис. 1. Электрофорез в денатурирующих условиях [6]
1 – Хитиназа 2,6 кДа; 2 – белки-маркеры; 3 – хитиназа 42 кДа

ской модификации, например, ангидридом масляной кислоты [4]. Бутирированный хитин хорошо растворяется в тетрагидрофуране и легко регенерируется омылением в щелочных условиях. Однако всем этим способам свойственен один недостаток: хитин, полученным осаждением из неводной среды, имеет вторичную структуру, отличную от природного полисахарида. И это может сказываться на степени сродства к тем или иным выделяемым объектам. Поэтому на практике гораздо чаще используются сорбенты, полученные на основе хитозана с последующим N-ацелированием в мягких условиях. Такой подход является наиболее перспективным и универсальным по следующим причинам:

- 1) хитозан растворим в разбавленных растворах кислот и формирование гранул сорбента происходит в водной среде, что обеспечивает укладку полимерных цепей в конформации, близкой к природной;
- 2) за счет свободных аминогрупп получаемый сорбент может быть обработан бифункциональными сшивающими агентами, такими, как глутаровый диальдегид [5]; кроме того, можно получать поперечно-сшитый хитозан и через гидроксильные группы, например, с помощью 2,3-эпоксипропилхлорида [6]; такая обработка не только повышает механическую прочность, но и является главным способом борьбы с ферментативным расщеплением хитиновой матрицы [7]; при обработке

уксусным ангидридом можно варьировать конечную степень дезацелирования, что позволяет направленно изменять аффинные свойства сорбентов [6]; 3) через свободные аминогруппы можно ковалентно присоединять различные лиганды другой природы и получать сорбенты для разных видов хроматографии, в том числе ионообменной, гидрофобной, металло-хелатаффинной и т.д. В этом случае хитин будет использоваться только как носитель.

Какие же белки выделяют на хитиновых сорбентах? В первую очередь это различные хитиназы и родственные им ферменты. При этом нередко за одну стадию аффинной хроматографии достигается высокая степень очистки, позволяющая получать электрофоретически гомогенный белок. В качестве примера можно привести выделение одной из хитиназ хитинолитического комплекса *Streptomyces kurssanovii* [8]. А в специально подобранных условиях из того же комплекса можно выделить в одну стадию две индивидуальные хитиназы (рис. 1) [6].

Аффинная очистка на поперечно сшитом с помощью эпихлоргидрина коллоидном хитине дает положительные результаты и при выделении из *Streptomyces* других ферментов хитинолитического комплекса. В их числе можно упомянуть хитобиазу и N-ацетилгексозаминидазу [9]. Выделяемые ферменты могут быть как микробиологического происхождения, так и растительные. С помощью хитиновых сорбентов были выделены растительные хитиназы из риса [10] или гладиолусов [11]. Поскольку хитин подвергается биодegradации не только хитинолитическими ферментами, но другими гидролазами, они также могут являться объектами для выделения на подобных аффинных сорбентах. Среди описанных примеров можно указать на выделение яичного лизоцима [12].

В целом, белков, связывающихся с хитином, не так много и это до недавнего времени ограничивало применение хитиновых сорбентов. Однако в этом оказался и положительный момент. Недавно появившийся метод выделения рекомбинантных белков основан на взаимодействии хитинсвязывающего фрагмента белка с гранулированным хитином. Для этого к гену нужного белка присоединяется ген, кодирующий синтез небольшого (5 кДа) хитинсвязывающего фрагмента, выделенного из С-концевого участка хитиназы A1 *Bacillus circulans* WL-12. Этот участок, состоящий из 52 аминокислотных остатков, имеет высокое сродство к хитину, но при этом не связывается с другими полисахаридами, например, целлюлозой, ксиланом, амилозой. Причем хитин должен быть высокомолекулярным, так как к олигомерам хитина со степенью полимеризации от 1 до 6 этот хитинсвязывающий полипептид не имеет сродства ни в растворе, ни в случае их иммобилизации на агарозе. Вся эта конструкция экспрессируется в *E. coli*, которая и продуцирует химерный рекомбинантный белок, содержащий на С- или N-конце хитинсвязывающий участок. Процедура выделения целевого белка достаточно проста: после нанесения на хитиновый сорбент, получаемый ацелированием хитозана с молекулярной массой 750 кДа, и отмывания примесей колонку оставляют при пониженной температуре на ночь в буфере, содержащем дитиотреитол или β -меркаптоэтанол. За это время связь между С-концевым аланином нативного белка и цистеином хитинсвязывающего фрагмента гидролизуеться на 80-90%. Затем целевой белок легко элюируется, а оставшийся фрагмент удаляется с хитинового сорбента с помощью детергентов [13-15] (рис. 2).

Наличие в хитозане amino- и гидроксильных групп позволяет получать его производные как с одинаковыми, так и разными заместителями. Благодаря этому можно получать соединения с отличными от нативного хитозана аффинными свойствами. Так N-сульфосукцинат хитозана, ковалентно иммобилизованный на пористом силикагеле был использован для выделения щелочной фосфатазы из кишечника тюленя [16], применяемую как фермент-маркер в иммуноферментном анализе. Поскольку эту фосфатазу также выделяют на сорбентах, содержащих в качестве лигандов гепарин или конканавалин А, можно предположить, что N-сульфосукцинированный хитозан частично приобретает свойства этих биополимеров. При получении сорбентов из хитозана в качестве ацелирующего агента можно использовать не уксусный ангидрид, а его более высокие гомологи, что позволяет направленно изменять их гидрофобность, тем самым расширяя область применения таких сорбентов. Зависимость эффективности очистки фермента от гидрофобности полученного сорбента была исследована при выделении фосфорилазы [17]. Было найдено, что хитиновый (т.е. ацелированный уксусным ангидридом) сорбент практически не имеет сродства к этому ферменту. Но уже производное хитозана, ацелированное ангидридом

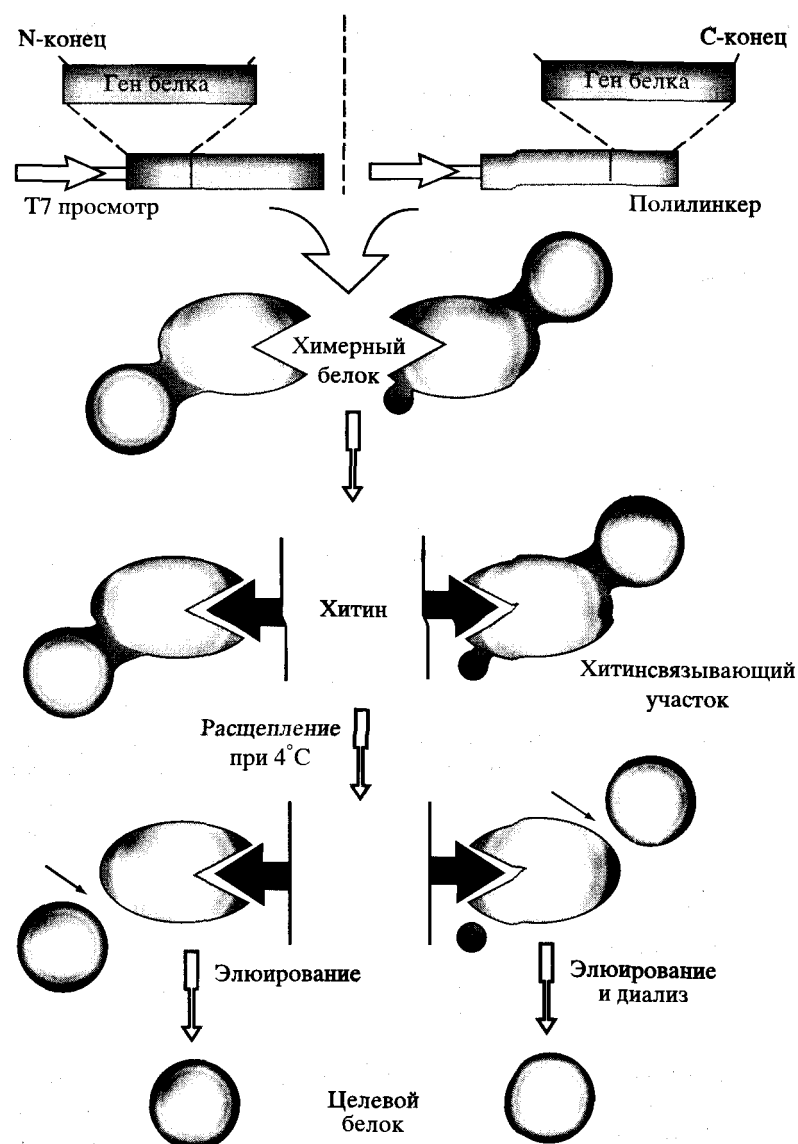


Схема получения рекомбинантных белков с использованием хитинсвязывающего сайта [15]

масляной кислоты, количественно сорбирует фосфорилазу, позволяя проводить очистку с высоким выходом. Использование же более гидрофобных модификантов усиливает сродство к ферменту до такой степени, что удастся десорбировать не более 20% фосфорилазы.

Кроме рассмотренных случаев, где хитин выступает в роли лиганда, есть и другая область его применения в хроматографии- Такие параметры, как высокая механическая прочность, хорошие гидродинамические показатели, стабильность при хранении, незначительная неспецифическая сорбция делают хитин вполне подходящим материалом для хроматографических носителей. Так овомукоид цыпленка, используемый в качестве аффинного лиганда при очистке

трипсина, был иммобилизован на агарозе и поперечно сшитом хитозане. Сравнение результатов очистки на этих двух сорбентах показало, что сорбент на основе хитозанового носителя не только не уступает широко распространенному агарозному, но, по некоторым параметрам даже его превосходит [18].

ХИРАЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Оптически активные соединения играют исключительно важную роль во многих биохимических процессах, их исследование имеет принципиальное значение для теоретической органической химии и фармации, а контроль оптической чистоты производимых лекарственных средств в настоящее время законодательно введен во всех промышленно развитых странах. Этим и объясняется все возрастающий интерес исследователей к совершенствованию старых и разработке новых методов разделения рацематов и контроля оптической чистоты разделяемых продуктов. Использование хроматографических методов разделения энантиомеров позволяет не только получать хиральные соединения со стопроцентной степенью оптической чистоты, но и, что особенно важно, перейти от эмпирического поиска разделяющих систем к созданию систем, осуществляющих разделение целых классов соединений на вполне рациональной основе с вполне предсказуемым результатом.

Для создания эффективных хроматографических методов разделения энантиомеров необходимо более углубленное изучение процессов хирального распознавания энантиомеров в хроматографических системах, совершенствование способов синтеза и структуры применяемых неподвижных фаз, а также создание новых хиральных неподвижных фаз, как синтетических, так и фаз на основе природных соединений. Весьма перспективны для создания хиральных неподвижных фаз полисахариды, так как они имеют асимметрические центры в каждом структурном звене.

В последнее время различные производные природных полисахаридов, таких как целлюлоза, амилоза, хитозан, ксилан, декстран, адсорбционно или химически закрепленных на силикагеле, успешно применяются в качестве хиральных неподвижных фаз для разделения многих рацемических соединений, причем хитозан в этом ряду играет далеко не последнюю роль. Это обусловлено наличием в его молекуле заряженных группировок и возможностью получения как ди-, так тризамещенных производных при модификации, соответственно, хитина и хитозана, что позволяет в более широком диапазоне варьировать сорбционные свойства синтезируемых лигандов [19].

В соответствии с химической природой хитозана, разделение на нем может быть обусловлено следующими взаимодействиями: анионным обменом с протонированной аминогруппой (или с образованием комплексов с переносом заряда при участии аминогруппы в качестве электронодонорной компоненты), адсорбцией на гидроксильных группах, образованием хелатных комплексов, гидрофобными взаимодействиями, а также стерически селективным образованием комплексов включения с сорбатами или различными комбинациями этих взаимодействий. Преимущественное протекание какого-либо процесса определяется составом и свойствами подвижной фазы [20].

Из всех видов хроматографии при хиральном распознавании различия во взаимодействии разделяемых компонентов со стационарным лигандом минимально, что диктует необходимость максимального повышения эффективности процесса. В первую очередь это достигается использованием режима высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), где маленький размер частиц носителя (3-10 мкм) вызывает необходимость использования высокого да-

вления. При этом используемые носители должны быть несжимаемыми и абсолютно жесткими. Понятно, что хитозан, как и другие полисахариды, не обладает этими свойствами, поэтому в режиме ВЭЖХ используется только в качестве лиганда, иммобилизованного на кремнеземной или полистирольной поверхности. И здесь снова возникает проблема ограниченной растворимости хитина и хитозана. Для ее решения чаще всего применяется химическая дериватизация, и большинство известных сорбентов содержат в качестве хиральных селективов модифицированные полисахариды. Среди них наиболее удачными оказались арилкарбаматы, получаемые взаимодействием арилизоцианатов с соответствующим полисахаридам. Помимо увеличения растворимости такая модификация расширяет спектр реализуемых механизмов взаимодействия с энантиомерами. Хиральное распознавание на таких неподвижных фазах можно объяснить формированием внутрицепных и междупептидных комплексов включения с разделяемыми энантиомерами, а также взаимодействием сорбатов с полярной карбаматной группой, т.е. образованием водородных связей между NH и C=O группами и диполь-дипольными взаимодействиями между C=O-группами [21].

Таким образом, способность данных неподвижных фаз к стерической дискриминации зависит и от природы заместителя в бензольном кольце арилкарбонильной группы. Среди исследованных замещенных арилкарбаматов применение фенил- и 3,5-диметилфенилкарбаматов оказалось наиболее удачным для разделения рацемических соединений различных классов. И хотя они и являются сейчас наиболее широко используемыми, в том числе и для получения коммерчески доступных неподвижных фаз, находят применение и другие производные природных полисахаридов. Например, хитозан, модифицированный бензоилхлоридом, дает хорошие результаты по разделению оптических изомеров [22].

Для получения неподвижных фаз на основе производных хитина и хитозана возможна как физическая адсорбция [23], так и химическое закрепление производных полисахаридов на силикагеле. Адсорбированные полисахариды и их производные частично растворяются или набухают в таких растворителях, как хлороформ, толуол, этилацетат или ацетон. Следовательно, выбор элюента в этом случае ограничен. Несмотря на то, что химическое закрепление полисахаридов и их производных на силикагеле более трудоемкий процесс, он, в большинстве случаев оправдывает себя, так как получаемые неподвижные фазы более стабильны, обладают лучшими хроматографическими характеристиками и высокой устойчивостью к различным растворителям. Однако химическая иммобилизация имеет ряд ограничений, связанных с отсутствием в модифицированных полисахаридах реакционно способных групп и нестабильностью силикагеля при щелочных pH. Поэтому при получении указанных производных хитозана одновременно добавляется и модификант, содержащий функциональную группу, через которую проводится ковалентное закрепление на сорбенте. Одним из примеров может служить присоединение к аллилсиликагелю арилкарбаматов хитозана с предварительно введенными аллильными группами, проходящее по реакции радикальной полимеризации [24]. Разрешающая способность полученных таким образом хиральных фаз зависит от соотношения привитых аллильных и арилкарбаматных групп: увеличение доли арилкарбаматных групп улучшает разрешение рацемических смесей. Кроме того, эти сорбенты проявляют высокую устойчивость к таким растворителям, используемым в жидкостной хроматографии, как хлороформ и тетрагидрофуран, в которых сами полисахариды растворимы или набухают. Второй возможный подход состоит в получении низкомолекулярных (5-10 кДа) водорастворимых образцов хитозана, которые через аминокислотные группы ковалентно присоединяются к сили-

кагелю [25]. При необходимости введения ароматических заместителей эту реакцию можно проводить непосредственно на сорбенте. В этом случае возможно получение сорбентов на основе одного и того же лиганда с различными заместителями, что позволяет оценить вклад каждого из них в процесс хирального распознавания оптических изомеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tyagi R., Kumar A., Sardar M. et al. // Sol. Purif. 1996. 56. № 6. P. 610-617.
2. Rutherford F.A., Austin P.R. // Proceeding of the first International conference on chitin and chitosan (Eds. R.A.A. Muzzarali and E.R. Praiser) MIT Sea grant Program, Cambridge, MA, 1977. P. 182-192.
3. Uragami T., Ohsumi Y., Sugihara M. // Polym. 1981. V. 22. P. 1155-1156.
4. Szosland L.J. // Bioactive and Compatible Pol. 1996. V. 11. P. 61-71.
5. Senstad C., Mattiason B. // Biotechnol. Bioengin. 1989. V. 33, 216-220.
6. Ilyina A.V., Tichonov V.E., Varlamov V.P. et al. // Biotechnol. Appl. Biochem. 1995. V. 21. P. 139-148.
7. Tichonov V.E., Yamskov I.A., Varlamov V.P. et al. // Ibid. 1993. V. 17. P. 251-256.
8. Ilyina A.V., Varlamov V.P., Tichonov V.E. et al. // Ibid. 1994. V. 19. P. 199-207.
9. Charpentier M., Percheron F. // Int. J. Biochem. 1983. V. 15(3). P. 289-292.
10. Anuratha C.S., Huang J.K., Pingali A., Muthukrishnan S. // J. Plant. Biochem. Biotechnol. 1992. V. 1 (1). P. 5-10.
11. Yamagami T., Mine Y., Aso Y., Ishiguro M. // Biosci Biotech. Biochem. 1997. V. 61(12). P. 2140-2142.
12. Ruckenstein E., Zeng X. // Biotechnol. Bioeng 1997. V. 56(6). P. 610-617.
13. Szweda P., Pladzyk R., Kotlowski R., Km J. // Protein. Expr. Purif. 2001. V. 22(3). P. 467-471.
14. Brandt J.J., Chatwood L.L., Crowder M.W. // Protein Expr. Purif. 2000. V. 20(2). P. 300-307.
15. Internet [http:// www.neb.com](http://www.neb.com)
16. Пат. РФ № 2036236 (25.12.92, 27.05.95).
17. Baba T., Yamaguchi R.Y., Aral Y., Itoh T. // Carbohydr. Res. 1980. V. 86(1). P. 161-164.
18. Shi Y.-C., Jian Y.-M., Sui D.-X. et al. // J. Chromatogr. A (1996). V. 742(1-2). P. 107-112.
19. Cass O.B., Bassi A.L., Matlin S.A. // Chirality. 1996. V. 8. P. 131-135.
20. Rajakyla E. // J. Chromatogr. 1986. V. 353. P. 143-148.
21. Okamoto I., Kawashima M., Hatada K. // Ibid. 1986. V. 363. P. 173-178.
22. Senso A., Oliveros L., Minguillon C. // Ibid. A. 1999. V. 839. P. 15-21.
23. Okamoto Y., Noguchi J., Yashima E. // React. Funct. Polymers. 1998. V. 37. P. 183-188.
24. Franco P., Senso A., Minguillon C., Oliveros L. // Chromatogr. A. 1998. V. 796. P. 265-272.
25. Буданова Н.Ю., Шаповалова Е.Н., Лопатин С.А. и др. // Вест. МГУ. Сер. 2. Химия. 2000. Т. 42. №2. С. 112-115.

ПЛЕНКИ И ВОЛОКНА НА ОСНОВЕ ХИТИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Г.А. Вихорева, Л.С. Гальбрайх

Московский государственный текстильный университет, Москва
vihorevag@mail.ru

Пленко- и волокнообразующие свойства хитина и хитозана известны давно [1], но именно в последнее время резко возросло число публикаций, посвященных получению и изучению пленок на их основе. Это связано как с потребностями различных отраслей, так и с существенным повышением качества этих полимеров как сырья и уникальными свойствами пленок, получаемых на их основе. Природное происхождение, биосовместимость, нетоксичность, высокие сорбционные свойства хитозана по отношению к воде, ионам металлов, органическим молекулам, хорошие механические свойства пленочных изделий обуславливают перспективность использования их, главным образом, для медицины и в качестве разделительных мембран. Интерес обусловлен также растворимостью хитозана и других производных хитина в водных средах, что существенно упрощает и снижает экологическую опасность процессов переработки этих полимеров в изделия. В настоящем обзоре изложены данные об основных закономерностях получения пленок и волокон на основе хитина, хитозана и их производных и путях регулирования их структуры и свойств с учетом практического назначения.

ХИТОЗАНОВЫЕ ПЛЕНКИ. СТРУКТУРА, СОРБЦИОННЫЕ И ПРОЧНОСТНЫЕ СВОЙСТВА

Рассматриваемые полисахариды являются стереорегулярными относительно жесткоцепными кристаллизующимися полимерами [2-4]. Показана возможность регулирования степени кристалличности хитозановых пленок изменением ММ, концентрации полимера в растворе, а также изменением способа формирования (сухой термической или мокрый коагуляционный) и последующих обработок пленок [5]. Так, более высокомолекулярный хитозан, макромолекулы которого обладают меньшей подвижностью, образует пленки с меньшей степенью кристалличности и размерами кристаллитов и большей их дефектностью. Рентгеноструктурными и электронномикроскопическими исследованиями пленок и волокон, водных суспензий и замороженных растворов хитина и хитозана показано, что эти полисахариды могут образовывать кристаллические надмолекулярные образования сферической и фибриллярной формы [6]. Кристаллические области определяют прочность пленок и волокон, а аморфные, в которых макромолекулы имеют большую подвижность при набухании в сорбате, - сорбционные и транспортные свойства полимерных пленок (мембран). Поэтому вопросам регулирования и изучения структурных особенностей полимерных мембран уделяют большое внимание.

Традиционно хитозановые пленки формуют по сухому способу из водно-кислотных растворов, в которых полимер находится в солевой форме (С-форма), с последующим переводом полимера в водонерастворимую форму полиоснования (О-форма) обработкой раствором едкого натра. В то же время показана

возможность получения прочных хитозановых пленок и формированием по мокрому способу [7-10], в том числе с приложением электрического поля, способствующего формированию высокоориентированной надмолекулярной структуры пленок [8-10]. В качестве растворителя используют разбавленные водные растворы летучих одноосновных карбоновых кислот: уксусной и, реже, муравьиной. Пленки, сформованные из растворов соляной кислоты в отсутствие пластификаторов, характеризуются высокой хрупкостью и растрескиваются при отверждении.

Согласно общепринятым представлениям [11] при мокром способе формирования при попадании раствора полимера в осадительную ванну диффузионные процессы приводят к замене растворителя на осадитель. С точки зрения фазовых равновесий система с заданными параметрами (концентрация, температура) оказывается термодинамически неустойчивой, следствием чего является ее застуднение и синергетическое отделение жидкой фазы. Структурные особенности получаемых таким способом пленок будут определяться молекулярной массой полимера и его концентрацией в растворе, составом растворителя, составом и температурой осадительной ванны [11].

При формировании полимерных мембран по сухому (термическому) способу так же, как и при мокром, определяющими факторами являются природа и однородность полимера, состав (качество) растворителя, концентрация раствора, температура, толщина жидкой пленки и свойства подложки. Формование пленок по сухому способу из двухкомпонентных растворов, содержащих полимер и растворитель, принципиально возможно без распада системы на фазы, и испарение растворителя приводит к формированию непористой и структурно однородной пленки. Возможными причинами неоднородности мембраны в этом случае может быть различная скорость диффузии и испарения растворителя из разных слоев жидкой пленки и адгезия полимера к подложке. Однако применение однокомпонентного растворителя и отсутствие протекания каких-либо химических превращений полимера при формировании пленок по сухому способу является скорее исключением, и смешанные растворители специально используют для регулирования структуры мембран. При этом различие скоростей испарения компонентов растворителя на начальных стадиях приводит к обогащению системы более высококипящим компонентом и ухудшению качества растворителя, что, в свою очередь обуславливает фазовое разделение системы и гетерогенность структуры мембраны [12].

Как сказано выше, при формировании хитозановых пленок в качестве растворителя используют водные растворы летучих одноосновных уксусной, муравьиной кислот, образующих с хитозаном соответствующие соли. При высушивании раствора происходит изменение не только концентрации полимера и состава и качества растворителя, но, возможно, и степени протонирования аминогрупп хитозана. Интересным является тот факт, что сродство и скорость набухания хитозана в парах бинарных смесей уксусная кислота (УК)-вода экстремально зависят от их состава [13, 14]. Наибольшим сродством к хитозану обладают пары 75-77%-ной уксусной кислоты, то есть с примерно эквимольным соотношением компонентов (табл. 1).

Экстремальный характер имеет также зависимость вязкости растворов хитозана от концентрации УК [15]. Совокупность имеющихся данных о растворимости хитозана в растворах уксусной кислоты разной концентрации и о сорбции хитозаном паров воды, уксусной кислоты и их смесей позволяет предположить, что диаграмма фазового состояния тройной системы хитозан-вода-уксусная кислота имеет вид, изображенный на рис. 1. В воде, уксусной кислоте и их сме-

Таблица 1. Некоторые характеристики системы хитозан-уксусная кислота-вода и пленок, сформированных из растворов в УК разной концентрации

Концентрация УК, мас. %	Набухание хитозана в парах растворов УК за 15 сут., мас. %	η 1%-ного раствора хитозана при $j = 3 \text{ с}^{-1}$, $\text{Па} \cdot \text{с}$	σ_p , * МПа ± 10	ϵ_p , % ± 5
1	140	—	180/150	44/23
2	280	0,01	140/107	42/20
8	300	1,8	120/103	39/16
25	320	1,9	190/160	35/20
50	400	2,5	—	—
60	500	2,8	—	—
75	630	1,3	145/135	36/20
80	330	—	—	—
90	150	1,2	135/115	40/18

* В числителе хитозан с ММ $5,5 \times 10^5$, в знаменателе – хитозан с ММ 1×10^5 .

сях с небольшим содержанием второго компонента хитозан лишь ограниченно набухает, но не растворяется (точки на сторонах треугольника и области 7), а в других смесях происходит неограниченное набухание и растворение полимера с образованием тем более концентрированных растворов, чем ближе состав растворителя приближается в эквимольному, т.е. к содержанию в нем 77 мас. % уксусной кислоты. Величины равновесной степени сорбции паров воды и уксусной кислоты порошкообразным хитозаном (ММ $5,5 \times 10^5$, степень кристалличности -50%) составляют 0,5 и 1,55 г/г, что в обоих случаях соответствует 4-4,5 моль сорбата на моль хитозана [15]. Примерное равенство сорбционной способности хитозана по отношению к парам воды и УК, выраженной в моль/моль, очевидно, обусловлено наибольшим сродством хитозана именно к эквимольной смеси этих реагентов. Состав пленок, полученных высушиванием растворов полимера с разным содержанием уксусной кислоты (на рис. 1 стрелки А, В и С), близок к эквимольному содержанию хитозана, кислоты и воды, что также подтверждает наибольшее сродство хитозана к эквимольной смеси уксусной кислоты и воды.

На рис. 1 кривая 3 является границей между растворами (область 2) и нетекучими физическими гелями, при высушивании которых происходит формирование пленок из уксусно-кислой соли хитозана (область 4). Нейтрализация последних приводит к получению пленок из хитозана в форме полиоснования. Из

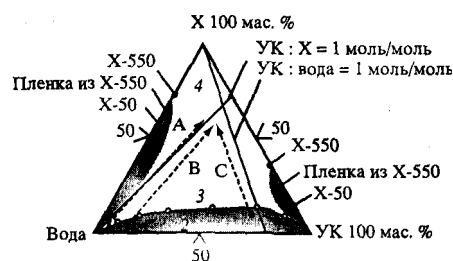


Рис. 1. Диаграмма состояния системы хитозан- $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{O}$

$T = 20^\circ \text{C}$; число в обозначении хитозана указывает ММ в кДа; другие обозначения см. в тексте

представленной диаграммы видно, что при формировании пленок высушиванием растворов полимера в 1-2%-ной уксусной кислоте (путь А) существует вероятность фазового разделения системы и получения структурно неоднородной пленки, тогда как в случаях В и С система и получаемая пленка должны быть более однородными.

Полученные в результате распада раствора полимера на фазы пленки представляют собой импрегнированные жидкостью гетерогенные пористые

структуры. При испарении жидкости на последних стадиях отверждения или при сушке мембраны после промывки поры сжимаются и исчезают под действием сил контракции. Однако исчезновение пористости и гетерогенности носит кажущийся и обратимый характер, и образующиеся при этом материалы авторами [16] названы криптогетерогенными. О гетерогенности структуры таких пленок свидетельствует помутнение, то есть появление пористости и рассеивающей поверхности при набухании их в воде. Высушенные, они вновь становятся прозрачными, не обнаруживающими при электронномикроскопических и рентгенооскопических исследованиях неоднородностей.

Учитывая, что при формировании гидратцеллюлозных пленок по мокрому (вискозному и медноаммиачному) способу происходит фазовое разделение в системе раствор полимера - осадительная ванна, а при формировании хитозановых пленок по сухому способу также не исключена возможность фазового разделения системы до перехода ее в твердое состояние, гидратцеллюлозные и хитозановые мембраны, очевидно, нужно считать криптогетерогенными. Такое название оправдывается и свойствами этих пленок: высокой скоростью набухания в водных средах, соизмеримой с капиллярным натеканием, существенной зависимостью набухания от гидротермических обработок, помутнением при набухании свежесформованных пленок, большой усадкой и уплотнением структуры при сушке [17]. При обработке хитозановой пленки в солевой форме раствором щелочи и водой при термообработке сухой пленки происходит релаксация внутренних напряжений и частичная потеря криптогетерогенности. Варьируя условия формирования и последующих обработок, можно, очевидно, превратить их в гомогенные или, наоборот, закрепить развитую капиллярно-пористую структуру. Таким образом, с точки зрения структурных особенностей представляется оправданным рассматривать хитозановые пленки как занимающие промежуточное положение между формуемыми по мокрому способу гидратцеллюлозными (наиболее криптогетерогенными) и формуемыми по сухому способу поливинилспиртовыми (наиболее гомогенными).

Как при любом модельном подходе, в изложенной структурной модели полимерных мембран, объясняющей их поведение при набухании, абсолютизирована роль капиллярного давления, контракции пористой системы и наличия внутренних напряжений. Вместе с тем нельзя игнорировать вклад других факторов, например, наличия в хитозановых пленках ионизованных аминогрупп и противоионов и, следовательно, осмотических явлений. Структура хитозановых пленок, модифицированных (поверхностно или в объеме), сшивающими реагентами, введением других полимеров или биологически активных веществ, безусловно, будет характеризоваться своими особенностями.

Сорбционные свойства пленок представляют не только практический интерес, но и наиболее полно отражают их структурные особенности. Изучение кинетики набухания хитозановых пленок в воде показало, что они очень быстро набухают в воде (рис. 2, кривые 1, 2). При этом процесс характеризуется явлением синерезиса - количество воды, сорбированной на начальной стадии, несколько снижается при последующем пребывании пленки в воде (см. рис. 2, кривая 1) [18, 19]. Закономерно, что для частично отрелаксированной высушиванием при 110 °С до постоянной массы хитозановой пленки (см. рис. 2, кривая 2) характерны отсутствие синерезиса и меньшая величина равновесного набухания. (Точнее, квазиравновесного, так как для неотрелаксированных пленок термодинамические величины носят "эффективный" характер.) Высокие значения скорости и водопоглощения (B) непористыми полимерными пленками обусловлены, с одной стороны, химическим сродством сорбата и сорбента, а с другой, -

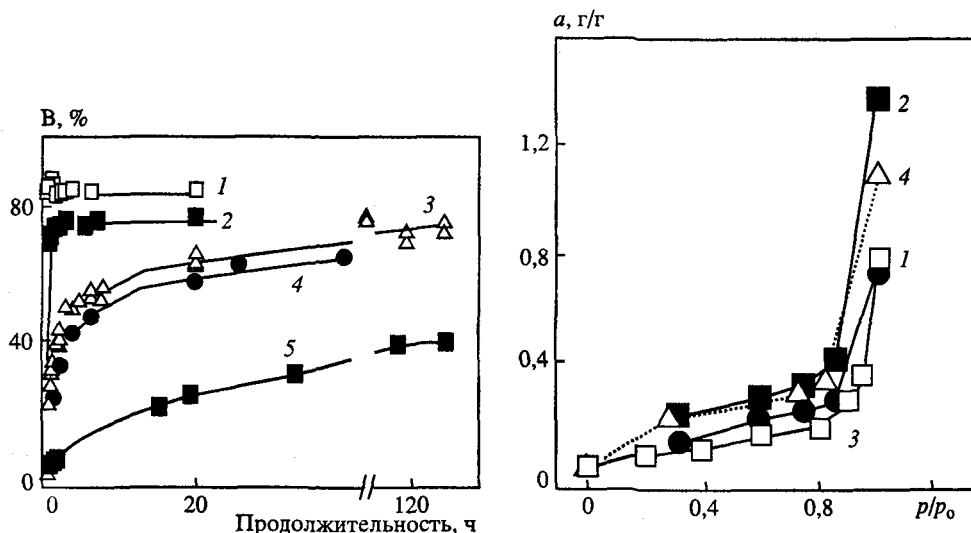


Рис. 2. Кинетика набухания воздушно (1, 3) и абсолютно сухих (2, 4 и 5) хитозановых пленок в воде (1, 2) и парах (3-5) при $p/p_0 = 1$

Рис. 3. Изотермы сорбции паров воды пленками хитозановыми в О- (1) и С-форме (2), гидратцеллюлозной (3) [17] и ПЭК-1(4). Степень протонирования аминогрупп в С-форме -0,5

относительно низкой степенью кристалличности неориентированных пленок. Процесс набухания пленок в насыщенных парах воды характеризуется меньшей скоростью и меньшей равновесной степенью набухания, достигаемой в течение нескольких суток (см. рис. 2, кривые 3, 4). Кинетические кривые сорбции воды хитозановыми пленками из-за структурных перестроек последних не удастся адекватно описать известными диффузионными моделями, не учитывающими изменений толщины мембраны и коэффициента диффузии сорбата в ходе процесса сорбции.

Сорбция воды гидрофильными и набухающими полимерами с неравновесной аморфно-кристаллической структурой, к которым относятся целлюлоза и хитозан, является сложным процессом. Литературные данные о сорбции воды и ее паров хитозановыми пленками, в отличие от таковых для целлюлозных материалов, немногочисленны [20-23]. Несомненный интерес для понимания процесса набухания хитозановых пленок имеет работа [24], в которой при использовании тяжелой воды в качестве сорбата, метода малоуглового нейтронного рассеяния и фрактальных представлений при интерпретации полученных данных показано, что воздушно-сухая хитозановая пленка, содержащая -10% влаги, является относительно однородным сплошным телом. Однако по мере набухания в полимере сначала появляется рассеяние от неоднородностей с резкой границей, которое можно отождествить с кластерами воды в порах фрактальной природы, затем фрактальная поверхность кластеров становится значительно более изрезанной.

По величине влагопоглощения как жидкой воды, так и ее паров (рис. 2 и 3) хитозановые пленки в О-форме очень похожи на целлофановые пленки и вискозное волокно [17, с. 105]. Согласно модели двойной сорбции [25], более выпуклый начальный участок изотермы сорбции хитозановой пленкой в О-форме (см. рис. 3, кривая 1) в сравнении с целлофановой (кривая 3) может быть связан

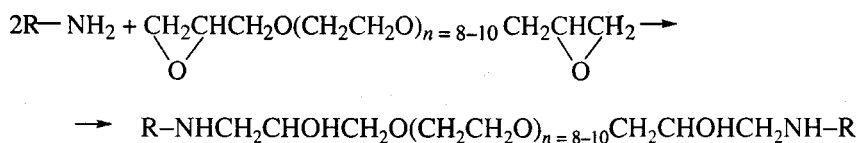
с большей аморфностью неориентированной хитозановой пленки. Изотермы сорбции паров воды пленками солевой формы хитозана (кривая 2), содержащими ионизованные группы, имеют значительно более выпуклый начальный участок и большие величины сорбции насыщенных паров воды.

Процесс водопоглощения хитозановыми пленками, как и целлофановыми, характеризуется отрицательным температурным коэффициентом, равным -3 кДж/моль. Величина теплоты десорбции связанной с полимером воды, рассчитанная по эндотермическому пику на кривых ДТА в температурном интервале 50-100 °С для образца со степенью набухания 5% близка к теплоте испарения чистой воды $\Delta H_{исп} = 2,3$ кДж/г, на основании чего сделан вывод, что основное количество поглощенной пленкой воды слабо связано с полимером [18]. В ряде публикаций [5, 6, 20, 21, 26-29], посвященных изучению структурных особенностей и свойств получаемых в разных условиях хитозановых пленок, показана возможность улучшения их термических, механических и сорбционных свойств.

ПЛЕНКИ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СШИВАЮЩИМИ РЕАГЕНТАМИ

Растворимость хитозана в кислых водных средах существенно облегчает его переработку в пленки, однако растворимость готовых пленок в ряде случаев является их недостатком, поэтому для повышения устойчивости хитозановых пленок в кислых средах проводят их модифицирование сшивающими реагентами, в частности, глутаровым альдегидом [30], диизоцианатами [31], серной кислотой [32] и другими. Такое модифицирование приводит к повышению селективности хитозановых мембран, поскольку при набухании в них формируются более стабильные транспортные каналы. Однако сшивка, снижая набухание и растворимость, часто приводит к повышению хрупкости полимеров и их жесткости. Поэтому особенно оправданным является выбор в качестве сшивающего реагента олигомерного относительно гибкоцепного диэпоксида - диглицидилового эфира олигоэтиленоксида (ДЭО) [18, 19].

Присоединение ДЭО к амино- и гидроксил со держащим соединениям в нейтральной водной среде происходит, в основном, по аминогруппам с образованием ковалентных связей между реагентами по схеме



В воде, вызывающей набухание пленки, при температуре 50-70 °С реакция заканчивается в течение 2 ч. Из данных табл. 2 видно, что увеличение количества реагента, температуры и продолжительности обработки приводят к возрастанию содержания в пленках связанного модификатора вплоть до 17% от массы пленки, однако степень его полезного использования в условиях такого модифицирования остается низкой. При получении объемно модифицированных пленок формованием из смесей растворов хитозана и ДЭО (пленки 7-11 см. табл. 2) количество связываемого ДЭО составляет 60-80% от взятого. По данным элементного анализа, состав этих пленок не изменяется после обработок кислыми и щелочными реагентами, что подтверждает факт присоединения модифицирующего компонента прочными ковалентными связями.

Таблица 2. Условия получения и характеристики модифицированных ДЭО хитозановых пленок [18]

Пленка*	Условия модификации*		Состав пленки		Механические свойства**		
	Реагент Хитозан, г/г	Время, ч	C/N, г/г	Содержа- ние ОЭ, мас. %	σ_p , МПа	ϵ_p , %	E, ГПа
1	Хитозановая пленка		5,56	0	136/29	42/224	2,0
Поверхностное модифицирование готовых пленок							
2	3,6	0,1	5,73	2,2	130	18	2,5
3	5,4	0,5	5,97	5,6	—	—	—
4	3,6	1,0	6,25	9,1	—	—	—
5	5,4	1,0	6,74	14,5	—	—	—
6	5,4	1,5	6,97	17,1	107/13	12/22	2,1
Формование пленок из смесей растворов							
7	0,04	—	5,81	3,4	157	21	2,6
8	0,06	—	5,88	4,3	—	—	—
9	0,08	—	6,06	7,0	—	—	—
10	0,12	—	6,46	11,6	146/14	19/47	2,8
11	0,20	—	6,63	13,5	—	—	—

В опытах 2-6 температура обработки 50 °С. В опытах 7-11 сухую модифицированную пленку прогревали при 70 °С в течение часа и далее переводили в О-форму.

** Воздушно-сухих пленок в числителе, набухших в воде - в знаменателе.

Как и предполагалось, все пленки, модифицированные ДЭО, потеряли способность растворяться в кислых водных средах. Наряду с потерей растворимости наличие сшивок подтверждено данными элементного анализа, в частности, уменьшением соотношения содержания азота первичных аминогрупп и общего азота по мере увеличения содержания в пленках этиленоксида (ОЭ). При этом необходимо отметить, что в поверхностно модифицированных пленках, содержащих, в целом, меньшее количество сшивок, чем объемно модифицированные пленки, образуются более сшитые поверхностные слои, поскольку преимущественно в них должен располагаться модифицирующий реагент.

Объемная модификация ДЭО приводит к упрочнению пленок, что объясняется образованием межмолекулярных сшивок. В то же время некоторое снижение прочностных характеристик поверхностно модифицированных пленок (рис. 4, кривые 2 и 3) может свидетельствовать о различных вкладах микро- и макронеоднородностей структуры в прочностные показатели полимерных пленок.

Модифицирование хитозановых пленок ОЭ существенно изменяет их набухание в воде и кислых водных средах, при этом характер изменения набухания у поверхностно и объемно модифицированных пленок различен. Поскольку сшивка, снижая химическую однородность и кристалличность хитозана, с одной стороны, должна приводить к повышению набухания, а с другой, способствуя формированию более плотной структуры и частично блокируя сорбционно активные центры полимера, - к снижению набухания, то экстремальный характер изменения *B* модифицированных хитозановых пленок (рис. 5) не является неожиданным. При одинаковом содержании ОЭ в поверхностно и объемно модифицированных хитозановых пленках более высокое

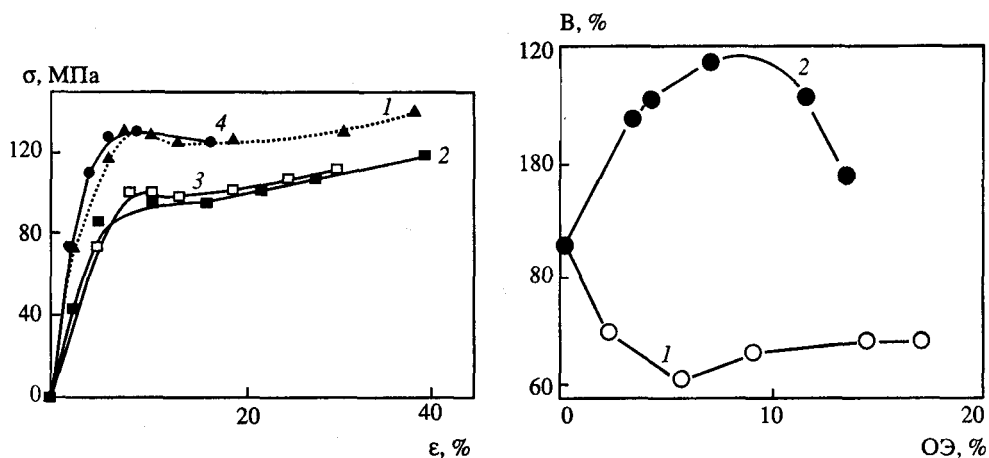


Рис. 4. Деформационно-прочностные кривые воздушносухих пленок хитозановых (1-3), модифицированных ОЭ поверхностно (2) и объемно (3) и из ПЭК-2 (4) [18]

Рис. 5. Влияние содержания ОЭ в поверхностно-(1) и объемно-(2) модифицированных пленках на степень их набухание в воде [18]

водопоглощение последних обусловлено повышением их химической неоднородности и, соответственно, снижением степени кристалличности, а также наличием большего количества межмолекулярных сшивок и, следовательно, внутренних напряжений. Закономерно, что поверхностно модифицированные ДЭО хитозановые пленки, содержащие более сшитые и более плотные поверхностные слои, характеризуются меньшей степенью и скоростью набухания и в кислых водных средах. Так, величины степени набухания в 0,1М растворе HCl составляют 95-65 и 210-130% соответственно для поверхностно и объемно модифицированных хитозановых пленок. Можно предположить, что поверхностно модифицированные пленки характеризуются послойной макро-неоднородностью структуры, а объемно модифицированные - объемной микронеднородностью. Это объясняет более высокие прочностные показатели объемно модифицированных хитозановых пленок и их более высокие сорбционные свойства.

ПЛЕНКИ ИЗ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА

Полиэлектролитные комплексы (ПЭК) - продукты интерполиэлектролитных реакций [33, 34]. Отличительной особенностью строения ПЭК (рис. 6) является чередование высокогидрофильных петлеобразных фрагментов макромолекул индивидуальных полиэлектролитов и более гидрофобных и жестких двутяжных фрагментов из соединенных солевыми связями противоположно заряженных полиэлектролитов. Такая модель наиболее правильно отражает строение частицы ПЭК и позволяет прогнозировать влияние различных факторов (рН, ионная сила, концентрация, соотношение и стерическая комплементарность компонентов, дополнительная стабилизация комплексных частиц водородными и иными связями) на свойства и поведение ПЭК.

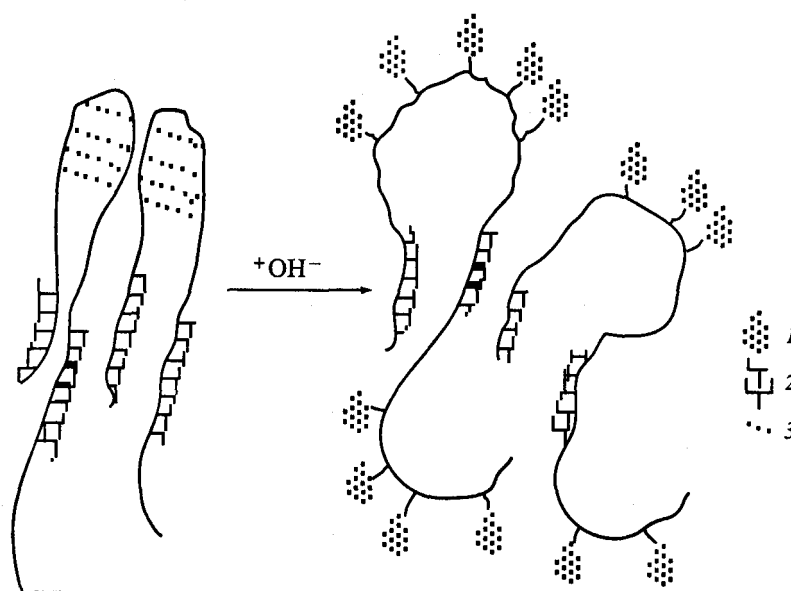
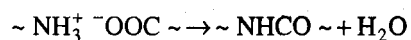


Рис. 6. Модель структуры ПЭК

/ - ионизованные карбоксильные группы; 2 - солевые связи с аминогруппами;
3 - водородные связи

ПЭК в виде пленок обычно получают высушиванием смесей растворов противоположно заряженных полиэлектролитов в летучих кислотах или основаниях с последующим проведением термо- и гидрообработок. Сухие пленки ПЭК прозрачны, по данным рентгеноструктурных исследований аморфны. Их поведение при набухании в водных средах, в том числе, при разных температурных режимах [34] обнаруживает криптогетерогенность структуры. Наряду с потерей криптогетерогенности причиной снижения набухания пленок ПЭК после термо- и гидротермических обработок является частичная сшивка макроцепей полиэлектролитов ковалентными амидными связями, образующимися по схеме:



Частичная сшивка пленок ПЭК приводит к повышению устойчивости в щелочных и кислых средах и принципиально расширяет возможности их практического использования. Высокая гидрофильность частично сшитых пленок ПЭК (см. рис. 3, кривая 4) и высокое содержание (~50%) так называемой свободной воды обуславливают их очень высокую проницаемость в условиях первапорации, диализа, ультрафильтрации, обратного осмоса, ионного обмена и др. разделительных процессов. Другой отличительной особенностью пленок ПЭК, представляющей большой практический интерес, является их высокая тромборезистентность и гемосовместимость, что обуславливает эффективность использования их в виде активного слоя мембран для процессов гемодиализа и гемофильтрации и специальных покрытий эндопротезов, контактирующих с кровью.

Авторами [35-40] описано получение и свойства пленок ПЭК хитозана с полиакриловой кислотой, карбоксиметилцеллюлозой и другими поликислотами. Особый интерес представляют пленки ПЭК на основе двух производных хитина - полиоснования хитозана и поликислоты карбоксиметилхитина (КМХТ), содержащих примерно равные количества различных по заряду ионогенных групп с фиксированным положением в элементарных звеньях макромолекул, что обеспечивает их высокую стерическую комплементарность [37]. Пленки ПЭК хитозана с ПАК и КМХТ получали высушиванием смесей их 1 %-ных растворов в водном 3%-ном растворе легколетучей муравьиной кислоты. Процесс удаления растворителя (вода + муравьиная кислота) и отверждение пленки сопровождается протеканием реакции образования солевых связей между макромолекулами ПЭ, т.е. образованием ПЭК, которое завершается на последующих стадиях вакуумирования сухих пленок и промывок их водой.

Соотношение хитозана и КМХТ в пленках ПЭК-1 эквимольного состава (число в обозначении ПЭК соответствует его составу Z) по данным элементного анализа совпадает с их соотношением в исходной формовочной смеси. Пленки из ПЭК, обогащенных хитозаном ($Z > 1$), содержащие муравьиную кислоту, очень сильно набухают при промывке водой, однако отсутствие в промывных водах этих пленок исходных полимеров свидетельствует о тождестве составов полученных пленок и формовочных смесей.

По внешнему виду сухие пленки из ПЭК не отличаются от хитозановой в О-форме. Они характеризуются прозрачностью и гладкостью поверхности, хотя в ходе высушивания смесей растворов хитозана с ПАК и КМХТ наблюдалось их временное помутнение, наиболее сильно выраженное у смесей стехиометрического состава, что подтверждает факт фазового разделения в этих системах в ходе их отверждения. Отличительной особенностью пленок ПЭК является то, что они менее эластичны, чем хитозановые (см. рис. 4, кривые 1 и 4), поскольку наличие системы ионных и водородных связей в пленках ПЭК обеспечивает формирование более жесткой, напряженной и хрупкой структуры. Набухшие в воде пленки характеризуются высокой пластичностью и значительно более низкими величинами разрывного напряжения, которые, тем не менее, обеспечивают возможность их практического применения.

Поведение в водных средах пленок ПЭК зависит от полноты включения ионогенных групп хитозана и КМХТ в солевые связи и степени релаксации внутренних напряжений, поэтому набухание пленок и растворимость определяются величинами Z и проведением дополнительных температурно-водных обработок. Стабилизирующие ПЭК солевые связи разрушаются в кислых и щелочных средах, а также в средах с высокой ионной силой, поэтому свежеполученные пленки из ПЭК растворяются в сильно кислых водных средах и очень сильно набухают, а пленки из ПЭК-4 даже растворяются в воде.

В литературе имеются сведения о том, что степень набухания пленок ПЭК на основе хитозана существенно зависит от их состава, pH формовочного раствора, pH и ионной силы жидкой среды [38-40]. Установлено также, что степень набухания пленок ПЭК существенно зависит от условий их сушки и кратности температурно-водных обработок. У пленок ПЭК, промытых водой до нейтральной реакции промывных вод, величины набухания в воде составляют сотни процентов, и они резко увеличиваются с повышением Z , т.е. содержания хитозана в ПЭК (рис. 7). У пленок, подвергнутых повторным обработкам водой с промежуточным высушиванием, степень набухания несколько снижается (кривые 2,3 и 5). По данным элементного анализа в ходе указанных обработок

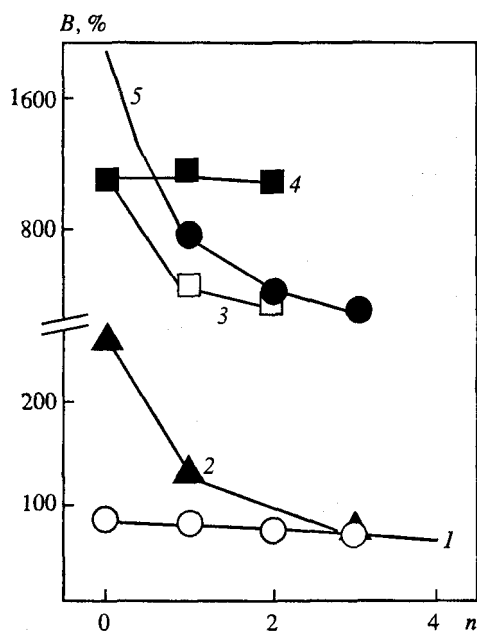


Рис. 7. Зависимость равновесной степени набухания в воде пленок хитозана (1), ПЭК-1 (2), ПЭК-2 (3, 4) и ПЭК-4 (5) от числа циклических водных обработок n при 20 (4) и 90 °C (1 – 3, 5). Продолжительность одной обработки 1 ч

Пленок ПЭК и нерастворимость последних в кислых водных средах подтверждают справедливость сделанного вывода. В связи с этим в будущем представляет интерес исследование возможности регулирования набухания и растворимости хитозановых пленок (капсул, порошков и др.) в солевой форме их термообработкой, в ходе которой, согласно вышеизложенному, часть звеньев уксуснокислой формы полимера по реакции амидирования должна превращаться в Хитиновые звенья с неионогенными N-ацетильными группами.

В результате термообработок и частичной сшивки меняется растворимость пленок ПЭК в различных средах (табл. 3). Нетермообработанные Пленки ПЭК всех составов растворяются в кислых средах. Закономерно, что наименьшим набуханием в воде, растворах NaCl и ИПС характеризуются Пленки из ПЭК эквимольного состава. Разрушение ПЭК на основе хитозана в щелочных средах не приводит к полному растворению пленок, так как хитозан не растворяется в этих условиях, однако при уменьшении доли хитозана в ПЭК их набухание закономерно увеличивается в щелочной среде. Пленки из частично сшитых ковалентными связями ПЭК во всех средах имеют более низкую степень набухания. Изменение механических свойств пленок коррелирует с их сорбционной способностью. Так, по мере приближения состава Пленок ПЭК к стехиометричному и понижения их сорбционной способности Происходит повышение прочности пленок. Сорбционная способность частично сшитой пленки ПЭК-1 ниже, чем у исходной, но выше хитозановой в О-форме (см. рис. 3, кривые 1, 4).

состав пленок ПЭК практически не изменяется. Важно отметить также, что сильное набухание в воде пленок ПЭК, не подвергнутых термообработке, сопровождается их помутнением, а термообработанные и менее набухающие в воде пленки остаются почти прозрачными. Все это говорит о том, что свежесформованные пленки ПЭК являются криптогетерогенными материалами.

Понижение набухания пленок ПЭК в результате температурно-водных обработок наряду с релаксационными процессами, обусловлено протеканием химических превращений, приводящих к уменьшению содержания заряженных групп, в частности, реакций образования в частицах ПЭК сшивок ковалентными амидными связями и формамидных групп. Возможность протекания подобных реакций показала на примере ЛЖ, образованных полиакриловой кислотой и полиэтиленмином [34]. Увеличение интенсивности поглощения в области 1700–1500 см^{-1} и появление плеча при 1730 см^{-1} в ИК-спектрах прогретых

Таблица 3. Влияние состава и температурно-водных обработок на набухание и прочность пленок из хитозана и ПЭК хитозана с КМХТ

Пленка	Степень набухания, %**						Механические свойства***		
	пары воды	вода	NaCl 0,5М	NaOH 0,1М	HCl 0,1М	ИПС	σ_p , МПа	ϵ_p , %	E, ГПа
О-Хитозан	74	82	80	88	Растворяется	13	139/29	42/224	2/0,02
О-Хитозан (Т)	70	76	68	52	То же	10	–	–	–
С-Хитозан*	140	Растворяется	118	102	"–"	25	136	29	2
С-Хитозан (Т)*	120	То же	–	98	"–"	23	–	–	–
ПЭК-4	170	1700	344	357	"–"	100	–	–	–
ПЭК-4 (Т)	94	780	–	–	–	90	140	11	2,0
ПЭК-4 (ЗТ)	–	324	278	331	453	34	–	–	–
ПЭК-2	128	1000	247	490	Растворяется	36	150	11	1,8
ПЭК-2 (Т)	82	500	217	311	438	24	–	–	–
ПЭК-1	110	250	207	556	Растворяется	10	–	–	–
ПЭК-1 (Т)	80	100	96	–	То же	5	157/7	10/30	3,4/0,01
ПЭК-1 (ЗТ)	66	72	80	374	301	–	–	–	–
ПЭК-0,5	–	220	–	Диспергируется	Растворяется	18	–	–	–

* Степень протонирования аминогрупп 0,5 и 0,2 у непрогретой и прогретой (Т), соответственно. ЗТ - трехкратный прогрев.

Время выдерживания пленок при $p/p_0 = 1$ в парах воды 24 ч, в других средах 1 ч.

Воздушно-сухих пленок - в числителе, набухших в воде - в знаменателе.

ХАРАКТЕРИСТИКА ХИТОЗАНОВЫХ ПЛЕНОК КАК РАЗДЕЛИТЕЛЬНЫХ МЕМБРАН

В первых же работах по получению и изучению пленок на основе хитозана, проведенных в 1950-1970-х гг., были определены наиболее важные их свойства и перспективные области применения в качестве ионообменных, газоразделительных, гемосовместимых, обратноосмотических и комплексообразующих мембран. Не обладающие согласно электронномикроскопическим исследованиям пористостью пленки характеризовались очень высокой проницаемостью по воде, в два раза превышающей таковую гидратцеллюлозных мембран, были проницаемы для мочевины и других метаболитов и обладали селективной проницаемостью по отношению к различным ионам [41]. В работах последних лет [31, 36-47] просматривается тенденция более детального изучения свойств хитозановых и модифицированных хитозановых пленок как селективных мембран, предназначенных для различных сорбционных и разделительных процессов.

Сравнительное исследование хитозановых мембран, сформированных из образцов полимера, различающихся величинами ММ и степени дезацетилирования (СД), с варьированием содержания в формовочном растворе хитозана и ук-

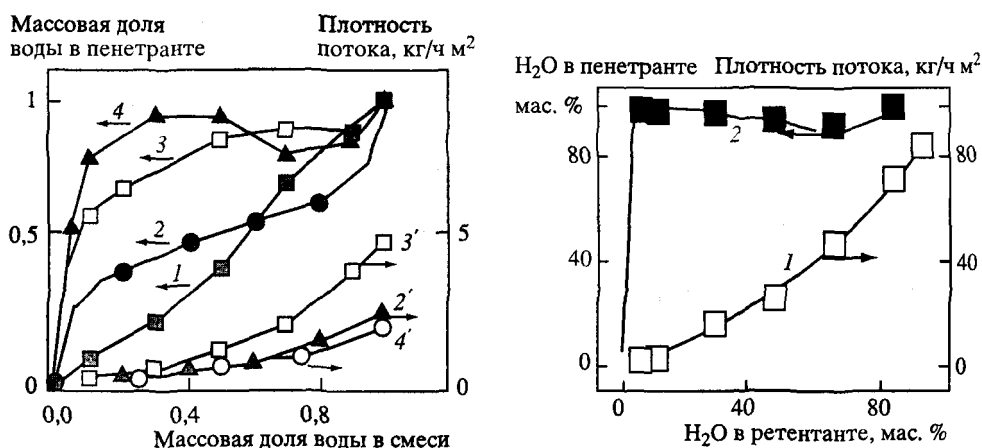


Рис. 8. Диаграммы разделения (1-4) и плотности потоков (2'-4') в условиях первапорации смесей вода-ИПС через пленки хитозана со СД-0,7 (1); 0,8 (2, 2'); 0,87(3, 3') и 0,99 (4, 4') [19, 30]

Рис. 9. Плотность потока (1) и диаграмма разделения (2) в условиях первапорации смесей вода-ИПС при 30 °C [31]

сусной кислоты и температуры сушки показало [14, 19], что хитозановые пленки при первапорации преимущественно пропускают воду, при этом их селективность существенно зависит от СД хитозана, т.е. от его химической однородности. Изменение СД хитозана от 0,70 до 0,99 (рис. 8) приводит к заметному повышению селективности хитозановых пленок в процессе первапорационного разделения водноизопропанольных смесей практически всех составов и особенно смесей, обогащенных спиртом. Такая зависимость должна быть связана с повышением степени кристалличности пленок, что для хитозановых пленок было экспериментально подтверждено. Следует, однако, отметить, что достижение значения СД хитозана, равного 0,99, связано с экспериментальными трудностями и приводит к резкому снижению ММ полимера и прочности изделий из него. Поэтому такой путь повышения селективности хитозановых мембран представляется технологически мало приемлемым. Возможность использования полимерных мембран в качестве ионообменных, работающих в средах с градиентом pH, предопределяется их устойчивостью в кислых и щелочных средах. Поэтому многими авторами исследована модификация хитозановых пленок обработкой сшивающими реагентами, в частности, серной кислотой, глутаровым альдегидом (ГА), гексаметилендиизоцианатом, рассмотренным выше олигомерным диэпоксидом, а также введением других полимеров [30, 31, 47-49].

При сравнении количественных данных о проницаемости и селективности хитозановых пленок при разделении водно-спиртовых смесей необходимо учитывать некоторую неопределенность, связанную с тем, что разные авторы используют образцы полимера из разных источников, с различными ММ, СД, которые не всегда приводятся в публикациях. Кроме того, варьируются условия приготовления пленок, их последующих обработок, условия проведения испытаний и определяемые характеристики. Тем не менее, приведенные в работах [14, 18, 30, 31] величины проницаемости немодифицированных хитозановых пленок находятся на уровне 2-4 кг/м² ч по воде и 0,01-0,02 кг/м² ч по изопропанолу (рис. 9, кривая 1), в то время как у моди-

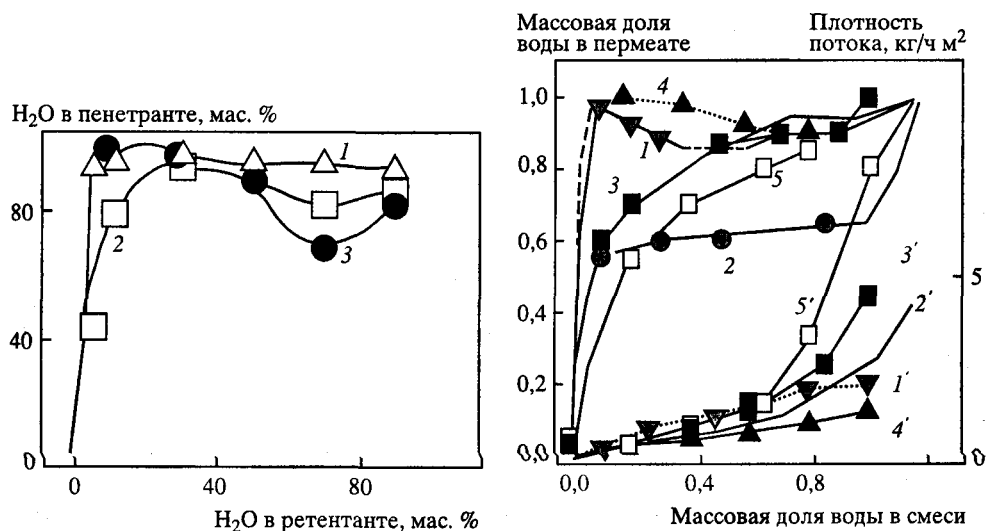


Рис. 10. Диаграммы разделения смесей вода-этанол (1, 2) и вода-пропанол (5) через хитозановую (2, 3) и шпигую ГА (7) хитозановую пленки при 40 °С [30]_г

Рис. 11. Диаграммы разделения (1-5) и плотности потоков (1'-5') в условиях первапорации смесей вода-ИПС через хитозановые пленки поверхностью (1, 1') и объемномодифицированные ДЭО (2, 2'); ПЭК-0,5 (3, 3') ПЭК-1 (4, 4') и ПЭК-2 (5, 5')

фицированных сшивающими реагентами она почти на порядок ниже [31]. Селективность хитозановых пленок в условиях первапорационной осушки водных пропилового и изопропилового спиртов достаточно высокая, выраженная в виде коэффициента разделения она достигает значений тысяч единиц при разделении смесей, содержащих менее 20% воды, что соответствует содержанию воды в пермеате более 98 мас.% (см. рис. 9, кривые 2 и 10, а также 1 и 3). Селективность понижается при разделении смесей воды с низшими представителями гомологического ряда спиртов, например, с этанолом (рис. 10, кривая 2). Шитая глутаровым альдегидом пленка характеризуется большей селективностью (см. рис. 9, кривая 1), особенно при разделении смесей с небольшим содержанием воды, при этом коэффициент разделения достигает 2000, что находится на уровне мировых стандартов. По проницаемости даже при комнатной температуре эти хитозановые мембраны также не уступают лучшим из известных. Из температурной зависимости проницаемости немодифицированной хитозановой мембраны по воде и изопропанолу рассчитаны величины энергии активации переноса, равные 20,6 и 35,5 кДж/моль соответственно [3], что еще раз подтверждает, что вода легче проникает через хитозановую пленку.

Среди немногочисленных, но впечатляющих данных о разделительных свойствах мембран на основе ПЭК в условиях первапорации следует отметить положительные результаты, полученные при использовании пленок ПЭК хитозана с относительно гибкоцепным синтетическим полиэлектролитом - полиакриловой кислотой. При разделении смесей органических растворителей (диоксана и изопропанола) с водой показано [35, 36, 45, 50, 51], что проницаемость пленок ПЭК. из ПАК. и хитозана по отношению к воде на 1-2 порядка

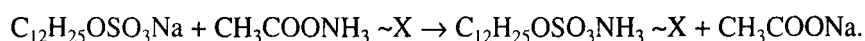
превышает их проницаемость по отношению к указанным органическим жидкостям, что обеспечивает практически полное отделение воды от органического компонента. Из рис. 11 видно, что наибольшей селективностью при разделении водно-изопропанольных смесей обладают термообработанные пленки из ПЭК-1 (кривая 4), что вполне коррелирует с их большей жесткостью и меньшим набуханием в разделяемых жидких компонентах. При разделении смесей ИПС-вода содержащих до 15 мас.% воды, коэффициент разделения изменяется в пределах 4000-2000, что находится на уровне лучших из выпускаемых асимметричных мембран с активным слоем из сшитого ПВС. Пленки ПЭК-0,5 и ПЭК-2, содержащие, по сравнению с пленками ПЭК-1, избыток одного из полиэлектролитов и меньшее количество солевых связей и ковалентных сшивок, обладают меньшей селективностью (кривые 3 и 5). При этом обогащенный поликислотой с неионизованными карбоксильными группами и менее набухающий ПЭК-0,5 проявляет большую селективность, чем содержащие избыточное количество муравьинокислых аминокислот и более набухающие пленки из ПЭК-2.

Наряду с хорошей селективностью пленки ПЭК-1 обладают достаточно высокой проницаемостью. При разделении смесей, содержащих 10-20% воды, они не уступают по этому показателю пленкам из хитозана, пленкам из ПЭК хитозана с полиакриловой кислотой [35, 36] и другим первапорационным мембранам [52]. Практически линейная зависимость суммарного потока от содержания воды (см. рис. 11, кривая 4') в разделяемой смеси косвенно подтверждает относительную стабильность транспортных каналов и независимость их размеров от степени набухания мембраны. В то же время проницаемость пленок из ПЭК-0,5 и ПЭК-2 (кривые 3' и 5', соответственно) нелинейно увеличивается по мере перехода к смесям, обогащенным водой, повышения степени набухания пленок и, согласно [36], резкого увеличения доли свободной воды.

Приведенные данные о транспортных свойствах пленок ПЭК на основе хитозана позволяют рассматривать их как представляющие интерес для практического использования в качестве разделительных мембран при первапорационной осушке спиртов (эквивалентные термообработанные ПЭК) и в аппаратах для гемодиализа.

ПОВЕРХНОСТНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ХИТОЗАНОВЫХ ПЛЕНОК ПАВ

Модификация хитозана анионными ПАВ с длинными алкильными радикалами и образование ПАВ-полиэлектролитных комплексов (ПАВ-ПЭК) приводит к гидрофобизации и повышению адсорбионной активности на границе вода-воздух, вода-масло. Присоединение к хитозану, например додецилсульфата (ДСН), происходит, главным образом, за счет ионных связей по схеме



Модификация хитозановых пленок и образование ПАВ-ПЭК в поверхностных слоях может привести к инверсии сродства хитозановых мембран к растворителям. В работах [44, 53] описано такое модифицирование хитозановых пленок ундециловой кислотой и ДСН обработкой пленок в С-форме раствором ПАВ. Согласно данным табл. 4 содержание введенного модификатора практически не изменяется при дополнительных промывках пленок водой и изопропанолом (пленки 7, 8, см. табл. 4), тогда как промывка раствором NaOH приводит к полному удалению додецилсульфатных анионов, и показатели регенерированной пленки 9 (состав и свойства) соответствуют показателям хитозановой пленки в О-форме. Многократные промывки водой пленки 5 при-

Таблица 4. Характеристика хитозановых пленок, модифицированных* ДСН

Пленка	Условия модифицирования		Состав		Механические свойства			Степень набухания в воде, %
	ДСН/хитозан, г/г	Время, ч	S/N, г/г	ДС, %	σ_p , МПа	ϵ_p , %	E, ГПа	
1	Исходная С-форма		0	0	136	29	2,0	Растворяется
2	0,4	1	при обработке пленка потеряла целостность					
3	0,4	2	0,67	30	—	—	—	~4000
4	0,5	2	0,74	32	—	—	—	3000
5	0,5	1	0,52	25	—	—	—	2500
6	0,5	2	0,84	35	163	21	3,5	1200
7	Промывка водой пленки 5		0,85	35	—	—	—	1200
8	Обработка ИПС пленки 3		0,76	33	—	—	—	—
9	Обработка NaOH пленки 5		0	0	145	20	2,8	100

* В опытах 2-6 исходная пленка в С-форме, в том числе в опытах 5 и 6, прогретая при 70 °С в течение 1 ч. Температура обработки 20-22 °С, концентрация раствора ДСН 0,5%.

водят к постепенному удалению связанной уксусной кислоты, и после 6 промывок пленка, сохраняя 90% додецилсульфатных заместителей, не содержит остатков уксусной кислоты и мало набухает в воде. Неожиданно высокая прочность ($\sigma = 163$ МПа) модифицированных ДСН пленок (пленка 6, см. табл. 4), возможно, объясняется "залечиванием" дефектов структуры пленки поверхностно-активным веществом.

Пленки, модифицированные ДСН, характеризуются тем, что их поверхностный слой, гидрофобизированный додецилсульфатными радикалами, не растворяется в воде, а внутренний слой представляет собой растворимую солевую форму хитозана. Поэтому они обладают высоким (1000-4000%) водопоглощением, при этом набухание пленок в воде приводит к существенному (в ~2-4 раза) увеличению их толщины при неизменных длине и ширине. Нерастворимый поверхностный слой, толщина которого составляет 5-10 мкм (в зависимости от времени обработки ПАВ), обеспечивает целостность и прочность пленки, достаточную для ее практического использования. Регулирование степени набухания и толщины внутреннего слоя может быть осуществлено также увеличением толщины исходной пленки.

Описанное свойство модифицированных ДС-анионами хитозановых пленок представляет интерес для соз-

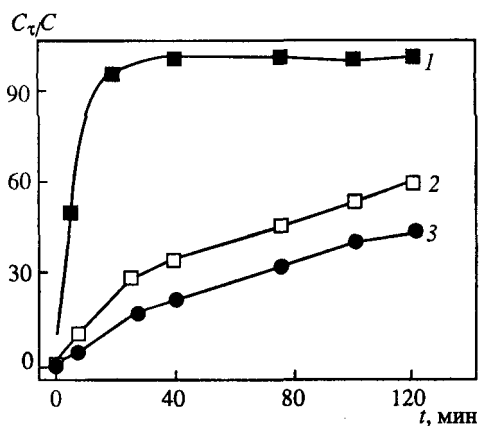


Рис. 12. Кинетика выделения белка из хитозановых пленок, содержащих 3% трипсина

1 – необработанная пленка;
2 – пленка, обработанная 0,7%-ным раствором ДСН в течение 15 мин;
3 – пленка, обработанная 0,7%-ным раствором ДСН в течение 90 мин

дания на их основе высококапитализирующих и дренирующих медицинских материалов или лечебных повязок, содержащих, например, ферментный препарат. Данные о кинетике выделения белка из модифицированных таким способом хитозановых пленок [53] свидетельствуют о существенном замедлении диффузии фермента во внешний раствор (рис. 12). При этом разрушение относительно непрочного поверхностного слоя набухшей пленки, образовавшегося при кратковременной (15 мин) обработке ПАВ, происходящее после контакта пленки с модельной жидкой средой в течение 70-80 мин, приводит к заметному увеличению скорости выделения белка. Образование более прочного слоя модифицированного хитозана при обработке пленки раствором ДСН в течение 90 мин позволяет получить материал с пролонгированным выделением трипсина: в течение 2 ч выделяется лишь 40% белка, включенного в пленку, а дальнейшее выделение белка происходит в течение нескольких суток. Таким образом, поверхностный водонерастворимый слой выполняет роль мембраны, затрудняющей диффузию ферментов из внутреннего слоя пленки во внешнюю среду.

ПОЛУЧЕНИЕ ПЛЕНОК ИЗ КАРБОКСИМЕТИЛИРОВАННЫХ И ДРУГИХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИТИНА И ХИТОЗАНА

Растворимость карбоксиметилированных производных хитина и хитозана в воде предопределяет выбор ее в качестве растворителя при приготовлении формовочных растворов. Вместе с тем, учитывая возможность существования полиамфолита карбоксиметилхитозана в формах поликислоты (КМХ-Н), полиоснования (КМХ-На) и внутренней соли (ВС), возможно получение его пленки в виде указанных форм путем высушивания растворов полимера в кислых, щелочных или нейтральных средах. Внутрисолевая форма может быть получена также обработкой буферным раствором с pH 3,5-4,5 двух первых форм, а также формованием по мокрому способу с использованием в качестве осадительной ванны буферного раствора с pH 3,5-4,5. Полученные указанными способами пленки из КМХ существенно различались по внешнему виду, растворимости и механическим свойствам [19, 54]. Так, пленки из КМХ-Н (табл. 5, образцы 1, 2), сформованные по сухому способу из растворов в низколетучей дихлоруксусной кислоте (ДХУК), сохраняли до 30% растворителя и оставались пластичными даже после длительного высушивания при нагревании или обработки буферным раствором. Из растворов в сильной минеральной (соляной) кислоте (образцы 4, 5) были получены мутные гетерогенные и очень хрупкие пленки, отделение которых от подложки без разрушения не представлялось возможным. Наиболее подходящим растворителем для получения пленок в форме КМХ-Н является менее летучая и сильная, по сравнению с соляной, муравьиная кислота (образец 3). Полученные из этого растворителя пленки по прочностным показателям не уступают пленкам из КМХ-На (образцы 6, 7). Как и следовало ожидать, прогрев пленок из КМХ-ВС приводит к упрочнению и потере ими растворимости в водных средах при любых значениях pH, что является следствием образования межмолекулярных амидных сшивок.

Пленки, сформованные по сухому способу высушиванием нейтральных или слабо основных водных растворов карбоксиметилированных производных хитина и хитозана, в виде Na соли характеризуются прозрачностью, по данным рентгеноструктурного анализа эти пленки являются аморфными, относительно однородная структура которых сформирована в ходе отверждения системы без распада на фазы.

Таблица 5. Характеристики пленок из карбоксиметилированных производных хитозана

Плен-ка*	Форма КМХ	Растворитель	pH	Внешний вид пленки	σ_p , МПа**	E, ГПа	ϵ_p , %
1	КМХ-Н	0,22 М ДХУК	1,7	Прозрачная Эластичная	27	0,5	47
2	То же	0,67М ДХУК	2,2	То же	10	0,04	78
3	–	0,67М НСООН	2,2	Прозрачная	48	2,0	13
4	–	0,1М НСІ	2,2	Мутная Хрупкая	–	–	–
5	–	0,1М НСІ	1,8	То же	–	–	–
6	КМХ-Na	H ₂ O	7	Прозрачная	49	1,0	14
7	То же	0,01М NaOH	8,3	То же	50	0,9	10
8	КМХ-BC	То же	8,3	Прозрачная Хрупкая	54	1,4	13
9	То же	0,67М НСООН	2,2	Мутная Эластичная	30/35	0,5/0,9	40/20

* В знаменателе дана характеристика пленки, прогретой при 120 °С в течение 1 ч.

Пленки 1-8 получены по сухому способу, в том числе пленка 8- высушиванием в парах НСООН; пленка 9 - по мокрому способу.

Таблица 6. Характеристики строения и механические свойства пленок из КМХТ

СЗ КМХТ по группам		ММ 10 ⁻⁵ КМХТ	Концентрация в растворе, %	σ_p , МПа*	ϵ_p , %*
COONa	NHCOCH ₃				
1,17	0,76	0,65	10	23/20	8/13
1,08	0,85	1,4	5	–/40	–/14
1,22	0,80	3,0	4	50/–	10/–
1,15	0,85	2,1	6	42/–	11/–
1,33	0,85	4,0	4	65/60	13/30
0,7	0,70	3,0	4	54/43	8/26
0,65	0,40	3,2	4	46/–	9/–

* В числителе приведены показатели непластифицированных пленок, в знаменателе - содержащих 10% глицерина. Влажность пленок 17-20%.

При исследовании влияния СЗ и ММ КМХТ на свойства получаемых пленок было показано (табл. 6), что снижение СЗ полимера по карбоксиметильным группам и увеличение ММ КМХТ приводят к небольшому, но закономерному упрочнению получаемых пленок [19, 55]. Значительно более низкие деформационно-прочностные характеристики пленок из карбоксиметилированных производных по сравнению с таковыми хитозановых пленок (табл. 2, 5 и 6) обусловлены особенностями их химического строения и надмолекулярной структуры. Так, наличие в элементарных звеньях макромолекул КМХ и КМХТ объемных карбоксиметильных и ацетильных заместителей способствует формированию пленок с более рыхлой аморфной и потому менее прочной, а у пленок из КМХ-BC и очень напряженной структурой.

Прочностные показатели неориентированных пленок из КМХ и КМХТ тем не менее достаточны для получения на их основе пленочных и губчатых материалов, содержащих иммобилизованные лекарственные вещества. Для меди-

цинского применения представляют также интерес пленки из сульфэтилхитозана, обладающие тромборезистентными свойствами и предотвращающие свертывание крови [56].

ПЛЕНКИ ИЗ СМЕСЕЙ ХИТОЗАНА С ДРУГИМИ ПОЛИМЕРАМИ

Смеси на основе природных полисахаридов хитина, хитозана и целлюлозы представляют большой интерес, поскольку сочетают в себе доступность целлюлозы с уникальными свойствами азотсодержащих полисахаридов. Обнаруженная авторами [57] термодинамическая совместимость хитина и целлюлозы в некотором интервале их соотношений является основой для формирования пленок из этих полисахаридов. Смешанные целлюлозно-хитиновые пленки были получены по мокрому способу из 3%-ных растворов полисахаридов в ДМАА, содержащем 9% LiCl, с использованием бутанола в качестве осадителя. Исследование структурных особенностей полученных пленок сорбционным методом и методом малоуглового нейтронного рассеяния показало, что наименьшей структурной неоднородностью обладают пленки, содержащие небольшое количество (до 0,5-2,5%) второго компонента. К сожалению, авторы не привели данные об уровне и зависимости прочностных характеристик пленок от их состава.

Поскольку растворение целлюлозы связано с рядом технологических трудностей, а хитозан легко растворяется в доступных и дешевых растворителях, авторами [58] исследованы пленкообразующие свойства суспензий порошковой целлюлозы в воднокислотных растворах хитозана. Было показано, что суспензии всех составов по сравнению с раствором хитозана являются более структурированными системами, вязкость и энергия активации вязкого течения которых возрастает при увеличении объемной доли целлюлозы (1), и для формирования пленок пригодны суспензии с/до 0,05. Целлюлозно-хитозановые пленки, сформованные по сухому способу из суспензий разного состава имеют визуально наблюдаемую неоднородность структуры, более выраженную у пленок, полученных из более концентрированных суспензий. Как и следовало ожидать, пленки в солевой форме, обладая высокой (> 2000%) сорбционной емкостью по отношению к воде и физиологическому раствору, не растворяются в них, в отличие от пленок из чистого хитозана. Сорбционная способность пленок существенно зависит от соотношения целлюлозы и хитозана, кроме того ее можно регулировать путем прогрева пленок и введения сшивающих реагентов. Хотя физико-механические характеристики полученных пленок ниже, чем у пленок из индивидуальных полисахаридов, их прочность (разрывное напряжение 15-20 МПа) вполне достаточна для изготовления из них одноразовых изделий медицинского назначения. Прочность, в том числе в набухшем состоянии может быть повышена введением в формовочную суспензию и, соответственно в пленку, сшивающего агента. Несмотря на структурную неоднородность пленок, величина предельного удлинения их также достаточно высока ($\sigma_p = 15-30\%$) и может быть повышена введением пластификатора.

Смешанные пленки из хитозана и других природных (пектин, крахмал) и синтетических водорастворимых полимеров (поливиниловый спирт, полиэтиленгликоль и др.) описаны в работах [59-62]. Добавки синтетических полимеров приводят к повышению стабильности в водно-кислотных средах изделий, полученных на основе хитозана, и кроме того, учитывая высокую стоимость хитозана, позволяют удешевить их. В свою очередь, добавки хитозана к синтети-

ческим полимерам повышают их биосовместимость и биodeградируемость, придают им ионообменные и комплексообразующие свойства, а в ряде случаев повышают гидрофильность, окрашиваемость и снижают электризуемость.

ВОЛОКНА НА ОСНОВЕ ХИТИНА И ХИТОЗАНА

Хитиновые волокна и нити, как и пленки, могут быть получены по мокрому (коагуляционному) способу из растворов полимера в ряде органических амидных растворителей, содержащих добавки солей, в частности, хлорида лития. В патентах [63, 64] в качестве растворителя предлагается использовать смесь LiCl и N-метилпирролидона. Сформованное со скоростью 10 м/мин в осадительную ванну из ацетона или спиртов волокно имеет низкую прочность ($\sigma_p = 36$ МПа), что, возможно, обусловлено низкой концентрацией полимера в растворе ($< 2\%$) и низкой ММ хитина. Хитиновое волокно, сформованное по вискозному способу также обладает низкой прочностью (разрывное напряжение 38 МПа) [65]. В цитируемой работе не приводятся данные о ММ исходного хитина и в готовом волокне, что важно, так как данный способ переработки в волокно полисахарида целлюлозы предполагает существенную деструкцию в ходе всего технологического процесса.

Значительно более прочное хитиновое волокно получено из 3-3,5%-ных растворов хитина с ММ 500 кД в тернарном растворителе: N-метил-пирролидон-диметилацетамид + LiCl [66, 67] с использованием в качестве осадительной ванны смеси ДМАА + этиленгликоль + этанол в объемном соотношении, равном 40:20:20. В [67] установлен оптимальный состав растворителя - 5%-ный раствор LiCl в смеси равных объемов N-метилпирролидона и ДМАА, обеспечивающий минимальную вязкость формовочного раствора и получение наиболее прочного волокна. Интересно отметить, что в данном растворителе хорошо растворяется лишь хитин с СД менее 30%, содержащий достаточное количество сольватируемых растворителем ацетильных групп. Из данных табл. 7 видно, что снижение СД исходного хитина с 38 до 13% и, соответственно, повышение регулярности химического полимера, приводит к увеличению прочности получаемого волокна. Дополнительная пластификационная вытяжка в спиртогликолевой ванне позволяет получить волокно с разрывным напряжением 390 МПа при удлинении 3%. По мнению авторов, такие высокие физико-механические показатели обусловлены характерной для жесткоцепных полимеров хорошо организованной ленточно фибриллярной надмолекулярной структурой волокна. На основании данных электронномикроскопического и рентгеноструктурного исследования [66] сделано предположение о жидкокристаллическом состоянии формовочных растворов. В то же время волокно характеризуется значительной (около 80%) потерей прочности в мокром состоянии при одновременном увеличении удлинения более, чем в пять раз.

Таблица 7. Физико-механические показатели хитинового волокна [67]

Пленка	СД хитина, %	σ_p , МПа	E , ГПа	ϵ_p , %	Пленка	СД хитина, %	σ_p , МПа	E , ГПа	ϵ_p , %
1	38	172	5,7	9,9	4	18	205	9,8	5,2
2	29	252	7,8	8,7	5	16	218	9,6	5,1
3	22	232	9,4	6,4	6	13	241	13,2	5,7

Таблица 8. Основные параметры процесса формования и свойства волокна из бутирилхитина

Параметр	Способ	
	мокрый	сухой
Растворитель	ДМФ	Ацетон
Концентрация формовочного раствора, %	16–20	20–22
Осадитель	Вода (10–30 °С)	Обдув воздухом (80–45 °С)
Скорость формования, м/мин	40	70
Длина пути нити, м	0,8	6,0
Линейная плотность, текс	0,2	1,5
Плотность, г/см ³	1,24	1,21
Относительная разрывная нагрузка P_0 , сН/текс	14,8–16,5	8,3–7,4
Разрывное удлинение ε_r , %	7,4–5,9	36,9

Аналогичным способом авторами [68] было сформовано хитиновое волокно, модифицированное добавками эфиров целлюлозы. Методами рентгеноструктурного анализа и электронной микроскопии установлено, что при модификации сохраняется первоначальная кристаллическая структура хитина, а наблюдаемый эффект улучшения прочностных свойств (повышение в 1,5–2,5 раза) обусловлен межфибриллярной пластификацией полимера.

Ограниченный круг растворителей хитина стимулировал синтез его производных, растворимых не только в водной среде (хитозан, карбоксиметилхитин), но в доступных органических растворителях. Одним из таких производных является эфир хитина и масляной кислоты, в частности, дибутирилхитин, хорошо растворимый в ацетоне, ДМФ, спиртах и других органических растворителях [69, 70]. Польскими учеными предложены и реализованы в лабораторных и опытно-промышленных условиях мокрый и сухой способы формования волокна из бутирилхитина, основные параметры процесса формования которого приведены в табл. 8. Полученные волокна характеризуются прочностными характеристиками, находящимися на уровне таковых ацетатных волокон. Важно отметить, что при обработке такого волокна раствором щелочи происходит омыление бутирильных групп и регенерация хитина без нарушения его волокнистой формы. Этот процесс имеет прямую аналогию с омылением тиокарбоновых групп при производстве гидратцеллюлозного волокна по вискозному способу. Прочность хитинового волокна, полученного омылением бутирилхитинового, существенно выше (P_0 - 25,1–26,6 сН/текс), чем у исходного бутирилхитинового и у хитинового, сформованного из растворов хитина в ДМАА (P_0 = 11,3–12,2 сН/текс) [70], находясь на уровне и даже немного превышая прочность обычных вискозных волокон. Водно- и щелочерастворимые производные хитина (метил-, этил-, бутил-, изобутилхитин) могут быть переработаны в относительно прочные ($\sigma_r \sim 100$ МПа) волокна по мокрому способу в ваннах из этилацетата с последующим ориентационным вытягиванием [71].

К сожалению, в литературе очень мало данных о получении и свойствах хитозанового волокна, хотя его формование из уксуснокислотных растворов по мокрому или сухому способам принципиально является самым экономичным и экологически чистым способом. Характеристики хитозанового волокна, сфор-

Таблица 9. Условия формования и свойства хитозанового волокна [72]

СД хитозана, %	Формовочный раствор		Вытяжка, %		Свойства волокна		
	концентрация хитозана, %	вязкость, Па с	фильерная	пластификационная	линейная плотность, текс	P_p , сН/текс	ϵ_p , %
75,0	3	121	-45	40	0,72	11,5	10,4
85,0	3	38	6	70	0,98	7,2	15,8
99,5	3	10	0	20	1	9,8	10,4
99,5	4	28,4	90	40	0,61	18,7	16,2
99,5	4	28,4	90	60	0,52	14,2	18,5
99,5	4	28,4	90	80	0,53	14,7	16,8
99,5	4	28,4	90	110	0,65	8	14,6

мованного из 3-4%-ных растворов полимера в 2%-ной уксусной кислоте в осадительную ванну, содержащую 2% NaOH и 10% Na₂SO₄, с последующим пластификационным вытягиванием на воздухе, промывкой водой и сушкой при 100 °С, приведены в табл. 9 [72]. Авторами отмечено, что наиболее устойчиво процесс формования протекал из растворов высоко деацетилированного хитозана, образующего и наиболее прочное волокно. Приведенные в табл. 9 данные не позволяют дифференцированно оценить влияние различных параметров формования на свойства полученного волокна. Хитозановое волокно, сформованное из щелочных растворов ксантогената хитозана и, очевидно, частично сшитое в осадительной ванне серной кислотой, по данным [65] обладает прочностью на уровне 260 МПа, что превышает прочность хитинового волокна, полученного в аналогичных условиях, и соответствует уровню прочности лучшего из приведенных в табл. 9.

ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПЛЕНОК И ВОЛОКОН В МЕДИЦИНЕ

Как указано выше, хитозановые пленки в технике представляют интерес как разделительные, в том числе ионообменные мембраны. Многочисленные литературные данные [43, 44, 73-80] свидетельствуют о перспективности использования хитина и его производных в виде пленочных и волокнистых изделий, лечебных и защитных покрытий, а также в виде разделительных мембран и в медицине, биотехнологии, фармацевтике, пищевой промышленности. Наряду с низкой токсичностью, био- и гемосовместимостью, биоразрушаемостью, пористая структура этих изделий играет очень важную роль. Разработчиками капсулированных форм белковых препаратов и клеток показано, например, что повышение степени ацилирования хитозана, pH, ионной силы и концентрации полимера в формовочном растворе закономерно приводит к повышению пористости и проницаемости получаемых капсул, но, поскольку влияние этих же факторов на механические свойства носит антибатный характер [81-83], оптимальный вариант требует компромиссного решения. Использование для получения указанных изделий модифицированного сшивкой хитозана и смесей хитозана с другими полимерами, в том числе полиэлектролитных комплексов на основе хитозана [73-79], позволяет находить более рациональные решения при оптимизации их свойств. Получение и свойства волокнистых и губчатых изделий на основе хитозана описаны в [72]. Высокие сорбционные свойства таких изделий позволяют рекомендовать их для использования как гигиенические средства и в гинекологической практике. Эффективное использование в меди-

цине хитозановых нитей, точнее, композиционных псевдомонофиламентных хитозаново-капроновых нитей показано в работе [84]. Образование хитозанового покрытия на плетеных нитях из синтетических волокон приводит к монолитизации шовного материала, снижению его капиллярности, повышению его биосовместимости и ускорению нарастания новых тканей.

Как уже было сказано, хитин и его карбоксиметилированные производные представляют большой интерес как носители лекарственных препаратов, в том числе протеолитических ферментов. Отличительной особенностью этих производных хитина и хитозана как полимерных носителей лекарственных препаратов является наличие в их макромолекулах широкого набора функциональных групп (полярные высокогидрофильные гидроксильные, карбоксильные, аминоксильные и гидрофобные ацетильные), что принципиально позволяет осуществлять присоединение биологически активных веществ различными типами связей. Дополнительным преимуществом КМХТ является гидролизуемость его лизоцимом [85], обеспечивающая разрушение полимера в ходе метаболических процессов в организме.

Проведенное исследование [55] показало влияние СЗ и ММ полимера на некоторые закономерности иммобилизации протеолитического фермента и, в целом, возможность использования КМХТ в виде пленок и губок в качестве полимерного носителя ферментных лекарственных препаратов. При этом установлено, что КМХТ является "мягкой" полимерной матрицей, позволяющей существенно повысить стабильность и, следовательно, эффективность применения иммобилизованных ферментов. Учитывая безвредность КМХТ, хорошую растворимость в воде и водно-солевых средах, а также биоразрушаемость в организме под действием фермента лизоцима, использование этого производного хитина в качестве полимерного носителя лекарственных субстанций является вполне оправданным. В дальнейшем представляется целесообразным использовать КМХТ, в том числе в виде ПЭК с хитозаном и ПАВ-ПЭК, для создания капсулированных и липосомальных лекарственных и косметических форм.

Приведенные данные подтверждают хорошие пленко- и волокнообразующие свойства полисахарида хитина и его производных. Прочность (разрывное напряжение) и эластичность (разрывное удлинение) хитозановых пленок, сформированных по сухому способу без ориентационного вытягивания, в зависимости от ММ полимера составляют 100-160 МПа и 20-40%, соответственно, и, следовательно, по деформационно-прочностным показателям хитозановые мембраны сопоставимы с гидратцеллюлозными.

Растворимость в кислых водных средах является отличительной особенностью хитозановых пленок, ограничивающей возможность их практического применения. Для устранения этого недостатка предложены различные способы поверхностной гидрофобизации и объемной сшивки хитозановых пленок. Модифицированные хитозановые пленки, сохраняя все преимущества исходных пленок (нетоксичность, биосовместимость, высокая прочность, гидрофильность и проницаемость, ионообменные, комплексообразующие, сорбционные и другие свойства), не растворяются и пригодны для использования в широком интервале pH. Такие пленки могут быть использованы в качестве альтернативы гидратцеллюлозным в аппаратах для гемодиализа и гемофильтрации, в качестве ионообменных мембран для разделения электролитов, в том числе аминокислот и для улавливания и концентрирования редких элементов из растворов. Важно подчеркнуть, что поверхностная модификация приводит к формированию так называемых асимметричных мембран, в которых поверхностные

и внутренние слои существенно различаются строением, структурой и свойствами. Помимо очевидной целесообразности использования модифицированных таким способом хитозановых пленок в качестве дренирующих материалов, эти пленки, дополнительно модифицированные включением во внутренний слой лекарственных веществ, представляют интерес и как атравматические покрытия на ожоговые и иные раны. Хитозановые пленки, модифицированные сшивающими реагентами могут быть использованы как разделительные, в том числе ионообменные мембраны при разделении и концентрировании растворов аминокислот и других органических и неорганических электролитов.

Полиэлектrolитные комплексы на основе хитозана обладают гемосовместимостью, прочностью в сухом и набухшем состоянии, при этом частичная сшивка компонентов ПЭК ковалентными связями и повышение устойчивости пленок из ПЭК в солевых, кислых и щелочных средах может быть осуществлена простой термообработкой пленок без использования сшивающих реагентов. Наиболее рациональным является использование таких пленок в виде тромбознорезистентных покрытий на эндопротезы, другие имплантаты и гемосорбенты, в качестве селективных пермепорационных мембран для осушки органических растворителей и как депо лекарственных веществ. Приведенные результаты показывают, что для этих же целей эффективно могут быть использованы и пленки карбоксиметилированных производных хитина и хитозана, в том числе в виде ПЭК на их основе.

Обострение экологических проблем, и дефицит сырьевых ресурсов, с одной стороны, и совершенствование технологий и организация крупномасштабных производств хитина и его производных, в том числе в виде пленок и волокон - с другой, - несомненно приведут к существенному расширению масштабов и областей их применения, среди которых будут текстильная и пищевая промышленности, бумажное производство, строительство, сельское хозяйство и многие другие.

ЛИТЕРАТУРА

1. Muzzarelli R.A.A. Chitin. Oxford: Pergamon press. 1977. 309 p.
2. Laurance H.H.A., Mansur J.J., Nasser J. //Biopolymers 1981. V. 2. N 7. P. 1413-1419.
3. Горбачева И.Н., Овчинников Ю.К., Гальбрайт Л.С. и др. //Высокомол. соед. 1988. Т. А30. № 12. С. 2512-2515.
4. Марьин А.П., Феофилова Е.П. //Тез. докл. Первой Всесоюз. науч.-тех. конф. по пр-ву и использ. хитина и хитозана из панциря криля и других ракообразных. Владивосток. 1983. С. 75-80.
5. Samuels R.J. //J. Polym. Sci. Polym. Physics Ed. 1981. V. 19. N 7. P. 1081-1105.
6. Титова Е.Ф., Белацева Е.М., Гамзазаде А.И. и др. // Acta Polymerica. 1976. V. 37. N 2. P. 122-124.
7. Kubota N., Kikuchi Y., Mizuhara Y. и др. // J. Appl. Polym. Sci. 1993. V. 50. N 9. P. 1665-1670.
8. Ikeda H., Yamamura S., Takayama K., Nagai T. // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 1996. V. 44. N7. P. 1372-1375.
9. Ikeda H., Uchiyama K., Takayama K., Nagai T. // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 1995. V. 43. N 12. P. 2211-2214.
10. Ikeda H., Takayama K., Nagai T. // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 1997. V. 45. N 1. P. 221-223.
11. Панков С.П. Физико-химические основы переработки растворов полимеров. М.: Химия. 1971. 372 с.
12. Чесунов В.М. Образование пленок из растворов полимеров. М.: 1970. 52 с.
13. Вихорева Г.А., Пчелко О.М., Роговина С.З. и др. // Материалы Пятой конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. С. 24-27.
14. Агеев Е.П., Вихорева Г.А., Матушкина Н.Н. и др. // Высокомол. соед. 2000. Т. А42. № 2. С. 333-339.

15. Вихорева Г.А., Пчелко О.М., Роговина С.З., Гальбрайт Л.С. // Там же. 2001. Т. А43. № 6. С. 1079-1084.
16. Синицына Г.М., Влодавец И.Н., Ребиндер П.А. // Докл. АН СССР. 1967. Т. 175. № 2. С. 399-402.
17. Панков С.П., Файнберг Э.З. Взаимодействие целлюлозы и целлюлозных материалов с водой. М.: Химия, 1976. 232 с.
18. Вихорева Г.А., Енгибарян Л.Г., Голуб М.А. и др. // Хим. волокна. 1998. № 1. С. 14-19.
19. Вихорева Г.А. Синтез и свойства водорастворимых производных хитина // Дис.... д.х.н. М., МГТУ, 1998. 316 с.
20. Николаев А.Ф., Прокопов А.А., Шульгина Э.С. // ЖПХ. 1985. Т. 58. № 7. С. 1676-1679; № 8. С. 1870-1874.
21. Николаев А.Ф., Прокопов А.А., Шульгина Э.С., Виноградов М.В. // ЖПХ. 1987. Т. 60. № 1. С. 223-224.
22. Zim Z.Y., Wan L.S.C // Drag Development and Industrial Pharmacy. 1995. V. 21. N 7. P. 839-846.
23. Nogales A., Ezguerra T.A., Rueda D.R. et al. // Colloid and Polym. Sci., 1997. V. 275. N 5. P. 419-425.
24. Евмененко Г.А., Алексеев В.Л. // Высокомол. соед. 1997. Т. А39. № 4. С. 650-656.
25. Чалых Т.И., Герасимов В.К. // Структура и динамика молекулярных систем. Ч. 1. Йошкар-Ола-Казань-Москва: Мар.ГТУ. 1997. С. 52-56.
26. Генин Я.В., Скляр А.М., Цванкин Д.Я. и др. // Высокомол. соед. 1984. Т. 26А. № 11. С. 2411-2416.
27. Chatelet C, Damour O., Domard A. // Biomaterials. 2001. V. 22. P. 261-268.
28. Rathke T.D., Hudson S.M. // J. Macromol. Sci.-Rev. Macromol. Chem. and Phys. 1994. V. 34. N 3. P. 422-437.
29. Алексеев В.Л., Евмененко Г.А. // 13 Совещ. по использ. нейтронов в физ. тверд. тела. Звенигород, 1995. Прогр. и тез. докл. СПб., 1995. С. 51.
30. Uragami T. // Chitin and Chitozan. Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications / Ed. by Skjak-BrAek G., Anthonsen T., Sandford P. L.-N.-Y.: Elsevier. 1980. P. 783-792.
31. Ghazali M., Nawawi M., Huang R.Y.M. // J. Membrane Sci. 1997. V. 124. P. 53-62.
32. Guo Qunhui Studies on the Permeation Mechanism of Hydrophilic Homogeneous and Composite Pervaporation Membranes // Ph. Degree Thesis 1995. Yokohama Nat. University. 214 p.
33. Кабанов В.А. // Высокомол. соед. А. 1994. Т. 36. № 2. С. 183-197.
34. Эльцефон Б.С. Гидрогели интерполиэлектrolитных комплексов медицинского назначения // Автореф. дис.... докт. хим. наук. М.: МГУ, 1990. 50 с.
35. Скоринова Е.Е., Калужна Р.И., Вихорева Г.А. и др. // Высокомол. соед. А. 1996. Т. 38. № 1. С. 61-65.
36. Агеев Е.П., Котова С.Л., Скоринова Е.Е., Зезин А.Б. // Там же. А. 1996. Т. 38. № 2. С. 323-329.
37. Агеев Е.П., Вихорева Г.А., Гальбрайт Л.С. и др. // Там же. 1998. А. Т. 40. № 7. С. 1198-1201.
38. Arguellsmonal W., Hecchavarria O.L., Rodriguez L., Peniche C. // Polym. Bull. 1993. V. 31. N 4. P. 471-478.
39. Скоринова Е.Е. Получение, строение и свойства полиэлектrolитных комплексов на основе хитозана и сульфата хитозана. Дис. ... к.х.н. Москва. МТИ, 1989.
40. Deyao K., Liu J., Cheng G.X. et al. // J. Appl. Polym. Sci. 1996. V. 60, Iss 2. P. 279-283.
41. Muzzarelli R.A.A., Tanfani F., Emanuelli M., Gentile S. // J. Appl. Biochem. 1980. V. 2. P. 380-389.
42. Urbanczyk G.W., Lippsymonowicz B. // J. Appl. Polym. Sci. 1994. V. 51. N 13. P. 2191-2194.
43. Pavlath A.E., Wong D., Gregorski K.S., Tillin S.J. // Abstracts XVII-th Int. Carbohydrate Symposium. Ottawa. 1994. P. 53.
44. Demarger-Andre S., Domard A. // Abstracts Book. 1-st Int. Conf. of the European Chitin Society. Brest. France. 1995. EUCHIS-95. P. 16.
45. Агеев Е.П., Котова С.Л. // Биофизика. 1996. Т. 41. № 3. С. 613-619.
46. Shioya T., Rha C.-K. // Chitin and Chitozan. Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications / Ed. by Skjak-BrAek G., Anthonsen T., Sandford P. L.-N.-Y.: Elsevier, 1989. P. 627-634.
47. Chen Rong Huei, Hwa Horng-Dar Effect of Chain // Abstracts Book. 1-st Int. Conf. of the European Chitin Society. Brest. France. 1995. EUCHIS-95. P. 35.
48. Wu L.G., Zhu C.L., Liu M. // i. Membr. Sci. 1994. V. 90. N 3. P. 199-205.

49. Wu L.G., Zhu C.L., Liu M. // Ibid. 1994. V. 90. N 3. P. 207-212.
50. Shieh J.J., Huang R.Y.M. // J. of Membrane Sci. 1997. V. 127. N 2. P. 185-202.
51. Feng X.S., Huang R.Y.M. // Ind. Engin. Chem. Res. 1997. V. 36. N 3. P. 1048-1066.
52. Кирш Ю.Э., Вдовин П.А., Федотов Ю.А. и др. // Высокомол. соед. А. 1996. Т. 38. № 2. С. 330-334.
53. Ларионова А.С., Журавлева Е.М., Кильдеева Н.Р. и др. // Материалы Пятой конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. С. 273-275.
54. Базт М.Р. Свойства растворов и молекулярно-массовые характеристики карбоксиметилового эфира хитозана. Дис. ... к.х.н. М.: МТИ, 1990. 115 с.
55. Вихорева Г.А., Хомяков К.П., Сахаров И.Ю., Гальбрайт Л.С. // Хим. волокна, 1995. № 5. С. 34.
56. Нудьга Л.А., Плиско Е.А., Данилов С.И. // ЖПХ. 1974. Т. 47. № 4. С. 872-876.
57. Нудьга Л.А., Петрова В.А., Бочек А.М. и др. // Высокомол. соед. 1999. Т. 41. № 11. С. 1786-1792.
58. Вихорева Г.А., Кильдеева Н.Р., Роговина С.З. и др. // Хим. волокна. 2000. № 6. С. 14-18.
59. Headland P.O. // Amer. Chem. Soc. Symp. Series. 1996. V. 650. P. 145-154.
60. Мухина В.Р., Пастухова Н.В., Семчиков Ю.Д. и др. // Высокомол. соед. 2001. Т. 43А. № 10. С. 1797-1804.
61. Алексеев В.Л., Кельберг Е.А., Бронников С.В. и др. // Там же. 2001. Т. 43А. № 10. С. 1856-1860.
62. Wen-Yuan Chuang, Tai-Horng Young, Chun-Hsu Yao, Wen-Yen Chiu // Biomaterials. 1999. V. 20. P. 1479-1487.
63. Заявка 58-132001 Япония. С 08В37/08.
64. Заявка 58-70710 Япония. D01 F 1/00, C08 B37/00.
65. Rathke Thomas D., Hudson Samuels M. // J. Macromol. Sci.-Rev. Macromol. Chem. and Phys. 1994. V. 34. N 3. P. 422-437.
66. Суханова Т.Е., Сидорова А.В., Горяинов Г.И. и др. // Высокомол. соед. 1989. Т. 31Б. № 5. С. 381-384.
67. Нудьга Л.А., Баклагина Ю.Г., Петропавловский Г.А. и др. // Там же. 1991. Т. 33Б. № 11. С. 864-868.
68. Михайлов Г.М., Лебедева М.Ф., Нудьга Л.А. и др. // Материалы Пятой конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. С. 51.
69. Szosland L. // Chemical Fibers Internatiol. 1998. N 4 Sept. P. 316.
70. Чосланд Л., Стружчик Г. // Материалы Пятой конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. С. 71.
71. Tokura S., Yoshida J., Nishi N., Hiraoki T. // Polymer. J. 1982. V. 14. N 7. P. 527-536.
72. Илларионова Е.Л., Калинина Т.Н., Чуфарова Т.Н., Хохлова В.А. // Хим. волокна. 1995. № 6. С. 18-22.
73. Wei Y.C., Hudson S.M., Mayer J.M., Kaplan D.L. // J. Polym. Sci. A. 1992. V. 30. N 10. P. 2187-2193.
74. Isogai A., Atalla R.H. // Carbohydrate Polymers. 1992. V. 19. P. 25-28.
75. Mehra R.H., Mehra Anil R. // Colourage. 1994. V. 41. N 1. P. 59.
76. Yamamoto A., Tozaki H., Okada N., Fujito T. // STP Pharma Sciences. 2000. V. 10. N 1. P. 23-24.
77. Yao Kang-de, Peng Tao, Yu-ji, Xu Mei-xuan, Goosen Mattheus F.A. // J. Macromol. Sci.-Rev. Macromol. Chem. and Phys. 1995. V. 35. N 1. P. 155-180.
78. Amiji M.M. // Biomaterials. 1995. V. 16. N 8. P. 593-599.
79. Amiji M.M. // J. Biomaterial. Sci. Polym. Edd. 1996. V. 8. N 4. P. 281-298.
80. Abstracts Book. 1-st Int. Conf. of the European Chitin Society. Brest. France. 1995. EUCHIS-95. P. 17.
81. Нудьга Л.А. // Материалы Третьей Всесоюз. конф. "Совершенствование производства хитина и хитозана из панцирьсодержащих отходов крыля и пути их использования". М.: ВНИРО, 1992. С. 40-44.
82. Chen R.H., Hua H.D. // J. Appl. Polym. Sci. 1996. V. 61. N 5. P. 749-754.
83. Марквичева Е., Купцова С., Вихорева Г. и др. // Материалы Шестой Междунар. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 2001. С. 212-216.
84. Смирнова Л.А., Мухина В.Р., Петров С.В. и др. // Высокомол. соед. 1999. Т. 41. № 9. С. 1513-1515.
85. Nordtveit R.J., Varum K.M., Smidsrod O. // Abstr. of 6-th Int. Conf. on Chitosan. Lodz. 1994. P. 47.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОДУКТОВ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

И.Н. Большаков, СМ. Насибов, Е.Ю. Куклин, А.А. Приходько

Красноярская государственная медицинская академия, Красноярск
onmpi@krsk. infotel.ru

РАЗЛИТОЙ ГНОЙНЫЙ ПЕРИТОНИТ

Энтеросорбция гранулированными препаратами (ионообменные смолы, активированные угли) как метод детоксикации не предусматривает активного удаления отработанных гранул сорбента из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) вследствие их низкой константы текучести. Использование полимеров типа поливинилпирролидона, хитина, хитозана, полипепсина позволяет вывести их из просвета желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Это свойство хитозана представляет особый интерес, поскольку его использование создает перспективы эффективной борьбы с синдромом эндотоксемии, в частности при разлитых формах перитонита [1].

Известно, что хитозан активизирует клетки перитонеального экссудата [2], и прежде всего макрофаги [3, 4]. При этом большинство функций макрофагов, включая супероксидную продукцию и синтез цитокинов (интерфероны, интерлейкин-1, колониестимулирующий фактор) активизируется [5]. При трансплантации хитозана под кожу собакам после операции при сравнении с контрольной группой наблюдалось восстановление активности макрофагов в зоне трансплантации и численности моноцитов в крови. А это значит, что хитозан может быть использован как важный иммунопотенциатор для предупреждения послеоперационной иммуносупрессии [6].

Модулирующий эффект распространяется и на фибробласты (пролиферация и синтез коллагена) и клетки эндотелия [7], полиморфноядерные лейкоциты (фагоцитоз) [8] и Т-клетки (хелперная и цитотоксическая функции) [3]. Известно влияние хитина и его дериватов на пролиферацию фибробластов и на продукцию цитокинами *in vitro* [9]. При этом высокие концентрации (500 мкг/мл) D-глюкозамина в культуре в присутствии (или без) телячьей фетальной сыворотки значительно снижают величину пролиферации L_{929} линии фибробластов по сравнению с контролем. Высокие концентрации хитозана в культуре клеток с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки значительно снижали число пролиферирующих фибробластов в линии клеток L_{929} , а в отсутствии фетальной телячьей сыворотки снижение пролиферации фибробла-

Таблица 1. Розеткообразующая активность лимфоцитов крыс
с разлитым каловым перитонитом в условиях энтеросорбции гелевой формой
низкомолекулярного хитозана ($M \pm m, n = 5$)

Группа	РОК, %			
	timoциты	спленоциты	лимфоциты	
			брыжеечных лимфоузлов	периферичес- кой крови
1. Интактные животные	19,8 ± 2,66	28,6 ± 1,45	9,6 ± 1,30	22,8 ± 2,86
2. Перитонит	4,2 ± 0,20	4,0 ± 0,50	3,0 ± 0,50	4,6 ± 0,80
3. 1%-ная взвесь целлю- лозы	1,8 ± 0,65*	6,8 ± 1,60	3,4 ± 0,95	25,2 ± 5,16*
4. 1%-ный гелевый хито- зан	5,8 ± 1,60	12,6 ± 2,96**	11,2 ± 0,40**	25,0 ± 0,40**

Обозначения: * - достоверно различимые результаты между группами 3 и 2.

** - достоверно различимые результаты между группами 4 и 2

стов не наблюдалось. Было выявлено, что в течение 30 ч инкубирования культура фибробластов не только проявляла реакцию адгезии к поверхности пластика, но и пролиферировала. Форма клеток в среде с низким содержанием хитозана была сферической, а при увеличении содержания хитозана в среде до 15% увеличивалось число клеток распластанной звездчатой формы. В присутствии коллагена и хитозана культура клеток прикреплялась к подложке и росла [9]. Результаты показывают, что *in vivo* усиление пролиферации фибробластов может быть вызвано непрямым воздействием хитина и его дериватов.

Было обнаружено *in vivo*, что образование эндотелия сосудов и миграция нейтрофилов происходит благодаря усилению выделения интерлейкина (ИЛ-8) из фибробластов [10]. Благодаря поликатионным свойствам хитозана происходит прикрепление тимоцитов к макрофагам в смешанной культуре клеток [11].

Введение экспериментальным животным (мыши линии СВА) 2 мг хитозана через 24 ч после иммунизации тимусзависимым (эритроциты барана) и тимуснезависимым (липополисахарид) антигенами увеличивает силу первичного иммунного ответа соответственно на 250 и 160% по сравнению с контрольными группами [12]. Иммунопотенцирующий эффект обнаруживается у животных, слабо реагирующих на тимусзависимый антиген, и не обнаруживается у сильно реагирующих животных. Механизм потенцирования, вероятно, сходен с действием полиэлектролитов [13]. Иммунопотенцирующее действие хитозана обуславливает высокую резистентность к золотистому стафилококку и кишечной палочке [14], при этом важно, что достигаемый эффект на порядок выше при использовании водорастворимых продуктов хитина, чем водонерастворимых [12].

Использование низкомолекулярного сшитого хитозана (ММ 10-15 kD) и декстрана, сшитого эпихлоргидрином и модифицированного террилитином и полимиксином В, в качестве гелевых форм сорбентов для энтеросорбции и лаважа брюшной полости при разлитом гнойном перитоните у животных описано в работе [15-19]. Предварительные исследования возможности извлечения бактериальных токсинов с клеточной поверхности лимфоцитов и восстановления функции мембранных маркеров в результате прямой цитосорбции подтвердили возможности не прямой иммунокоррекции [20].

Интенсивная энтеросорбция ЖКТ в течение 18 ч с использованием гелевой формы низкомолекулярного хитозана приводит к полному сохранению функци-

Таблица 2. Розеткообразующая активность лимфоцитов крыс с разлитым каловым перитонитом в условиях комбинированного применения корпорального лаважа брюшной полости и энтеросорбции ($M + m, n = 5$)

Группа	РОК, %			
	timoциты	спленоциты	лимфоциты	
			брыжеечных лимфоузлов	периферической крови
1. Интактные животные	19,8 ± 2,66	28,6 ± 1,45	9,6 ± 1,30	22,8 ± 2,86
2. Перитонит	4,2 ± 0,20	4,0 ± 0,50	3,0 ± 0,50	4,6 ± 0,80
3. Сефадекс G-200 (внутрибрюшинно) + целлюлоза (в желудок)	3,0 ± 1,00	5,8 ± 0,90	1,6 ± 0,45	29,0 ± 3,51*
4. Модифицированный декстран (внутрибрюшинно) + 1% гелевый хитозан (в желудок)	29,8 ± 2,36**	35,6 ± 1,95**	19,8 ± 1,20**	31,4 ± 4,16**

* - достоверно различимые результаты между группами 3 и 2.

** - достоверно различимые результаты между группами 4 и 2

ональной активности *E*-рецептора на лимфоцитах брыжеечных лимфатических узлов и периферической крови, а спонтанные розетки образуют в 3,2 раза больше спленоцитов с эритроцитами (табл. 1). При этом функциональная активность тимоцитов остается чрезвычайно низкой ($5,8 \pm 1,6\%$ розеткообразующих клеток (РОК) против $4,2 \pm 0,20\%$ при нелеченном перитоните ($P > 0,05$). В контрольной группе животных, получавших в качестве энтеросорбента 1% взвесь микрокристаллической целлюлозы, проявляются признаки детоксикации, но они характерны только для лимфоцитов периферической крови ($25,0 \pm 0,4\%$ РОК против $4,6 \pm 0,8\%$ при нелеченном перитоните, $P < 0,05$ и против $22,8 \pm 2,86\%$ у группы интактных животных, $P > 0,05$). Исследование К-клеточной активности спленоцитов выявляет полную сохранность функции *FcγR* и высокую киллерную активность ($56,2 \pm 5,86$ бляшкообразующих клеток (БОК) против $5,2 \pm 1,60$ БОК у крыс, кормленных целлюлозой, против $25,8 \pm 2,66$ БОК при нелеченном перитоните и против $47,0 \pm 0,50$ БОК у интактных животных).

В результате реализации идеи одновременного связывания бактериальных токсинов в брюшной полости и в просвете ЖКТ при разлитом каловом перитоните выявляется глубокая детоксикация, затрагивающая и клетки периферической крови, и клетки селезенки, и лимфатических узлов, и клетки вилочковой железы. Сочетание интенсивной энтеросорбции низкомолекулярным хитозаном и внутрибрюшного лаважа комбинированным декстрановым сорбентом приводит к весьма значительной иммобилизации *in situ* бактериальных токсинов и полностью сохраняет (и даже активизирует) функциональную активность клеток иммунной системы (табл. 2).

Изучение антителозависимой клеточной цитотоксичности спленоцитов подтверждает результаты Е-рокеткообразования ($39,2 \pm 5,29$ БОК против $5,8 \pm 0,90$ БОК у животных с комбинированной контрольной сорбцией, против $25,8 \pm 2,66$ БОК при нелеченном перитоните и против $47,0 \pm 0,50$ БОК у группы интактных крыс).

Таким образом, практически значимая иммунокоррекция при разлитом перитоните может быть достигнута иммобилизацией бактериальных токсинов с

помощью комбинированного применения энтеросорбции и внутрибрюшного лаважа гелевыми сорбентами.

Хитозан обладает бактерицидным действием [21]. При анализе количественного и качественного состава микрофлоры самого хитозана было выявлено отсутствие в нем патогенных микроорганизмов. Сравнение микробной контаминации хитозана с другими сухими загустителями, например, желатином, показывает наличие в нем низкого числа микробных тел. Анализы формованных продуктов, содержащих добавки уксуснокислотного раствора хитозана и варено-мороженого мяса криля, показали, что в 75% проб готовых продуктов микробные числа в 1,3-1,8 раза ниже, чем в мясе криля. Санитарно-показательные микроорганизмы и патогенные (сальмонеллы, золотистый стафилококк) не обнаруживаются в 100% проанализированных проб рыбных соусов, содержащих 1%-ный раствор хитозана. Все это указывает на бактериостатический эффект растворов хитозана в уксусной кислоте.

Известно, что при действии хитозана на растения и животные полимер расщепляется ферментами до олигосахаридов, которые проникают в клетки, воздействуя на разные их структуры [22, 23]. Для выявления действия низкомолекулярных продуктов хитозана (типа хитодекстринов) на микробиоценоз кишечника добавлением в корм крыс антибиотика (левомицетин или ампициллин) осуществляли сдвиг микробиоценоза кишки животных в неблагоприятную сторону и исследовали динамику нормализации микробиоценоза у животных, которым добавляли в корм хитодекстрин. Возникающий после антибиотикотерапии дисбактериоз рассматривают как "лекарственную" болезнь, для преодоления которой рекомендуют специальное лечение. Опыты на крысах показали, что хитодекстрин может быть эффективным средством коррекции микробиоценоза кишки. Животные в конце курса приема антибиотика имели типичные для дисбактериоза сдвиги: общее снижение уровня полезной микрофлоры (бифидо- и молочно-кислых бактерий), резкое увеличение общего количества энтеробактерий и лактозонегативных форм. Ослабление защитных функций полезной микрофлоры приводило к появлению в кишке даже микроскопических грибов.

В опыте использованы различные дозировки хитодекстрина и в коррекции микробиоценоза четко прослежена зависимость от дозы полимера. У животных, не получавших хитодекстрин в течение 35 суток кормления, увеличение массы полезной микрофлоры не наблюдалось. При добавлении в диету крыс низких доз хитодекстрина (1 мг в день) отмечался высокий уровень заселенности кишки представителями неблагоприятной микрофлоры (кандида, протей и др.). При смешивании корма с достаточными дозами хитодекстрина (5-10 мг в день на крысу) неблагоприятная микрофлора полностью элиминировалась. Исследования подтверждают, что присутствие в пище хитодекстрина восстанавливает здоровую экосистему микроорганизмов в кишке у животных. Дозы 5-10 мг на 200 г массы тела достаточны для быстрого очищения кишки от условно патогенной микрофлоры [22, 23].

Проведенное испытание влияния хитозана и его двух производных (ацетата и гидрохлорида) на предупреждение размножения культуры кишечной палочки штамма В1 показало, что хитозан в зависимости от дозы, а также от типа его соли значительно предупреждает рост культуры кишечной палочки [24]. Получение сорбционных материалов на основе хитина-хитозана позволило разработать ряд сорбентов для экстракорпоральной и корпоральной детоксикации организма. Возможность получения и эффективность использования гранульной формы сорбента обеспечены высокой химической и биологической стойкостью полимера, высокой механической прочностью, достаточной проницаемостью и высокой

гидрофильностью. Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена разработал методику экстракорпоральной ликворосорбции с применением хитозановых сорбентов. Использование хитозана с СД = 75-90%, зольностью 0,1-0,5%, содержанием белка не более 0,5%, ММ 80-800 кДа позволило получить хорошие результаты сорбции спинномозговой жидкости и считать такие сорбенты лучшими среди известных. Широкие возможности модифицирования молекулы хитозана позволяют применять их согласно поставленным задачам с эффектом селективной сорбции [24].

Водорастворимая форма хитозана, содержащая протонированные аминогруппы, обнаруживает высокую агрессию по связыванию клеток животных и микробных тел. Как сказано выше, это создает высокий бактериостатический эффект [26, 27]. Остановка роста патогенной микрофлоры объясняется свойством хитозана агглютинировать микробные тела. Механизм агглютинации идентичен склеиванию эритроцитов поликатионами [28]. Универсальный механизм селективного связывания хитозана с рецепторами сахаров на клеточной мембране обеспечивает бактериостатический эффект практически на любом виде микробов [29, 30]. Особо важным результатом работы [27] является обнаружение мощного противолипосахаридного (анти-ЛПС) эффекта. Известно, что хитин способен извлекать из модельного раствора до 76% бактериального эндотоксина [31]. Таким образом, перспективность аффинной энтеросорбции продуктами хитозана при разлитом перитоните, сопровождающемся активацией грамотрицательной микрофлоры и образованием большой концентрации бактериальных экзо- и эндотоксинов, не вызывает сомнений. Л.А. Крафт с соавт. [32] испытывали гидрогель карбоксиметилхитозана на 35 штаммах микроорганизмов, включая 31 штамм бактерий и четыре штамма грибов. Все используемые микроорганизмы являлись клиническими штаммами. Среди видов микрофлоры грамположительные бактерии - девять штаммов *Staphylococcus epidermidis*, девять штаммов *Corynebacterium xerosis*, грамотрицательные бактерии - три штамма *Escherichia coli*, четыре штамма *Klebsiella pneumoniae*, шесть штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, класс грибов - четыре штамма *Candida gpp*. В исследованиях использованы гидрогели с различным содержанием карбоксиметилхитозана - от 3 до 8 мас.%. Результаты показали, что по отношению к грамположительным бактериям антимикробная активность гидрогелей увеличивается в зависимости от времени контакта микробов с препаратом. Антимикробная активность гидрогелей по отношению к грамотрицательным бактериям достигает максимума через один час контакта. Максимальное действие оказывается на дифтероиды и грибы рода *Candida*. По степени чувствительности к гидрогелям карбоксиметилхитозана группы микроорганизмов располагаются в следующей последовательности: грибы → клебсиеллы → дифтероиды → стафилококки → псевдомонады → кишечные палочки [32].

На базе НИИ физико-химической медицины МЗ РФ проведены исследования по выявлению детоксикационного эффекта гелевой формы глутамата хитозана при тяжелых гнойно-воспалительных заболеваниях органов брюшной полости в качестве энтеросорбента [33]. Такая постановка задачи диктуется тем, что разлитой перитонит - заболевание септического характера, где интоксикационный синдром вызывает вторичные необратимые инверсии метаболизма клеток, приводит к фульминантному гепатиту и мозговой коме. Даже успешное очищение брюшной полости при многократных лаважах может быть напрасным: смерть наступает при явлениях бактериальной эндотоксемии [34]. Постоянно присутствующая в ЖКТ условнопатогенная микрофлора становится патогенной с высокой вирулентностью в ряде случаев: снижение выхода в кишку желчных кислот и нарушение соотношения желчные кислоты/эндотоксины грамотрицательной

Таблица 3. Количественная характеристика бактериального эндотоксина
в периферической крови крыс с разлитым каловым шестичасовым перитонитом
в условиях энтеросорбции ($M \pm m$, $n = 5$)

Группа	Площадь поражения (пиксели)	Количество ЛПС (мкг/мл)
Контроль № 1 (перитонит)		
кровь из сердечной полости	7247 \pm 603	54,9 \pm 3,80
из воротной вены	8219 \pm 712	57,5 \pm 11,46
Контроль № 2 (физраствор)		
кровь из сердечной полости	2894 \pm 450	36,2 \pm 4,34
из воротной вены	4581 \pm 341	38,9 \pm 2,66
Контроль № 3 (1% целлюлоза)		
кровь из сердечной полости	2788 \pm 170	31,4 \pm 0,45
из воротной вены	2892 \pm 220	35,4 \pm 2,75
Опыт (1% гель хитозана глутамата)		
кровь из сердечной полости	1991 \pm 168	11,4 \pm 0,35
из воротной вены	2210 \pm 315	21,9 \pm 9,58

микрофлоры, парез кишечной трубки и нарушение проницаемости ее стенок, смена пейзажа микрофлоры. Нарушение связывания бактериального эндотоксина в кишке способствует его свободному и быстрому выходу в систему воротной вены и трансмурально в свободную брюшную полость. Высокая эндотоксемия в воротной вене приводит к декомпенсации печеночных клеток, в частности к блокированию клеток Купфера - основных утилизаторов бактериальных токсинов [37-35]. Снижение пигментообразования и выхода желчных кислот замыкает порочный круг. Прорыв кишечного барьера приводит к массивному накоплению микробного материала в свободной брюшной полости и поступлению в систему общей циркуляции [38]. Таким образом, токсическая фаза перитонита - это результат свободного сецернирования бактериальных токсинов из просвета кишки и печеночного венозного кровотока в артериальную систему.

Современное лечение перитонита антибиотиками приводит к бактерицидному эффекту и резкому ускорению образования бактериального липополисахарида (ЛПС), к неконтролируемой эндотоксемии [39-40]. Использование 1%-ной гелевой формы глутамата хитозана в качестве энтеросорбента для детоксикации ЖКТ при разлитом каловом перитоните у крыс, и контроль уровня ЛПС в крови портальной системы и надпеченочного бассейна были предметом исследований авторов работы [41].

Предварительные исследования применения гелевой формы хитозана в стендовых опытах показали, что хитозан в силу полиэлектролитного характера способен хелатировать ЛПС и микробные тела, создавая, тем самым, защитную подложку на слизистой оболочке кишки и уменьшая выход эндотоксина в сосудистую систему. Иммуноферментный анализ мазков крови после шестичасовой энтеросорбции показал, что выявляется эффект детоксикации как в контрольных, так и в опытных группах животных, но использование глутамата хитозана позволяет снижать уровень интоксикации крови более, чем в четыре раза (табл.3).

Результаты адгезии молекул ЛПС клетками периферической крови при энтеросорбции выявляют положительный эффект глутамата хитозана. Результат де-

Таблица 4. Результаты опсонизации (адгезии) ЛПС клеток крови крыс с шестичасовым разлитым каловым перитонитом в условиях энтеросорбции ($M \pm m$, $n = 5$)

Группа	Твердофазный иммуноферментный анализ % клеток крови, опсонизированных ЛПС	
	лимфоциты	нейтрофилы
Контроль № 1 (перитонит)		
кровь из сердечной полости	27,3 \pm 1,42	47,2 \pm 2,91
из воротной вены	32,0 \pm 4,51	55,0 \pm 7,27
Контроль № 2 (физраствор)		
кровь из сердечной полости	29,4 \pm 5,66	36,2 \pm 4,34
из воротной вены	37,6 \pm 5,96	54,0 \pm 2,76
Контроль № 3 (1% целлюлоза)		
кровь из сердечной полости	33,0 \pm 1,00	31,4 \pm 0,45
из воротной вены	34,0 \pm 2,51	62,6 \pm 8,57
Опыт (1% гель хитозана глутамата)		
кровь из сердечной полости	17,4 \pm 1,55	52,8 \pm 4,41
из воротной вены	17,0 \pm 2,00	64,4 \pm 3,46
Интактная кровь		
Кровь из сердечной полости	13,2 \pm 2,61	12,8 \pm 1,40
из воротной вены	12,8 \pm 1,40	17,2 \pm 1,65

токсикации выражается как в уменьшении общей площади поражения крови, так и в значительно меньшей антигенной сенсибилизации клеточных мембран лимфоцитов (табл. 4). Вполне вероятно, что эффект предохранения поверхности иммунокомпетентных клеток от массивного поступления в кровь и лимфу бактериального ЛПС в результате его связывания сорбентами сопряжен с положительной динамикой иммунокоррекции. Сохранение высокой функции лимфоцитов при разлитой форме перитонита может отражать эффективность корпоральной сорбции.

Таким образом, активная энтеросорбция с помощью гелевого хитозана у животных с разлитой формой калового перитонита должна являться прямым показанием к его использованию. Энтеросорбция хитозаном и его производными способна создавать существенный детоксикационный эффект и уменьшать антигенную нагрузку на иммунокомпетентные клетки крови (см. табл. 4).

Исследования, проведенные Гельфандом Б.Р. с соавт. [42], показали, что использование гелевой формы высокомолекулярного хитозана (зольность менее 0,02%, CD - 0,94, MM 190 кДа) в клинических условиях является эффективным методом интракорпоральной детоксикации у больных с синдромом кишечной недостаточности. При использовании в качестве энтеросорбентов ваулена, хитозана и полисорба наибольшей сорбционной активностью обладал хитозан, проявивший при лечении антибактериальный эффект [42]. Бактериостатический эффект гранулированных и гелеобразных форм хитозана подтверждают в своих исследованиях и авторы [43-44], при этом необходимым критерием эффективности энтеросорбента является его гелевая форма и наличие положительного заряда на его поверхности. Взаимодействие кислотных остатков клеточных элементов крови с аминок группами хитозана может приводить к мощному коагуляционному эффекту в суспензии отмытых от плазмы или гепаринизи-

Таблица 5. Изменение микроэкологии ЖКТ под влиянием энтеросорбции хитозаном [42]

Микроорганизмы	Процент		Микроорганизмы	Процент	
	до сорбции	после сорбции		до сорбции	после сорбции
Нет роста	12	36	<i>Proteus spp.</i>	21	15
<i>E. coli</i>	15	15	<i>Yersinia</i>	6	3
<i>Acinetobacter</i>	21	6	<i>Cedecia</i>	3	–
<i>Klebsiella spp.</i>	9	12	<i>Providencia</i>	3	–
<i>Pseudomonas spp.</i>	12	9	<i>Shigella</i>	3	–
<i>Enterobacter spp.</i>	6	3	<i>Candida spp.</i>	3	–

Таблица 6. Количество микробных колоний *Ps. aeruginosa* на 1 см² при обработке 1 млрд взвеси микрофлоры гелевыми сорбентами в соотношении 5:2 (по объему) [54]

Время сорбции, ч	Контроль	Сефадекс G-200	Агароза	Агароза + полимиксин В	Хитозан немодифицированный	Хитозан + полимиксин В	Сшитый декстран + полимиксин В
0,5	20	100	50	53	–	25	160
1	22	120	50	60	3	150	160
2	20	130	60	100	5	150	160
3	20	150	70	140	5	150	160
6	20	160	70	160	5	150	160

рованных эритроцитов [27,45-47]. Коагуляционный эффект, оказываемый хитозаном и вязкие свойства последнего могут быть весьма полезными как при нарушении проницаемости стенки кишки, так и после оперативных вмешательств на полых органах брюшной полости в условиях перитонита [48-49]. Гелевые формы сорбента свободно проходят через различные энтеральные дренажи и, таким образом, значительно повышают его востребованность при лечении тяжелой категории больных с энтеральной недостаточностью. Введение жидких форм хитозана в кишку при проведении сеансов энтеросорбции изменяют микроэкологию ЖКТ. Так, введение хитозана в виде 0,3%-ного раствора через зонд в кишку тяжелым больным приводило к восстановлению близкого к норме микропейзажа пищеварительного тракта. При анализе кишечного содержимого выявлено, что в 30% случаев рост флоры после сорбции отсутствует (табл.5).

Способность хитозана останавливать рост некоторых микроорганизмов и болезнетворных видов плесени описана и в работах [50-53]. Установлено, что при концентрации хитозана 0,015% рост бактерий *E. coli* в толстой кишке полностью прекращается, а в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus* активность проявляется при 0,02% и больше [52, 53]. Исследования автора показали, что хитозан способен в четыре раза понижать число жизнеспособных микробных тел (табл.6). Ограничение роста синегнойной палочки объясняется свойством полимера, в частности, его протонированных аминогрупп агглютинировать микробные тела подобно склеиванию эритроцитов поликатионами. Сшивка конъюгата хитозана с полимиксином В глутаровым альдегидом снижает его агглютинирующие свой-

Таблица 7. Микробный пейзаж илеоцекального отдела кишки крыс в условиях разлитого перитонита и контакта с гелевой формой крилевого хитозана

Микрофлора кишки, %	Хитозан + взвесь кишечного содержимого 1:2,5 (по объему)									
	Животные интактные					Животные с перитонитом				
	Время сорбции, ч									
	0	2	4	6	16	0	2	4	6	16
<i>Serratia marcescens</i>	93,3	—	—	36,8	1,6	65,4	—	—	—	—
<i>Yersinia enterocolitica</i>	5,2	—	+	60,5	93,6	8,3	—	—	—	—
<i>Serratia liqufaciens</i>	0,7	—	—	0,6	—	4,8	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i>	—	—	+	—	1,9	—	—	—	—	—
<i>Hafnia alvei</i>	—	—	—	—	—	15,2	—	—	—	—
<i>Acinetobacter calcoa- ceticus</i>	—	98	—	—	—	—	99,9	98	98	98
<i>Providencia stuartii</i>	—	1,5	—	—	—	—	—	1,5	1,5	1,5
<i>Morganella morganii</i>	—	0,2	—	—	1,4	—	—	0,2	0,2	0,2
<i>Kluyvera species</i>	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
<i>Pseudomonas cepacia</i>	—	—	—	1,7	—	—	—	—	—	—
<i>Providencia reitgeri</i>	—	—	—	—	0,7	—	—	—	—	—
<i>Citrobacter amalona- ticus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Enterobacter cloacae</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Salmonella typhi</i>	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—
<i>Pseudomonas malto- philia</i>	—	—	—	—	—	—	0,04	—	—	—

ства и бактериостатический эффект. Однако детоксицирующий эффект большинства примененных гелевых сорбентов рассчитан не на подавление жизнедеятельности микробной флоры, а на связывание ее токсических субстанций, в частности ЛПС. Такое связывание возможно как на поверхности микробной стенки, так и на клетках иного генеза [54]. Взаимодействие хитозанового сорбента с ЛПС на микробной капсуле, так или иначе, изменяет ее свойства (солюбилизация липидного бислоя, изменение заряда) и в ряде случаев повышает эффективность применяемых антибиотиков. Так, в сравнении с контролем чувствительность к антибиотикам синегнойной палочки после обработки гелевыми хитозановыми сорбентами повышается на 29%.

Возможность применения хитозана и его производных для извлечения бактериальных токсинов из просвета ЖКТ при разлитом перитоните требует испытаний с интестинальной микробной флорой. Разлитой перитонит, как известно, приводит к нарушению равновесия микробных ассоциаций с активизацией патогенных штаммов. Поэтому действие производных хитозана должно быть направлено как на связывание свободных микробных токсинов в просвете кишки, так и на агглютинацию микробов в результате электростатического взаимодействия. Обволакивающий эффект хитозана с образованием полиэлектролитных комплексов может быть полезным при формировании микробного пейзажа. Универсальность действия объясняется связыванием хитозана с полисахаридными рецепторами на клеточной поверхности.

Таблица 8. Микробный пейзаж начального отдела толстой кишки крыс в условиях разлитого перитонита и контакта с гелевой формой крилевого хитозана

Микрофлора кишки, %	Хитозан + взвесь кишечного содержимого 1:1 (по объему)									
	Животные интактные					Животные с перитонитом				
	Время сорбции, ч									
	0	2	4	6	16	0	2	4	6	16
<i>Serratia marcescens</i>	93,9	50,1	4,1	27,2	93,6	65,4	91,6	98,8	98,8	93,9
<i>Yersinia enterocolitica</i>	5,2	47,9	—	44,7	0,7	8,3	1,1	0,7	0,7	5,2
<i>Serratia liquefaciens</i>	0,7	1,8	—	5,6	5,5	4,8	2,6	—	—	0,7
<i>Escherichia coli</i>	—	—	8	2,9	—	—	—	—	—	—
<i>Hafnia alvei</i>	—	—	—	—	—	15,2	—	—	—	—
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Providencia stuartii</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Morganella morganii</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Kluyvera species</i>	—	—	15,7	—	—	—	—	—	—	—
<i>Pseudomonas cepacia</i>	—	—	—	—	—	—	4,3	—	—	—
<i>Providencia rettgeri</i>	—	0,2	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	—	—	61,8	15,3	—	—	—	—	—	—
<i>Enterobacter cloacae</i>	—	—	4,3	—	—	—	0,3	—	—	—
<i>Salmonella typhi</i>	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Результаты смешивания и инкубирования зольного хитозана (степень деацетилирования 0,82, зольность 17,5%, характеристическая вязкость 3,8 дл/л) с 10%-ной взвесью кишечного содержимого крыс показывают возможность восстановления первоначального микробного пейзажа кишки. Микробная идентификация свежевыделенного кишечного содержимого интактных крыс характеризуется присутствием трех активных видов микробов: *Serratia marcescens* 93,3%, *Yersinia enterocolitica* 5,2%, *Serratia liquefaciens* 0,7%. При разлитом перитоните изменяется соотношение этих видов микробов с дополнительным выявлением активности *Hafnia alvei* и *Salmonella typhi*. В присутствии гелевой формы крилевого хитозана (CD = 0,9, ММ 180 кДа, зольность 1,5%) в кишечной взвеси интактных животных в объемных соотношениях 2,5:1 в целом сохраняется видовая характеристика микрофлоры. В кишечном содержимом больных животных в течение всего периода инкубации с сорбентом происходит полная смена видов активных штаммов с преобладанием *Acinetobacter calcoaceticus* (99,9%) (табл. 7) [54].

Важным результатом является полное восстановление активности микробного пейзажа у больных животных практически через два часа контакта с сорбентом, взятом в соотношении 1:1 (табл. 8) [50]. Эффективное устранение явлений дисбактериоза с помощью энтеросорбции хитозаном является серьезным подспорьем при успешном лечении тяжелой гнойной инфекции, поскольку в терапевтическую схему, как правило, входят антибактериальные препараты последних поколений, нарушающие микробиоценоз в кишке.

При расшифровке механизмов энтеросорбции к вопросам особой важности могут быть отнесены взаимодействие полимера с эпителиоцитами и их трансмембранная проницаемость при формировании хитозановой пленки на слизистой оболочке, связывание эндотоксинов с полимером и их пассаж в кишечной трубке, формирование комплексов бактериальных токсинов с желчными кислотами и механизмы, препятствующие трансляции в систему воротной вены, эффекты общей детоксикации.

УРЕМИЧЕСКИЙ СИНДРОМ

На сегодняшний день разработан ряд терапевтических мероприятий для лечения острой почечной недостаточности. Выбор метода лечения определяется этиологией, формой и стадией этого заболевания, но основное место в его лечении занимают методы экстрауренальной детоксикации. К этим методам относятся: гемодифiltrация, перитонеальный диализ, искусственная почка и кишечный диализ.

В настоящее время успехи лечения почечной недостаточности с помощью гемодиализа столь велики, что современный аппарат "искусственная почка" образно называют "инсулином для больных нефритом". Однако при гемодиализной терапии недостаточности почек может возникнуть ряд осложнений, не позволяющих добиваться медицинской реабилитации больных. Это заставляет продолжить поиск новых способов лечения почечной недостаточности, которые позволяют стабилизировать уровень азотистых соединений в крови на разных этапах ее проявления и, тем самым, существенно сохранить трудоспособность больных. Кроме того, у ряда больных с почечной патологией имеются противопоказания к гемодиализу, что также вынуждает расширить поиск новых методов лечения [55].

В 1974 г. Kolff [56], применяя перфузию изолированного отдела тонкой кишки, впервые доказал возможность удаления мочевых метаболитов из крови через ЖКТ. В литературе имеются единичные сведения, указывающие на возможность использования ЖКТ в качестве заместительного органа в выведении мочевых токсинов из организма и метаболической коррекции почечной недостаточности. Поиск и разработка новых энтеросорбентов является одной из фундаментальных задач эфферентной медицины [57].

В этой связи большой интерес в настоящее время представляют водорастворимые и водонерастворимые препараты хитозана, дающие вязкие растворы и гели, соответственно. Проведение детоксикации организма через ЖКТ с использованием сеансов кишечного диализа хитозаном по сравнению с другими известными сорбентами имеет ряд преимуществ. Хитозан имеет уникальную поликатионную природу, что обеспечивает его адгезионное сродство к материалам клеточных стенок. Хитозан имеет два типа реакционноспособных ОН- и NH₂-групп для получения более разнообразных модификаций, и, соответственно для строго направленного синтеза производных. Протонированная в кислой среде аминогруппа, являясь высокоактивной, обеспечивает растворимость полимера в воде. Хитозан как полисахарид органического происхождения обладает низким раздражающим действием на слизистую оболочку кишки, мукоадге-

живен, биосовместим, биodeградируем, он существенно повышает биодоступность труднорастворимых веществ в крови. Все эти свойства хитозана позволяют по-новому подойти к коррекции внутренней среды человека, ответственной за детоксикационную функцию.

Известно [58] взаимодействие положительно заряженных мукоадгезивных микросфер хитозана с отрицательно заряженными гликопротеидами слизи. Степень адсорбции слизи пропорциональна абсолютным значениям положительного ξ -потенциала микросфер хитозана и рассеивающего ξ -потенциала гликопротеидов слизи. Действие хитозана, как усиливающего агента, для векторной проницаемости кишечного эпителия на примере функционирования моноклеточного слоя Сасо-2 клеток, подобных кишечному эпителию рассмотрено в [59, 60]. Выяснилось, что хитозан не влияет на проницаемость кишечного эпителия при нейтральной pH среды, а в кислой среде из-за положительного заряда хитозан может взаимодействовать с анионными компонентами гликопротеидов на поверхности эпителиальных клеток и вызывать проницаемость кишечного эпителия [61]. В этой ситуации меняется трансэпителиальная электрорезистентность эпителиальных клеток [62]. Присутствие хитозана на клеточной поверхности слизистой оболочки изменяет топографию этой поверхности. Полимер абсорбируется на поверхности клетки и изменяет ее рельеф по сравнению с контрольными веществами [63]. При наличии свободных аминогрупп как свободный хитозан, так и его солевые формы независимо от pH эффективно повышают абсорбцию белков через слизистую оболочку. Гель хитозана в концентрации 0,5% вызывает слабое повреждение мембраны слизистой оболочки, на что указывают выход в среду следовых количеств лактатдегидрогеназы [64].

Объяснение факта увеличения окологлобального транспорта веществ находят в реакции цитоскелета эпителия. В результате локального перераспределения F-актина изменяется структура и проницаемость апикальных сегментов клеток кишечного эпителия с сохранением изначальной проницаемости базальных мембран. В результате неравномерной и массовой контракции мембран образуются расширенные межклеточные контакты и растет окологлобальная проницаемость маркерных молекул различной молекулярной массы [65].

Известно, что при контакте клеток с хитозановым гелем увеличивается активность этих клеток на полимерной подложке по сравнению с активностью клеток в отсутствие хитозана [66]. На модели донорского реснитчатого эпителия человека установлено как *ex vivo*, так и *in vivo*, что величина транзита веществ через эпителий слизистой оболочки зависит от молекулярной массы хитозана и его количественного содержания. Высокая молекулярная масса и большое количество глутамата хитозана снижают продолжительность транспорта [67]. В комплексе с полифосфатом хитозан легко образует связи с гидрофильными белками клеточной поверхности. Такие взаимодействия не носят ионного характера и играют важную роль в опосредованной транспортировке веществ клетками [68]. Высокая скорость перфузии токсических веществ через стенку кишки в сторону полимера, локализованного на слизистой оболочке, сопровождается существенным уменьшением высоты крипт, снижением клеточной пролиферации и окружности крипт эпителия тонкой и толстой кишки ($p < 0,05$). Молекулярный диапазон и вязкость полимеров влияют на морфологическую картину кишки [69]. Такие находки указывают на низкую токсичность полимера наряду с противоопухолевым действием.

Японские ученые [70] опубликовали результат исследования эффекта действия хитозана на функцию почек у больных с хронической почечной недостаточностью. Были исследованы 80 пациентов, страдающих почечной недоста-

точностью. Больные принимали таблетки хитозана весом по 1350 мг три раза в день. Результаты выявили уменьшение холестерина с 10,1 до 5,8 мМ, увеличение гемоглобина с 58,2 до 68 г/л, существенное уменьшение уровня мочевины и креатинина в сыворотке крови после четырех недель употребления хитозана. Чувство физической силы, аппетита и сна значительно улучшалось после 12-й недели употребления препарата.

В работе [71] использовали покрытую хитозаном диальдегидцеллюлозу в качестве энтеросорбента на модели гломерулонефрита. Исследование проводилось на крысах, получавших в качестве добавки к диете 10% диальдегидцеллюлозы в течение девяти дней. Результаты исследования показали уменьшение белка в моче, остаточного азота и мочевины крови до нормальных цифр к 8-9 дню с одновременным увеличением выведения азота с каловыми массами. Увеличение содержания воды в экскрементах авторы связывают с выведением первичной мочи из сосудистого русла в просвет кишки.

Анализ изучения компенсаторных возможностей ЖКТ в выведении уремических токсинов из организма в условиях острого уремического синдрома при проведении интенсивного кишечного диализа гелевой формой мелкодисперсного хитозана еще раз подтвердил перспективность применения этого класса сорбентов. В связи с этим автором проведено экспериментальное моделирование уремии на белых крысах линии Wistar массой 180-200 г. Уремический синдром развивался после двухстороннего изолированного удаления почек через лапаротомический разрез под нейролептанальгезией (внутрибрюшинное введение кетамина). В послеоперационном периоде животные получали через желудочный зонд 2%-ные гели контрольных и опытных матриц энтеросорбентов в объеме по 1 мл через каждые три часа. В качестве контрольных энтеросорбентов применялись сефадексы G-25 и G-200 (сшитые декстраны) и микрокристаллическая карбоксиметилцеллюлоза. В качестве опытных матриц энтеросорбентов использованы гели мелкодисперсного хитозана с ММ 10-200 кДа и CD = 75-95%. Выведение животных из эксперимента проводилось в терминальный период. Результаты показали, что постоянный энтеродиализ увеличивает выживаемость крыс. Лучший результат отмечен при использовании мелкодисперсного хитозана ММ 180-200 кДа и CD = 75%, хотя положительный эффект оказывали все использованные образцы полимера. Выживаемость в этой группе животных составила $93,5 \pm 0,8$ ч и сопровождалось улучшением общего состояния экспериментального животного. Контрольные животные, не получавшие энтеросорбенты, выживали только в течение $47,2 \pm 0,30$ ч.

Анализ метаболических нарушений при развитии аренального синдрома проведен на 63 крысах популяции Вистар. Первую группу составили интактные животные (контроль 1), во второй группе находились крысы с двухсторонним изолированным удалением почек, не получавшие энтеросорбенты (контроль 2). В третью (опытную) группу животных входили крысы, получавшие хитозан с ММ 180-200 кДа и CD = 75% в раннем послеоперационном периоде по 1 мл через каждые три часа. Выведение животных из эксперимента осуществлялось через 8, 16, 24 и 48 ч. Оценивали биохимические показатели сыворотки крови и центрифугата химуса тонкой кишки: мочевина, креатинин, общий белок, общий билирубин, калий, натрий, хлор. Проводили забор начального и конечного отделов тонкой и толстой кишки для качественного и цифрового компьютерного морфологического исследования.

Биохимический контроль терапии хитозаном представлен в табл. 9 и 10. Анализ данных показывает, что скорость нарастания синдрома интоксикации существенно ниже при добавлении в диету гелевой формы хитозана. Если при-

Таблица 9. Биохимическое исследование сыворотки крови в условии энтеросорбции хитозаном при синдроме экспериментальной уремии (л = 7)

Время уремии, ч	Группа серии животных	Мочевина, ммоль/л	Креатинин, мкмоль/л	Общий белок, г/л	Общий билирубин, мкмоль/л	Хлор, ммоль/л	Калий, ммоль/л	Натрий, ммоль/л
Сыворотка крови								
8	1	7,22 ± 0,21	0,91 ± 0,04	65,71 ± 0,14	2,35 ± 0,08	100,4 ± 0,86	4,78 ± 0,12	140,28 ± 0,91
	2	16,95 ± 0,19*	1,37 ± 0,03*	52,2 ± 0,09*	2,3 ± 0,16	84,85 ± 1,14*	7,02 ± 0,07*	133,7 ± 1,01*
	3	12,82 ± 0,06**	0,97 ± 0,005**	55,37 ± 0,14**	2,61 ± 0,05**	92 ± 0,48**	6,04 ± 0,04**	136 ± 0,48**
16	2	39,78 ± 0,19*	3,18 ± 0,02*	64,71 ± 0,12*	7,9 ± 0,62*	83,85 ± 0,7*	6,2 ± 0,1*	136 ± 0,84*
	3	32,77 ± 0,09**	2,26 ± 0,01**	53,7 ± 0,11**	6,8 ± 0,05**	72,28 ± 0,6**	8,15 ± 0,09**	129,85 ± 0,4**
24	2	48,82 ± 0,14*	4,45 ± 0,17*	54,4 ± 0,29*	7,05 ± 0,58*	80,7 ± 1,04*	9,27 ± 0,42*	133,5 ± 1,36*
	3	36,02 ± 0,1**	2,04 ± 0,08**	53,17 ± 0,08**	9,9 ± 0,04**	80,7 ± 0,71	9,02 ± 0,06**	132,57 ± 0,36**
48	2	59,45 ± 0,27*	5,34 ± 0,12*	64,64 ± 0,2*	13,11 ± 0,12*	77,4 ± 0,36*	7,7 ± 0,17*	133,4 ± 0,36*
	3	37,94 ± 0,09**	1,9 ± 0,05**	59,7 ± 0,06**	13,45 ± 0,13	76,8 ± 0,4**	8,45 ± 0,07**	129,85 ± 0,34**
Фильтрат химуса тонкой кишки								
8	1	3,95 ± 0,06	0,37 ± 0,01	Не определялся	7,2 ± 0,09	5,71 ± 0,68	5,85 ± 0,2	26,14 ± 0,55
	2	2,2 ± 0,11*	3,49 ± 0,14*		171,54 ± 0,2*	27,78 ± 0,27*	16,27 ± 0,11*	126,6 ± 0,71*
	3	1,32 ± 0,01**	1,7 ± 0,009**		831,14 ± 7,85**	10,22 ± 0,09**	8,02 ± 0,1**	28,27 ± 0,13**
16	2	4,1 ± 0,08	4,52 ± 0,14*		282,4 ± 0,18*	56,17 ± 0,55*	24,11 ± 0,18*	124,8 ± 0,13*
	3	7,09 ± 3,9**	2,36 ± 0,01**		1113,42 ± 1,34**	26,12 ± 0,13**	14,08 ± 0,12**	64,01 ± 0,09**
24	2	6,07 ± 0,07*	6,31 ± 0,07*		469,5 ± 1,8*	40,7 ± 0,74*	37,4 ± 0,9*	122,8 ± 1,07*
	3	2,74 ± 0,04**	4,15 ± 0,14**		1517,57 ± 7,8**	28,85 ± 0,2**	26,77 ± 0,11**	116,8 ± 0,4**
48	2	36,41 ± 0,22*	11,51 ± 0,14*		1311 ± 1,27*	34,6 ± 0,37*	30,2 ± 0,35*	101 ± 0,53*
	3	6,32 ± 0,1**	5,27 ± 0,11**		1223,34 ± 1,01**	72,34 ± 40,77**	31,27 ± 0,14**	120,8 ± 0,26**

*-достоверно для $p < 0,01-0,001$ относительно контроля (группа 1). **-достоверно для $p < 0,05-0,01$ относительно контроля (группа 2).

Примечание: 1 группа - интактные крысы. 2 группа - крысы с двухсторонним изолированным удалением почек, не получавшие хитозан. 3 группа - крысы, получавшие хитозан с ММ 180-200 кДа и CD *= 75%

нять уровни метаболитов в группе 2 за 100%, то в группе 3 нарастание мочевины в сыворотке крови через 8 ч заболевания составляет только 75%, через 16 ч - 82%, через 24 ч - 73%, через 48 ч - 63%.

Подобная динамика имеет отношение и к уровню креатинина. Присутствие в кишке гелевого хитозана обеспечивает снижение темпа нарастания уровня билирубина на 14%. Как показывают исследования, основные события при энтеросорбции развиваются в кишечной полости. Хитозановая мембрана, формирующаяся на слизистом покрове кишки, создает значительные концентрации токсических метаболитов в кишечном фильтрате. Если в норме уровень мочевины в экскрементах низкий или не регистрируется [72], то при развитии заболевания он возрастает в 9,2 раза, уровень креатинина - в 31 раз, общий билирубин - в 182 раза.

Формирование хитозановой пленки на эпителиальном покрове слизистой оболочки тонкой кишки позволяет существенно задерживать рост уровней указанных метаболитов на 24 ч. Формирование мощного градиента концентрации билирубина по сравнению с уровнем в сыворотке крови может быть объяснен с двух позиций: во-первых, мощным желчегонным эффектом (усиленная работа гладкой мускулатуры внепеченочных желчных протоков и тонкой кишки, что всегда характерно при действии продуктов целлюлозы, и массивное поступление метаболита с желчью в результате лавинной гибели печеночных клеток, а во-вторых, активным комплексообразованием полимера-поликатиона с билирубином-анионом на основе, прежде всего, электростатических взаимодействий.

Сравнительный анализ электролитов в сыворотке крови и фильтрате химуса тонкой кишки указывает на их активный транспорт через ее стенку, создаваемый хитозановой мембраной, выстилающей эпителиальный покров. Таким образом, желудочно-кишечный тракт в условиях мочевого интоксикации выполняет роль выделительной системы, а хитозан выполняет роль активной дополнительной мембраны, организующей усиленный транспорт через эпителиальный покров кишечной трубки. Кроме того, хитозановый гель формирует барьер ретроградного потока электролитов в сосудистое русло. В случае введения хитозана в кишку активно связываются электролиты, которые удерживаются в жесткой цепи полимера. Однако паралитическая кишечная непроходимость приводит к скоплению агрессивного химуса в ее просвете без признаков дренирования и доступности свежих порций полимера. Такое обстоятельство к 48-му часу становится причиной начала стадии декомпенсации.

Таким образом, программированный энтеродиализ хитозаном в условиях мочевого интоксикации способен продлевать стадию компенсации на 100% в результате существенного перераспределения агрессивных компонентов метаболизма между периферической кровью и шоковой кишкой. Отсутствие условий активного дренирования агрессивной среды из кишечной трубки не позволяет увеличивать стадию компенсации.

Известно, что двухстороннее изолированное удаление почек в эксперименте сопровождается увеличением эндогенной интоксикации и развитием воспаления кишки. Морфологическая картина ярко проявляется, главным образом, в ее слизистой оболочке. Эти изменения ведут к расстройству функций органа: двигательной, всасывательной, выделительной, секреторно-пищеварительной. При микроскопическом исследовании срезов тонкой кишки во второй группе животных подтверждается кровенаполнение, отек слизистой оболочки, отслаивание эпителиального покрова, регистрируются поверхностные некрозы слизистой оболочки, обнаруживается увеличение числа клеток бокаловидного эпителия,

содержащих большое количество слизи. Повреждение слизистой оболочки соответствует высокому уровню мочевины в кишечном содержимом и высокой концентрации углекислого аммония - прямых ингредиентов, вызывающих раздражение и некроз [73]. При нарастании процесса эндогенной интоксикации воспаление может не ограничиваться слизистой оболочкой, нередко в подслизистом слое виден отек, расширенные и переполненные кровью сосуды, околосоудистые лимфо-лейкоцитарные инфильтраты, лимфоидные фолликулы. В мышечных слоях наблюдается воспалительный отек, гиперплазия миоцитов и инфильтрация мелкими клетками лимфоидного типа, реже лейкоцитами. Воспалительный процесс может иногда распространяться до серозной оболочки [74]. Развивается клиника катарального острого энтероколита. При сравнительном анализе морфологических срезов тонкого и толстого отделов кишки в группе, получавшей гелевый хитозан, отмечается сохранение слизистой оболочки, выражающееся в наличии зон регенерации клеток эпителия слизистой оболочки, снижение количества бокаловидных клеток. В подслизистом слое сохраняется умеренно выраженный отек и преобладающее количество эозинофилов над лейкоцитами.

Таким образом, основной механизм детоксикации хитозана проявляется, с одной стороны, в адгезии полимера к слизистой оболочке и образовании надежного барьера профузной проницаемости кишечной стенки при ее остром воспалении, с другой - в активной абсорбции из сосудистого русла и кишечного химуса токсических метаболитов. Длительное надежное пристеночное дренирование кишечной стенки является определяющим в характере воспалительной реакции. В результате таких воздействий кишечная стенка выполняет роль избирательной полупроницаемой мембраны, обеспечивающей продолжительную компенсацию нарушенного метаболизма.

ДЕСТРУКТИВНАЯ ФОРМА ВОСПАЛЕНИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Тяжесть состояния и значительное число неблагоприятных исходов при деструктивных формах острого панкреатита в значительной степени связаны с развитием эндогенной интоксикации, обусловленной ферментной токсемией, продуктами тканевого распада поджелудочной железы и окружающей клетчатки, биологическими веществами различной природы [75, 76]. В последние годы для борьбы с токсемией при остром панкреатите начали успешно применять сорбционные методы детоксикации. Использование метода экстракорпоральной гемосорбции позволило снизить летальность [77]. В этой связи основными принципами современной интенсивной терапии являются воздействия, направленные на снижение функциональной активности поджелудочной железы и коррекцию нарушений газообмена и гемодинамики, а также выведение агрессивных метаболитов. Проведение сеансов экстракорпоральной гемосорбции снижает уровень эндогенной интоксикации, стимулирует гемопоэз, иммунную систему, улучшает микроциркуляцию [78]. Однако известные недостатки этого метода ограничивают его широкое применение. Сорбционный эффект гемокарбоперфузии не может использоваться постоянно. В связи с этим заслуживает внимание метод энтеросорбции.

Длительное применение энтеросорбентов пролонгирует детоксикационный эффект. Предварительная оценка эффективности энтеросорбции при остром панкреатите в опытах на животных была получена рядом авторов при использовании четырех сорбентов: ваулена, хитина, энтеродеза и полифепана. Сеансы эн-

теросорбции продемонстрировали положительное терапевтическое действие. Ваулен и полифепан снижали активность липазы, хитин и энтеродез приводили к уменьшению в крови молекул дезинтегрированных структур (молекул средней массы), обладающих токсическими свойствами [57]. Ваулен имеет большую пористость и сорбционную емкость для широкого спектра веществ с различной молекулярной массой [79]. В этой связи объяснимы попытки сорбции полипептидов, включая ферменты, и других компонентов кишечного содержимого.

Ранее в экспериментальных и клинических исследованиях было показано, что в содержимом двенадцатиперстной кишки при остром панкреатите увеличивается количество активированных ферментов поджелудочной железы, компонентов калликреин-кининовой системы и других биологически активных веществ, обладающих выраженными токсическими свойствами. Они во многом обуславливают тяжесть эндогенной интоксикации [80, 81]. Исследованиями установлено, что количество молекул средней массы в дуоденальном содержимом при остром панкреатите превышает их значение по сравнению с исходными данными, что является результатом повышения катаболизма белка с образованием избыточного количества продуктов белковой деградации. Следовательно, содержимое тонкой кишки является источником интоксикации при остром панкреатите и его следует элиминировать. В опытах *in vitro* установлено, что энтеросорбенты снижают концентрацию липазы, амилазы, трипсина, соответственно на 5, 15 и 19% для полифепана (соответственно, на 80, 13 и 27% - для ваулена) [57]. При тяжелых формах панкреатита и сеансах энтеросорбции основные события детоксикации происходят в двенадцатиперстной кишке.

Известно, что мукоадгезивный эффект хитозана формирует эффект перфузии через эпителиальный слой клеток. Если контакт хитозана с эпителиальными клетками происходит непосредственно без прослойки компонента слизи, то эффект абсорбции веществ, включая и плохо растворимые субстанции, становится высоким. Слой слизи выполняет барьерную функцию. Степень деацетилирования и величина молекулярной массы полимера играют существенную роль в активности направленного транспорта веществ [82]. Установлено, что ^{14}C -маннитол и ^{14}C -полиэтиленгликоль усиленно проникают через монослой клеток кишечного эпителия в сторону хитозана. Градиент проницаемости в сторону гидрохлорида хитозана возрастает в 34 раза, глутамата хитозана - в 25 раз, N-триметилхитозан хлорида - в 11 раз. При повышении концентрации полимера проницаемость веществ увеличивается.

Выявлено, что процесс проницаемости заключается в открытии плотных межклеточных контактов, что существенно усиливает околочлеточный транспорт. Важными факторами является заряд и плотность полимера, структура хитозана и его производные. Эти физико-химические свойства определяют эффективность абсорбции. При повышении степени положительного заряда в полимере усиливается проницаемость гидрофильных макромолекул, таких как полипептиды и белки [83-86]. Использование N-триметилхитозан хлорида с разной степенью деацетилирования (20, 40 и 60%) показало, что полимер с низкой степенью деацетилирования является неэффективным абсорбентом и не изменяет величину околочлеточного транспорта, например, декстрана. Повышение степени деацетилирования до 40-60% приводит к росту транспорта мембрано-проникающей флюоресцентной метки (визуализация состояния клеточных ядер с помощью красного декстрана ММ 10 кДа) [87]. Усиление транспорта сопровождается открытием плотного контакта клеток кишечного эпителия. Вместе с транспортом белков и пептидов в направлении полимера обеспечивается перенос веществ, состоящих с пептидами в комплексе. Кроме того, усиление аб-

сорбции гидрофильных веществ через эпителиальный слой кишки зависит от pH среды. При $\text{pH} < 7$ в присутствии гидрохлорида или глутамата хитозана активная трансэпителиальная абсорбция веществ происходит в верхних отделах тонкой кишки. При увеличении pH среды интенсивность абсорбции смещается в нижний отдел тонкой кишки и толстую кишку [88]. Увеличение степени деацетилирования хитозана до 85-99% еще больше усиливает околоклеточный транспорт и эффект абсорбции веществ. В этих условиях высокая абсорбция сочетается с низкой токсичностью [89]. Во всех случаях увеличение концентрации полимера в тонкой кишке приводит к повышению проницаемости эпителия [90]. Кроме того, установлено, что 1% гель N-триметилхитозанхлорида при введении в двенадцатиперстную кишку существенно повышает биодоступность пептидов в кишечном тракте крыс Wislar.

Проницаемость пептидов зависит от модификации полимера, например, от степени триметилирования. Введение пептида в кишку вместе с хитозаном увеличивает его проницаемость с 0,8 до 6-13% [91]. Это может иметь важное значение в механизмах детоксикации, когда в свободной брюшной полости при развитии деструктивных форм панкреатита скапливается достаточно большая масса агрессивных ферментов и остатков белковых молекул. При этом обратный транспорт пептидов через эпителиальный покров слизистой оболочки кишки в сторону заряженного хитозана будет сопровождаться перераспределением и связыванием токсического материала. Кроме того, рост биодоступности пептидов в комплексе с хитозаном, например, активированных ферментов может проявляться по отношению к своим субстратам, а это будет приводить к падению уровня их активности, что весьма важно при состоянии функционального застоя пищевых масс в просвете двенадцатиперстной кишки, сопровождающего деструктивное воспаление поджелудочной железы.

В публикациях отсутствуют работы, демонстрирующие сорбционные свойства низкомолекулярного хитозана в двенадцатиперстной кишке при деструктивных формах воспаления поджелудочной железы. Поэтому были проведены серии опытов *in vitro*, в которых оценена динамика активности ферментов дуоденального содержимого при контакте с 2% коллоидным хитозаном с ММ 10 кДа и СД = 95% (препарат "Амидан", НИИ ФХМ МЗ РФ). Результаты исследований представлены в табл. 10.

Стеновая сорбция контрольной матрицей выявляет уровни активности амилазы, слабо превышающие исходную. Это указывает на неспецифичность сорбции и дезагглютирование молекул этого фермента в реакции с субстратом (обнажение активных центров). Сорбция липазы и трипсина не происходит. Инкубирование химуса тонкой кишки с хитозановым гелем приводит к иммобилизации всех ферментов поджелудочной железы на полимере. Существенное значение имеет доля полимера в кишечном химусе. Максимально эффективная сорбция регистрируется при соотношении химуса и хитозана 1:1.

Таким образом, использование препарата "Амидан" в сеансах энтеросорбции при деструктивных формах панкреатита сопровождается существенным извлечением активных ферментов из двенадцатиперстной кишки. Скорость и уровень извлечения метаболитов зависят от концентрации и объема полимера.

В клинической практике введение гелевой формы хитозана (СД = 75%, ММ 180-200 кДа) через дуоденальный зонд пациентам с тяжелыми формами воспаления поджелудочной железы и компенсированным застоем в кишке приводит к ликвидации дуоденостаза, а у больных с субкомпенсированным и декомпенсированным дуоденальным стазом хитозан снижает давление в кишке на $80 \pm 5,7$ мм вод. ст. Снижение степени застоя в двенадцатиперстной кишке при

Таблица 10. Стендовая сорбция препаратом "Амидан" содержимого двенадцатиперстной кишки

Ферменты химуса	Норма	До сорбции	Время сорбции, мин			
			15	30	60	120
Соотношение химуса и хитозана 1:1						
Амилаза, г. (ч · л)	58,1	301,4	300,3	295,1	285,4	250,3
Липаза, %	6,01	54,3	52,1	51,4	45,4	43,1
Трипсин, нм (с · л)	570,5	890,4	871,3	870,1	820,3	800,5
Соотношение химуса и хитозана 2:1						
Амилаза, г. (ч · л)			301,1	300,0	299,1	290,4
Липаза, %			53,1	51,3	51,0	48,3
Трипсин, нм (с · л)			889,3	880,8	877,1	874,3
Соотношение химуса и хитозана 5:1						
Амилаза, г. (ч · л)			300,9	300,7	300,0	300,0
Липаза, %			54,3	54,0	53,1	52,1
Трипсин, нм (с · л)			889,9	889,1	888,0	887,1
Контрольная матрица сефадекс G-25						
Амилаза, г. (ч · л)			305,1	304,3	303,8	302,9
Липаза, %			53,8	53,3	53,0	52,2
Трипсин, нм (с · л)			899,3	897,8	891,9	889,9

тяжелом воспалительном процессе имеет первостепенное значение в прогрессировании заболевания. Больные с некупированным декомпенсированным дуоденостазом имеют высокий риск перехода отечных форм панкреатита в панкреонекроз.

Введение гелевого хитозана в двенадцатиперстную кишку можно включать в комплексную терапию у больных с острым панкреатитом для ликвидации или коррекции дуоденостаза как одного из патогенетических факторов развития острого панкреатита.

Развитие научного направления, посвященного роли хитозановых продуктов в регулировании и ликвидации гнойно-воспалительных заболеваний органов и тканей брюшной полости, является актуальным и обнадеживающим. Быстрый и положительный эффект, возникающий при внесении хитозановых гелей на слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта при тяжелых состояниях, сопровождающихся формированием шоковых органов и тканей, служит прочным основанием для широкого изучения и применения производных этого полимера в хирургической и терапевтической медицинской практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляков И.Л., Горайнов Г.И., Соломенников А.В. и др. //Тез. докл. IV Респ. конф. "Сорбенты медицинского назначения и механизмы их лечебного действия". Донецк, 1988. С. 5-6.
2. Suzuki K., Tokojo A., Okawa Y., Suzuki S. // Chem. Pharm. Bull. 1985. V. 20. P. 1359-1372.
3. Nishimura K., Nishimura S., Nishi N. et al. // Vaccine. 1984. V. 2. P. 93-99.

4. Nishimura K., Nishimura S., Nishi N. et al. // In: Chitin in nature and technology. Plenum press. N.-Y. - London, 1986. P. 477-483.
5. Nishimura K., Ishihara C., Ueki S. et al. // Vaccine. 1986. V. 4. P. 151-156.
6. Tolstikova T.G., Voevoda T.V., Masysheva V.I. et al. // Dokl. Akad. Nauk. 1996. V. 350. № 4. P. 557-559.
7. Nishimura K., Nishimura S., Nishi N. et al. Chitin in nature and technology N.-York - L.: Plenum press, 1986. P. 477-483.
8. Krapczyk J., Krowczynski L., Marchut E. et al. Chitin and chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. L.-N.-Y., 1990. P. 605-616.
9. Koyano T., Minoura N., Nagura M., Kobayashi K. // J. Biomed. Mater. Res. 1998. V. 5. № 39(3). P. 486-490.
10. Mori T., Okumura M., Matsuura M. et al. // Biomaterials. 1997. V. 18. N 13. P. 947-951.
11. Sapozhnikov A.M., Galaktionov V.G., Khromykh L.M., Senchenkov Ye.P. // Biophysics. 1984. V. 29. P. 300-304.
12. Krapczyk J., Krowczynski L., Marchut E. et al. // In: Chitin and chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. L.-N.-Y. 1990. P. 605-616.
13. Скворцов В.Ю., Мастерняк Т.В., Кирилина Е.А., Молодцов Н.В. // Иммунология. 1985. № 5. С. 79-80.
14. Suzuki S., Okawa Y., Okura Y. et al. // Proceedings second intern. conf. on chitin and chitosan. Sapporo, 1982. P. 210-212.
15. Большаков И.Н., Насибов С.М. // Материалы пятой конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. С. 175-178.
16. Большаков И.Н. // Тез. II Всеросс. науч. конф. Гомеостаз и инфекционный процесс. Саратов, 1998. С. 13.
17. Большаков И.Н. // Там же. С. 12.
18. Большаков И.Н. // Там же. С. 13.
19. А.с. 1756822. СССР. G01 N33/49.
20. Большаков И.Н. // Тез. II Всеросс. науч. конф. "Гомеостаз и инфекционный процесс". Саратов, 1998. С. 13.
21. Москаленко Т.М., Шепель Т.А., Сахарова Т.Г. // Тез. докл. IV Всеросс. конф. "Производство и применение хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1995. С. 17-18.
22. Максимов В.И., Виха Г.В., Полетаева О.А. и др. // Там же. С. 44-46.
23. Максимов В.И., Максимова Е.В., Родоман В.Е. // Там же. С. 587-590.
24. Kochkina Z.M., Pospeshny G., Chirkov S.N. // Mikrobiologiya. 1995. V. 64. N 2. P. 211-215.
25. Ведерников Ю.Н., Егоров А.Н., Бронова Н.Ф. и др. // Тез. Четвертой Всеросс. конф. "Производство и применение хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1995. С. 46-49.
26. Malette W.G., Quigley H.J., Gaines R.D. et al. // Ann. Thorac. Surg. 1983. V. 36. P. 55-58.
27. Olsen R., Schwartzmiller D., Weppner W., Winandy R. // Chitin and chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications / Ed. G. SKjÅK-BrÆK, T. Anthonsen, P. Sandford. L. New York: Elsevier Applied science, 1990. P. 813-828.
28. Evan E.E., Kent S.P. // J. Histochem. Cytochem. 1962. V. 10. P. 24-28.
29. Velichkov A.D., Nikolova S.F., Veljanov U.K. // C.R. Acad. Bulg. Sci. 1989. V. 42. N 6. P. 97-100.
30. Velichkov A.D., Nikolova S.F., Veljanov D.K. // C.R. Acad. Bulg. Sci. 1989. V. 42. N 3. P. 81-84.
31. Caroli J., Platteborse R. // Sem. Hop. (Paris), 1958. V. 34. P. 472-487.
32. Крафт Л.А., Гартман О.Р., Костюченко А.Г. и др. // Материалы Пятой конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. С. 154.
33. Большаков И.Н., Насибов С.М. // Там же. С. 120-122.
34. Радзивил Г.Г., Змызгова А.В., Мусаров А.Л. и др. Сорбционные методы детоксикации и иммунокоррекции в медицине. Харьков, 1982. 284 с.
35. Liehr H., Grun M., Brunswig D. // Acta hepatogastroenterol. 1976. V. 23. P. 235-240.
36. Olson N.C., Salter W.L., Mc Call C.E. // Molec. Aspects med. 1988. V. 10. P. 511-629.
37. Williams Z., Hertogs C.F., Pluznik D.H. // Infect. Immun. 1983. V. 43. P. 1-5.
38. Кулаев Г.К., Кузнецов В.Н., Шишкин А.В. Респ. сб. науч. тр. "Актуальные вопросы экстракорпоральной детоксикации организма. М: МОНИКИ, 1987. С. 30-33.
39. Waage A. // Clin. Immunol. Immunopathol. 1987. V. 45. P. 348-355.
40. Xiang-nan D., Zhen N., Guo-zheng Z., Zong-ming L. // Biomat art. Cells, art. Org. 1987. V. 15. N 1. P. 229-235.
41. Большаков И.Н., Насибов С.М. // Материалы Пятой конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. С. 120-122.

42. Гельфанд Б.Р., Филимонов М.И., Юсуфов О.Т. и др. // Анестезиология и реаниматология. 1997. № 3. С. 34-36.
43. Кулаев Д.В., Насибов С.М., Сергеева Н.А. и др. // Тез. докл. Междунар. симп. "Энтеральные детоксикации". СПб.: МАПО, 1994. С. 16-18.
44. Иестеренко В.С., Насибов С.М., Будагов Р.С., Кулаев Д.В. // Экспериментальная клиническая фармакология. 1994. № 6. С. 59-61.
45. Hirano S., Noishiki Y., Kinugawa J. et al. // Advances in biomedical polymer. 1987. V. 35. P. 285-297.
46. Hirano S. // Chitin and chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications / Ed. G.SkjAK-Br/EK, T. Anthonsen, P. Sandford. L., N.Y.: Elsevier Applied Science, 1990. P. 37-43.
47. Sandford P.A. Там же. P. 51-70.
48. Allan G.G., Altman L.C., Bensinger R.E. // Chitin, chitosan and related enzymes. Orlando.: Acad. press inc. 1984. P. 119-134.
49. Pat. Kokai. 60 142927 Jap. A61K47/00, A61F13/00.
50. Насибов С.М., Большаков И.Н., Кулаев Д.В. // Материалы Третьей Всесоюз. конф. "Совершенствование производства хитина и хитозана из панцирьсодержащих отходов крыля и пути их использования". М.: ВНИРО. 1992. С. 63-71.
51. Kendra D.F., Hadwiger L.A. // Exp. Mycol. 1984. V. 8. P. 276.
52. Yeda T., Hidaka H. // Jap. Fudo Saiensu. 1988. V. 27. P. 56.
53. Velichkov A.D., Nikolova S.F. // C.R. Acad. Bulg. Sci. 1989. V. 42. N 3. P. 81.
54. Большаков И.Н. Экстракорпоральная и корпоральная иммуно-аффинная сорбция при экспериментальном разлитом остром перитоните. Дисс. ... докт. мед. наук. М.: НИИ ФХМ, 1992. 463 с.
55. Шостка Г.Д., Рябов С.И., Лукичев Б.Г. и др. // Терапевтический архив. 1984. Т. LVI, № 7. С. 58-63.
56. Burnell J.M., Villamil M.E., Uyeno B.T., Schribner B.H. // J. Clin. Invest. 1956. V. 35. P. 935-940.
57. Энтеросорбция. / Под ред. Н.А. Белякова. Л.: Машиностроение, 1991. 336 с.
58. He P., Davis S.S. and Ilium L. // Int. J. Pharm. 1998. V. 166. P. 75-88.
59. Ilium L., Farraj N.F. and Davis S.S. // Pharm. Res. 1994. V. 11. P. 1186-1189.
60. Delie F. and Rubas W. // Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst. 1997. V. 14. P. 221-286.
61. Kotze A.T., Thanou M.M., LueBen H.L. et al. // J. Pharm. Sci. 1999. V. 88. P. 253-257.
62. Kotze A.T., Luessen H.L., de Leeuw B.J. et al. // Pharm. Res. 1997. V. 14. N 9. P. 1197-1202.
63. Patel D., Smith J.R., Smith A.W. et al. // Int. J. Pharm. 2000. V. 200. N 2. P. 271-277.
64. Tengamnuay P., Sahamethapat A., Sailasuta A., Mitra A.K. // Int. J. Pharm. 2000. V. 197. N1-2. P. 53-67.
65. Schipper N.G., Olsson S., Hoogstraate J.A. et al. // Pharm. Res. 1997. V. 14. N 7. P. 923-929.
66. Wang J., Qian Y. // Chemosphere. 1999. V. 38. N 13. P. 3109-3117.
67. Aspden T.J., Mason J.D., Jones N.S. et al. // J. Pharm. Sci. 1997. V. 86. N 4. P. 509-513.
68. Venkatesh S., Smith T.J. // Biotechnol. Appl. Biochem. 1998. V. 27. N(Pt 3). P. 265-267.
69. Torzsas T.L., Kendall C.W., Sugano M. et al. // Food. Chem.Toxicol. 1996. V. 34. N 1. P. 73-77.
70. Ling S.B., Li L., Ji D. et al. // J. Pharm. Pharmacol. 1997. V. 49. N 7. P. 721-723.
71. Yagi M., Kato S., Nishitoba T. et al. // Nephron. 1998. V. 78. N 4. P. 433-439.
72. Wrong O.M., Vince A. // Proc. Nutr. Soc. 1984. V. 43, N 1. P. 77-86.
73. Амбурже Ж., Рише Г., Функ-Брентано Ж.П. Почечная недостаточность. - М.: Медицина, 1965. 158 с.
74. Патологическая анатомия болезней органов пищеварения. / Под ред. акад. А.И. Абрикосова. М.: Медгиз., 1957. Т. 2. 636 с.
75. Кондрашов В.Ф., Чепкасов В.В. Сочетание плазмафереза и гипербарической оксигенации при деструктивных формах панкреатита / Под ред. проф. А.М. Сазонова и проф. Л.А. Эндера. М.: МОНИКИ, 1987. 128 с.
76. Панченков Р.Т., Выренков Ю.Е., Ярема И.В., Уртаев Б.М. Лимфосорбция. М.: Медицина, 1982. 240 с.
77. Лопухин Ю.М., Молоденков М.Н. Гемосорбция. М.: Медицина, 1985. 288 с.
78. Беляков Н.А., Шугаев А.М., Мусатайхов Х.Т. и др. // Вестн. хирургии. 1987. №6. С. 29-31.
79. Портной О.А., Николаев В.Т., Фридман Л.И. // Хим.-фарм. журнал. 1983. № 12. С. 34-38.
80. Лебедев Н.Н., Черкезова-Кининова Е.Р. Патологическая физиология пищеварительной системы при экспериментальном панкреатите. М.: Медицина, 1979. 200 с.
81. Evander A., Helelstrom E., Hultberg B., Xlise J. // Digestion. 1982. V. 24. N 3. P. 159-167.

82. *Schipper N.G., Varum K.M., Stenberg P.* et al. // Eur. J. Pharm. Sci. 1999. V. 8. N 4. P. 335-343.
83. *Kotze A.F., Luessen H.L., de Leeuw B.J.* et al. // J. Controlled. Release. 1998. V. 51. N 1. P. 35-46.
84. *Kotze A.F., Thanou M.M., Luessen H.L.* et al. // Eur. J. Pharm. Biopharm. 1999. V. 47. N 3. P. 269-274.
85. *Natsume H., Iwata S., Ohtake K.* et al. // Int. J. Pharm. 1999. V. 185. N 1. P. 1-12.
86. *Thanou M.M., Kotze A.F., Scharringhausen T.* et al. // J. Controlled. Release. 2000. V. 64. N 1-3. P. 15-25.
87. *Thanou M.M., Verhoef J.C., Romeijn S.G.* et al. // Int. J. Pharm. 1999. V. 185. N 1. P. 73-82.
88. *Kotze A.F., Luessen H.L., de-Boer A.G.* et al. // Eur. J. Pharm. Sci. 1999. V. 7. N 2. P. 145-151.
89. *Schipper N.G., Varum K.M., Artursson P.* // Pharm. Res. 1996. V.13. N 11. P. 1686-1692.
90. *Thanou M., Verhoef J.C., Marbach P., Junginger H.E.* // J. Pharm. Sci. 2000. V. 89. N 7. P. 951-957.
91. *Thanou M., Florea B.I., Langemeyer M.W.* et al. // Pharm. Res. 2000. V. 17. N 1. P. 27-31.

АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ АКТИВНОСТЬ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА

Н.Н. Дрозд, В.А. Макаров

Гематологический Научный Центр РАМН, Москва
drozd@vigg.ru

ОТНОШЕНИЕ АКТИВНОСТЬ-СТРУКТУРА В ПОЯВЛЕНИИ АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ АКТИВНОСТИ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ

На протяжении нескольких десятилетий в клинической практике для профилактики и лечения тромботических состояний используется гепарин [1]. Однако в связи с развитием побочных эффектов в результате применения гепарина, проводится поиск альтернативных антикоагулянтов прямого действия, замедляющих свертывание крови и препятствующих возникновению тромбов. Наличие полисахаридов в тканях животных и растений, их низкая токсичность позволяют рассматривать именно данный класс биополимеров как наиболее перспективный для разработки лекарственных средств с антикоагулянтной активностью.

Исходными веществами для синтеза гепариноидов служат такие резервные или структурные полисахариды, как декстраны, альгиновая кислота, пектин, целлюлоза, крахмал [2], гликоген фукан [3, 4]. С такой же целью используют гликозаминогликаны (ГАГ) - полисахариды, соединительной ткани, содержащие глюкозамин или галактозамин и отрицательно заряженные карбоксильные и сульфатные группы. Представители шести основных классов ГАГ (гиалуроновая кислота [5-7], хондроитин-4-сульфат - хондроитинсульфат А [8-10], хондроитин-6-сульфат - хондроитинсульфат С [8, 9], дерматансульфат [6, 9, 11, 12] - хондроитинсульфат В, кератансульфаты I и II, гепарансульфат [6, 8, 13] и гепарин [9]) интенсивно применяются в разработках аналогов гепарина. Кроме того, активно исследуются антикоагулянтные свойства синтетических полисахаридов - сульфатов пентозана [4, 5], бензиламида карбоксиметилдекстрана [9, 16-18], поли-(глюкозилоксиэтил метакрилата) [19]. Сульфатированные полисахариды, как природного, так и синтетического происхождения, обладают, как правило, широким спектром биологического действия, и проявляют наряду с антикоагулянтными, также антиромботические, противоязвенные, иммунодепрессивные и стимулирующие липолиз свойства.

Необходимым этапом в создании новых лекарственных средств является исследование взаимосвязи фармакологической активности и химической структуры. Известно, что важную роль в возникновении антикоагулянтной и антиромботической активностей играют молекулярная масса полимера и количество серы, приходящиеся на моно- или дисахаридную единицу. Способность гепарина ингибировать некоторые сериновые протеазы ферментативного каскада системы свертывающей крови осуществляется за счет плазменных ингибиторов, относящихся к классу серпинов (антитромбина III и кофактора II гепарина) и тесно коррелирует с молекулярным весом полисахарида [20-22].

Изменяя условия реакции сульфатирования можно получить полисахариды с различной степенью сульфатирования [23, 24, 1, 3]. С изменением степени сульфатирования и молекулярной массы у них появляются новые свойства. Так низкомолекулярный сульфат дерматана (Desmin 370) способен лизировать тромбы [6] за счет деградации ассоциированного в тромб фибрина.

Производные гиалуроновой кислоты (HyalS), по-разному сульфатированные и с различной молекулярной массой демонстрируют различия в ингибировании некоторых сериновых протеаз свертывающей системы крови [11, 25]. Активность антикоагулянта HyalS, тесно коррелирует со степенью сульфатирования макромолекулы и увеличивается с увеличением числа групп сульфатов на дисахаридную единицу. Низкомолекулярные образцы с высокой степенью сульфатирования ингибируют тромбин непосредственно аспецифическим взаимодействием и через кофактор II гепарина. Образцы с наибольшей молекулярной массой электростатически взаимодействуют с кофактором II гепарина. Увеличение ингибирования тромбина кофактором II гепарина в присутствии сульфатированных глизаминогликанов зависит от плотности заряда [17, 26-29]. Инактивация фактора Ха осуществляется комплексом гиалуроновой кислоты с антитромбином III.

Сульфатированные гиалуроновые кислоты [30-32] приобретают новую биологическую активность (ингибирование агрегации тромбоцитов, антикоагулянтный эффект, увеличение скорости роста эндотелиальных клеток) отличную от нативной молекулы [31, 33]. Кроме того, вследствие сульфатирования появляется стабильность молекулы гиалуроновой кислоты, которая ведет к увеличению периода полураспада [33].

Протеогликаны и гепарин в том числе, играют важную роль в ангиогенезе и васкуляризации, являясь низкоаффинными рецепторами для индукторов ангиогенеза, таких как основной фактор роста фибробластов, фактор-А роста сосудистого эндотелия и бета фактор роста трансформации [34-37] и модуляторами адгезии и миграции эндотелиальных клеток [38, 39]. Известно, что помимо сульфатирования к усилению антикоагулянтной активности некоторых полисахаридов приводит комплексование с медью. Некоторые авторы утверждают, что во взаимодействие с Си (II) вовлечены N-сульфат, O-сульфат, и карбоксильные группы [40, 41], другие установили участие только карбоксильных и ацетильных групп во взаимодействии с Си (II) [30]. В присутствии низкомолекулярных Сахаров клеточно-модуляционная активность гепарина зависит, прежде всего, от минимума внутримолекулярной плотности смежных анионных групп [42]. Все эти активности ассоциировались с образованием мультиионного комплекса между скоплениями анионных и катионных сайтов на комплексирующих молекулах.

Увеличение числа сульфатных групп, приходящихся на дисахаридную единицу, ведет к увеличению гепариноподобной активности различных ГАГ, даже если нет достаточных данных о положении этих групп в полисахаридной цепи; увеличение молекулярного веса отражается в росте способности непосредственно инактивировать сериновые протеазы [32].

С биохимической точки зрения антикоагулянтная эффективность ГАГ сопряжена с: 1) катализом ингибирования тромбина в плазме; 2) ингибированием генерации тромбина в контакт - активированной плазме; 3) способностью некоторых из них ингибировать активацию протромбина в контакт - активированной плазме; 4) способностью некоторых из них катализировать ингибирование фактора Ха в плазме [43-45]. Так нефракционированный гепарин, низкомолекулярные гепарины и сульфат гепарана осуществляют ингибирование активности тромбина (антикоагулянтный эффект) за счет плазменного ингибитора сериновых протеаз антитромбина III, а сульфат дерматана и полисульфат пентозана - за счет кофактора II гепарина [46]. Эффективность ингибирования тромбина связана со способностью ингибировать активацию протромбина. Физиологическим активатором протромбина является протромбиновый комплекс,

которому предшествует пре-протромбиновый комплекс (фактор V вместо фактора Va). Таким образом ингибирование активации фактора X, фактора V или Ca^{+2} -зависимого взаимодействия протромбина, фактора Ха, фактора Va с отрицательно заряженным фосфолипидом может в результате привести к ингибированию активации протромбина [47]. Низкомолекулярные гепарины, молекулы которых состоят на 25-50% из менее чем 18 сахаридных остатков, не способны связывать одновременно тромбин и антитромбин III, поэтому в меньшей степени ускоряют инактивацию тромбина в сравнении с ингибированием активированного фактора X [44, 46]. Основным структурным элементом, необходимым для проявления антикоагулянтной и антитромботической (ингибирование появления тромба) активностей нефракционированного гепарина является пентасакхарид, присутствующий и в некоторых низкомолекулярных гепаринах. Определяющим фактором для проявления антикоагулянтной и антитромботической активностей является степень сульфатирования. Причины, по которым высокосульфатированные нефракционированные гепарины с низким сродством к антитромбину III и полисульфат пентозана способны ингибировать активацию протромбина в нормальной плазме, заключены в связи с кофактором II гепарина и в ингибировании активации фактора V независимо от катализа ингибирования тромбина [47]. Сульфаты гепарана и дерматана, имеющие степень сульфатирования в два раза меньшую, чем низкомолекулярные гепарины и полисульфат пентозана, в меньшей степени способны ингибировать активацию протромбина и катализировать ингибирование тромбина в плазме [45]. Таким образом, очевидна необходимость наличия у антитромботического средства антитромбиновой активности и активности против активированного фактора X.

СВЯЗЬ СТРУКТУРЫ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА С АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Действие гепарина на систему свертывания крови моделируется практически любыми сульфированными полисахаридами, в том числе и производными хитозана [48, 49]. Хитозан - гликозаминогликан, легко получаемый деацетилированием хитина. Хитин является основным компонентом экзоскелета ракообразных. Сульфат хитозана (СХ) получают с помощью сульфатирования, например, хлорсульфоновой кислотой. Сульфат хитозана - гетерогенная смесь, состоящая из молекул с массой $1,5 \times 10^3$ - $3,0 \times 10^5$ Да и различной степенью сульфатирования. Хитозан - широко известный полисахарид с многочисленными и крайне важными биологическими свойствами: он улучшает заживления ран за счет ускорения пролиферации фибробластов, участвует в восстановлении хряща и кожи, является транспортным средством для доставки лекарств, в связи с биосовместимостью и всасыванием [50-78].

В наших исследованиях использованы образцы сульфата хитозана, полученные на кафедре технологии химических волокон Московского Государственного Текстильного Университета. Его некоторые структурные характеристики представлены в табл. 1. С целью разработки синтетического заменителя гепарина нами изучено противосвертывающее действие образцов СХ с ММ 20-123 кДа, степенью полимеризации 70-400 и степенью сульфатирования 0,62-1,86.

Антитромбиновую (alla) активность образцов полисульфата хитозана, гепарина и хиторина в системе *in vitro* оценивали по методу [78], основанному на способности прямых антикоагулянтов угнетать свертываемость рекальцифици-

Таблица 1. Структурные характеристики образцов сульфата хитозана

Номер образца СХ	ММ, кДа	Степень полимеризации	Содержание серы, %	Степень сульфатирования*
1	20	71	13,4	1,18
2	33	119	13,1	1,14
3	45	156	13,7	1,23
4	45	149	14,5	1,40
5	55	184	13,9	1,32
6	61	188	15,6	1,58
7	65	213	14,3	1,36
8	75	310	9,9	0,75
9	75	256	13,7	1,25
10	75	305	13,8	1,3
11	82	252	15,4	1,57
12	82	245	15,9	1,66
13	82	232	16,9	1,86
14	119	374	15,3	1,52
15	123	547	8,8	0,62
16	123	490	11,1	0,87

* В расчете на моносахаридный остаток.

Таблица 2. Антитромбиновая активность образцов сульфата хитозана по Фармакопейной статье

Номер образца СХ	aIIa, ед/мг	Номер образца СХ	aIIa, ед/мг
1	22,0 ± 1,0	9	35,0 ± 1,7
2	8,3 ± 0,2	10	20,0 ± 0,9
3	27,0 ± 1,5	11	24,0 ± 1,2
4	5,8 ± 0,3	12	37,0 ± 2,0
5	10,0 ± 0,3	13	30,0 ± 1,2
6	40,0 ± 2,3	14	3,0 ± 0,1
7	12,0 ± 0,4	15	0,5 ± 0
8	10,0 ± 0,4	16	0,6 ± 0

рованной плазмы овец, а также с помощью широко используемых с подобной целью коагулометрических тестов: активированное частичное тромбопластиновое время [79, 80], в котором определение $aIIa$ основано на способности прямых антикоагулянтов тормозить скорость образования факторов внутреннего пути свертывания; тромбиновое время [81], в котором определение $aIIa$ основано на инаktivации тромбина антитромбином-III в присутствии прямых антикоагулянтов. При определении $aIIa$ активности прямых антикоагулянтов с хромогенным субстратом на тромбин S-2288 [82], оптическую плотность растворов определяли на спектрофотометре при $\lambda = 405$ нм. Результаты калибровали по Международному стандарту гепарина. Определение антитромбиновой активности образцов СХ по Фармакопейной статье продемонстрировало (табл. 2), что наибольшей $aIIa$ активностью от 35 до 40 ед/мг обладают образцы под номерами 6, 9, 12.

Антитромбиновую активность образцов в системе *in vivo* рассчитывали на базе кривых выведения антикоагулянтов после внутривенного введения кроликам. В основу методики положено математическое описание действия гепарина, предложенное ранее [83, 84]. При этом исходили из того, что кинетика эли-

минации образцов СХ при внутривенном введении нелинейна, подобно наблюдаемой у гепарина:

$$C_t = C_0 \exp(-K_{el}t), \quad (1)$$

где C_t - концентрация СХ в момент времени t ; C_0 - концентрация СХ в момент введения; K_{el} - константа элиминации.

Второе допущение, предполагавшее экспериментальную проверку, состояло в линейном приближении зависимости антикоагулянтного эффекта от дозы СХ

$$T = K_t C_t + T_b, \quad (2)$$

где T - время образования сгустка в присутствии СХ; T_b - время образования сгустка в отсутствии СХ (до введения СХ); K_t - коэффициент пропорциональности.

Значение T оценивали в двух коагулотестах: активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) и времени свертывания крови (ВСК) [85]. Подставляя (2) в (1), получаем:

$$T - T_b = (T_0 - T_b) \exp(-K_{el}t),$$

или в логарифмической форме

$$\ln(T - T_b) = \ln(T_0 - T_b) - K_{el}t, \quad (3)$$

где T_0 - значение T при $C = C_0$. Здесь (3) - уравнение прямолинейной регрессии, где K_{el} - коэффициент регрессии, а $\ln(T_0 - T_b)$ - свободный член. Обе константы рассчитывались стандартными статистическими методами по программе регрессионного анализа. Время полувыведения образцов рассчитывали как

$$T_{1/2} = \ln 2 / K_{el}. \quad (4)$$

Время действия

$$t_a = K_{el}^{-1} \ln [T_0 - T_b / (\alpha - 1) T_b], \quad (5)$$

где α - заданное отношение T/T_b , характеризующее порог терапевтически значимой пролонгации T_b .

При $\alpha = 2$

$$t_2 = K_{el}^{-1} \ln (T_0 - T_b / T_b). \quad (6)$$

Суммарный антикоагулянтный эффект (5) - площадь под фармакодинамической кривой может быть рассчитана по формуле:

$$S = (T_0 - T_b) / K_{el}. \quad (7)$$

Величина вводимой дозы СХ связана с концентрацией антикоагулянта в плазме (C) через объем распределения препарата. Чтобы исключить из расчетов данный параметр, всюду, где речь шла о концентрации, подразумевали дозу. Подобная замена переменных отражалась только на K_t (см. (2))

$$K_t = (T_0 - T_b) V_d / DM, \quad (8)$$

где D - вводимая доза; M - молекулярная масса образца СХ; V_d - объем распределения.

Здесь K_t характеризует крутизну наклона спрямленного графика зависимости реакции T от дозы, которая зависит от чувствительности свертывающей си-

Таблица 3. Фармакокинетические параметры образцов СХ в тесте ВСК

Номер образца СХ	Доза, мг/кг	$K_{el} \cdot 10^{-2} \text{мин}^{-1}$	$T_{1/2}$, мин	T_0 , мин	T_2 , мин	A_2 , ед/мг
1	4	4,3	16,3	25	63	6
2	15	2,3	30,1	47	146	8,2
3	4	3,2	21,7	55	110	13
4	4	4,2	16,7	27	67	6,1
5	4	4,9	14,2	43	66	9,7
6	4	3,2	21,5	180	146	42
6	15	1,4	50,2	252	366	45
7	4	4,1	17	70	92	16
8	2	2,9	23,2	21	84	9
9	2	2,4	28,8	27	115	13
10	4	3,1	22,2	88	1128	21
11	4	2,5	27,7	63	146	15
12	4	1,9	36,9	215	260	52
13	15	1,9	37	173	250	30
14	4	4,7	14,8	8	30	2,1
14	15	1,7	41,8	21	150	3,5
15	15	5,7	12	4	9	0,5
16	15	2,4	29	5	28	0,6

Примечание. ВСК – время свертывания крови; T_b – 1,6 мин; T_0 – время свертывания крови в момент введения образца $C = C_0$; T_2 – время действия; K_{el} – константа элиминации; $T_{1/2}$ – период полужизни.

стемы к антикоагулянтному воздействию и удельной активности препарата

$$K_t = KA_2, \quad (9)$$

где K – константа пропорциональности, имеющая размерность $\text{мин}^2/\text{мг}^2$, характеризующая чувствительность свертывающей системы крови; A_2 – антитромбиновая активность (ед/мг).

Удельную антитромбиновую активность испытуемого образца СХ выражали по отношению к рабочему стандарту СХ, прокалбированному в единицах активности Международного стандарта гепарина. Предполагая чувствительность свертывающей системы к сравниваемым препаратам одинаковой, расчет антитромбиновой активности одного образца относительно другого сводится к вычислению отношения значений K .

$$A_2 = \left\{ [(T_{0t} - T_b)D_s] / [(T_{0s} - T_b)D_t] \right\} A_1, \quad (10)$$

где A – значение удельной антитромбиновой активности образцов СХ по Фармакопейной статье; T_0 – время образования сгустка в момент введения образца; T_{0s} – время образования сгустка в момент введения стандарта; D – доза образца; D_s – доза стандарта.

Оценивали антитромбиновую активность образцов СХ в системе *in vivo*. При внутривенном введении кроликам отмечается несовпадение величин специфической активности (табл. 3). Так, если образцы 6 и 12 сохранили свое "первенство" в антитромбиновой активности, то образец 9 продемонстрировал *alia* активность равную всего 13 ед/мг. Подобное может найти объяснение в том, что чувствительность плазмы овец и кроликов для последнего образца отличается от таковой для двух других образцов. Это связано с отличиями в структур-

Таблица 4. Сравнение констант выведения образцов СХ
при внутривенном введении в биоспецифичном электрофорезе (I)
и с помощью линейной фармакокинетической модели (II)
($m \pm Sx$; $n = 7$)

Номер образца СХ	$T_{1/2}$, мин		$K_{el} \cdot 10^{-2}$, мин ⁻¹	
	I	II	I	II
2	35,2 ± 3,7	30,1 ± 2,8	1,98 ± 0,35	2,30 ± 0,41
3	31,1 ± 4,3	28,8 ± 3,5	2,8 ± 0,3	3,2 ± 0,1
6	47,7 ± 3,3	50,2 ± 4,1	1,52 ± 0,27	1,38 ± 0,33
9	31,1 ± 4,3	28,8 ± 3,5	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,2
12	35,2 ± 3,7	36,9 ± 5,1	1,8 ± 0,3	1,9 ± 0,2
14	37,3 ± 5,2	41,8 ± 3,4	1,98 ± 0,15	1,66 ± 0,27
15	15,3 ± 4,5	12,5 ± 3,8	5,77 ± 0,11	5,74 ± 0,20
16	26,3 ± 4,8	29,0 ± 3,5	3,10 ± 0,11	2,35 ± 0,58

Примечание. K_{el} – константа элиминации; $T_{1/2}$ – период полувыведения.

Таблица 5. Изменение числа тромбоцитов в плазме кроликов
при внутривенном введении образцов СХ

Время после введения, мин	Число тромбоцитов, ($\times 10^9$ /л)					
	Образец 6		Образец 9		Образец 12	
	I	II	I	II	I	II
5	708 ± 15	710 ± 20	706 ± 28	712 ± 21	698 ± 33	613 ± 24*
30	711 ± 10	715 ± 19	713 ± 13	725 ± 58	703 ± 25	692 ± 18
60	719 ± 21	719 ± 13	725 ± 95	738 ± 26	709 ± 11	708 ± 12
120	720 ± 15	721 ± 17	730 ± 13	754 ± 73	715 ± 10	713 ± 11
180	723 ± 19	728 ± 21	731 ± 17	761 ± 28	724 ± 25	725 ± 26
240	725 ± 23	730 ± 11	732 ± 43	777 ± 35	735 ± 14	734 ± 15

Примечание. Число тромбоцитов при внутривенном введении контрольным кроликам 0,9% раствора NaCl составило 735 ± 23 ($\times 10^9$ /л); в каждой группе анализировалась плазма от семи кроликов; * - $p < 0,01$ - достоверность различий между контрольными и опытными группами животных; данные без звездочек недостоверно различаются с контрольной группой.

ной формуле исследуемых веществ, а точнее, с различной степенью полимеризации образцов и различной степенью сульфатирования.

Для подтверждения адекватности определения антитромбиновой активности в системе *in vivo* провели сравнительный анализ фармакокинетических параметров, полученных на основании математической модели и измеренных с помощью определения концентрации актикоагулянтов в биоспецифичном электрофорезе [85, 86] с хлоридом цетилпиридиния (табл. 4). Коэффициенты корреляции для периодов полувыведения соответствовали в среднем 0,98 при вероятности $< 0,001$, а для констант элиминации - 0,97 при $p > 0,001$. Подобное свидетельствует о высокой достоверности результатов, полученных с помощью линейной фармакокинетической модели, а следовательно, достоверно и снижение антитромбиновой активности образца 9 в системе *in vivo*.

Необходимо отметить отсутствие значимых воздействий на изменение числа тромбоцитов для внутривенном введении самых активных образцов СХ (табл. 5).

Таблица 6. Протаминейтрализуемая емкость образцов СХ

Номер образца	$K_{et} \times 10^{-2}, \text{мин}^{-1}$		I	II
	по ВСК	по АЧТВ		
6	1,87	2,34	$1,070 \pm 0,075$	$0,990 \pm 0,007$
9	2,42	2,30	$0,850 \pm 0,010$	$0,890 \pm 0,008$
12	2,30	2,13	$1,050 \pm 0,025$	$1,120 \pm 0,010$

Примечание. I – коагулометрическое титрование, мг протамина на мг СХ; II – турбидиметрическое титрование, мг протамина на мг СХ.

Таблица 7. Изменение числа тромбоцитов под действием длительного внутривенного введения образца СХ

Время после введения, дни	Число тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$		
	СХ 9		0,9% NaCl
	4 мг/кг	15 мг/кг	
1	732 ± 23	701 ± 19	745 ± 24
2	728 ± 33	708 ± 15	739 ± 12
3	720 ± 35	700 ± 28	733 ± 19
4	730 ± 21	705 ± 22	751 ± 35
5	731 ± 10	754 ± 23	742 ± 20
6	740 ± 23	741 ± 11	735 ± 18
7	762 ± 22	732 ± 20	739 ± 25
8	753 ± 25	723 ± 22	740 ± 13
9	751 ± 30	738 ± 41	744 ± 31
10	740 ± 23	756 ± 21	747 ± 25

Примечание. В каждой группе использовалось по 5 кроликов

Турбидиметрическое титрование [86, 87] образцов СХ сульфатом протамина ("Spark") проводили как на автоматическом титрографе, сконструированном на базе дейцовского спектроколориметра Spekol-Ю, так и при коагулометрическом титровании протамина в плазме [88]. Обращает на себя внимание тесная обратная корреляция констант элиминации исследуемых образцов с протаминейтрализуемой емкостью ($r_{\text{ВСК}} = -0,83$; $r_{\text{АЧТВ}} = -0,83$), выражаемой отношением весовых частей сульфата протамина как при комплексометрическом титровании, так и при коагулометрическом (табл. 6).

Изменение числа тромбоцитов при длительном (в течение 10 дней) внутривенном введении образца СХ 9 представлено в табл. 7. Достоверных различий с контрольной группой не обнаружено, так же как и между группами животных, получавшими разные дозы образца СХ.

При оценке агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ, в пробах плазмы кроликов при внутривенном введении образца СХ9 и менее активного, высокомолекулярного образца 14, отмечается достоверное отличие агрегации клеток в пробах с образцом 14 в дозе 15 мг/кг от контрольных на пятой минуте после введения (табл. 8).

Полученные данные свидетельствуют о том, что антитромбиновая активность образцов СХ зависит от степени полимеризации и степени сульфатирования

Таблица 8. Изменение агрегации тромбоцитов под действием АДФ в пробах плазмы при внутривенном введении образцов СХ

Время после введения, мин	Агрегация тромбоцитов, (%)			
	Образец СХ 9		Образец СХ 14	
	4 мг/кг	15 мг/кг	4 мг/кг	15 мг/кг
5	24,0 ± 3,1	25,5 ± 5,2	26,3 ± 4,2	35,7 ± 4,8*
30	21,2 ± 2,8	20,1 ± 1,5	25,4 ± 1,3	27,3 ± 0,7
60	20,0 ± 1,7	19,5 ± 2,2	23,3 ± 1,5	26,4 ± 2,1
120	22,1 ± 2,3	21,5 ± 0,9	20,1 ± 0,8	25,2 ± 1,6
180	21,3 ± 2,2	20,4 ± 1,1	21,7 ± 0,5	23,5 ± 0,7
240	21,4 ± 0,7	22,3 ± 0,6	21,2 ± 0,3	20,7 ± 0,5

Примечание. Агрегация тромбоцитов при введении контрольным кроликам 0,9% раствора NaCl составила 21,4 ± 3,7%; в каждой группе использовалось семь кроликов; * – $p < 0,05$ – достоверность различий с контрольной группой; данные без звездочек – недостоверные различия с контрольной группой.

ния. Наиболее активные и длительно действующие продукты имели степень сульфатирования не ниже 1,6 и степень полимеризации порядка 180-240. Эти параметры следует принять за оптимум, к которому необходимо стремиться при разработке технологии получения гепарин-аналогов на основе сульфата хитозана. Для снижения воздействия на тромбоциты необходимо использовать образцы СХ с небольшой молекулярной массой. Способность сульфата протамина нейтрализовать антитромбиновую активность образцов СХ в соотношении приблизительно 1:1 важна для проведения анализов, в которых необходима нейтрализация эффекта, и для возможности использования его как "антидота".

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ МЕХАНИЗМА АНТИКОАГУЛЯНТНОГО ДЕЙСТВИЯ СУЛЬФАТА ХИТОЗАНА

На образце сульфата хитозана СХ со степенью полимеризации 256, степенью сульфатирования 1,25 и антитромбиновой активностью 20 ед/мг, относительно Международного стандарта нефракционированного гепарина, изучались некоторые аспекты механизма антикоагулянтного действия.

Установлено дозозависимое удлинение времени свертывания плазмы в тесте активированного частичного тромбопластинового времени (тест позволяет оценить влияние исследуемого вещества на внутренний путь каскада сериновых протеаз свертывающей системы крови, в котором активация свертывания начинается с активации фактора XII) под действием СХ.

В тесте протромбинового времени (оценка влияния на внешний путь свертывающей системы, в котором активация свертывания начинается с тканевого тромбопластина) ингибирующая активность СХ в 40 раз меньше, чем у нефракционированного гепарина и составляет 2 ед/мг.

Известно, что антикоагулянтное действие гепарина связано с его способностью катализировать инактивацию протеаз системы гемостаза посредством белковых ингибиторов плазмы. Исходя из определенного сходства структурной организации и специфического действия, оказываемого гепарином и СХ на инактивацию свертывания крови по внутреннему и внешнему путям, исследовали влияние последнего на антитромбиновую активность плазмы. Показано, что

СХ в концентрации 0,2 ед/мг катализирует инактивацию свертывающей активности плазмы плазменными ингибиторами с константой ингибирования псевдо-первого порядка 0,24 мин⁻¹. В присутствии гепарина в концентрации 0,08 ед/мл константа ингибирования свертывающей активности плазмы плазменными ингибиторами составила 0,22 мин⁻¹. Для достижения одинаковой скорости инактивации свертывающей активности плазмы плазменными ингибиторами в присутствии гепарина и СХ, последнего требовалось в 2,5 раза больше [88, 89].

Поскольку антикоагулянтные эффекты гепарина реализуются посредством взаимодействия с плазменными ингибиторами сериновых протеиназ системы гемостаза - антитромбином III и кофактором II гепарина, анализировали влияние СХ на ингибиторов по отношению к тромбину. Для исследования потребовалось выделить и очистить кофактор II гепарина [89-92] из плазмы человека. Чистоту и гомогенность выделенного вещества контролировали с помощью вертикального электрофореза в полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия, его молекулярная масса составила 65 кДа. В качестве антитромбина III использовался коммерческий образец фирмы "Sigma". СХ, подобно гепарину, ускоряя инактивацию тромбина антитромбином III и кофактором II гепарина в реакциях с фибриногеном (белок, превращающийся под действием тромбина в фибрин, что приводит к появлению сгустка).

Реакциями псевдопервого порядка являются реакции второго порядка, в которых концентрация одного из реагентов столь высока, что остается практически постоянной на протяжении всей реакции. Константы ингибирования псевдо-первого порядка свертывающей активности тромбина антитромбином III [93] в присутствии гепарина (0,03 ед/мл) или СХ (0,032 ед/мл) сопоставимы и равны 0,43 мин⁻¹ и 0,46 мин⁻¹, соответственно. Следовательно, СХ обладает антитромбиновой активностью (alla) 50-55 ед/мг. Константы ингибирования свертывающей активности тромбина кофактором II гепарина [94] в присутствии гепарина (2 ед/мл) или СХ (2 ед/мл) составили 0,31 мин⁻¹ и 0,28 мин⁻¹, соответственно. Способность СХ ускорять инактивацию тромбина кофактором II гепарина сопоставима с таковой у гепарина. Для достижения 50% ингибирования свертывающей активности тромбина кофактором II гепарина в присутствии СХ последнего требовалось примерно в 100 раз больше, чем для блокирования активности фермента антитромбином III.

СХ дозозависимо снижает не только каталитическую активность тромбина по отношению к основному субстрату - фибриногену, но и влияет на амидазную активность тромбина (способность тромбина расщеплять синтетический хромогенный субстрат, с отделением р-нитроанилида и развитием желтой окраски). С ростом концентрации антикоагулянта амидазная активность тромбина (0,15 NIH ед/мл пробы) падает на треть.

С помощью гель-фильтрации в колонке с Тойо-Перл HW-55 [90] показано образование комплексов между СХ и антитромбином III в эквимольном соотношении составляющих: $4,89 \times 10^{-6}$ М для антитромбина III и $5,10 \times 10^{-6}$ М для СХ [91, 92].

Влияние СХ на кинетику взаимодействия между тромбином [95] (0,12 NIH ед/мл, Boehringer Mannheim) и синтетическим хромогенным субстратом ($0,17 \times 10^{-4}$, ..., $1,25 \times 10^{-4}$ М/мл пробы, М.М. 663) в присутствии антитромбина III изучали по изменению скорости реакции на основании освобождения р-нитроанилида субстрата при длине волны 405 нм. В зависимости от концентрации субстрата меняется скорость реакции, которую рассчитывали на основании коэффициента молярной экстинкции продукта $E_m = 10\,600 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Для определения константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции строили график Лайнуивера-Берка в обратных координатах концентрации субстрата и

скорости реакции. Анализ полученных данных демонстрирует торможение скорости реакции между тромбином и синтетическим субстратом в присутствии антитромбина III, при добавлении гепарина (0,001 ед/мл) или СХ (0,3 ед/мл). Для достижения одинакового эффекта СХ требуется в три раза больше, при любой концентрации субстрата.

Исследовали влияние образцов сульфата хитозана на кинетику ингибирования тромбина человека антитромбином III в условиях реакции псевдо-первого порядка. Три образца СХ (3, 9, 12) имели разные степени полимеризации (156, 256, 245, соответственно), сульфатирования (1,23, 1,25, 1,66 соответственно) и разные антитромбиновые активности (13 ед/мг, 13 ед/мг, 52 ед/мг), измеренные в системе *in vivo*. Максимумы констант второго порядка в реакции между тромбином и антитромбином III в присутствии образцов 3 и 9 составили $1,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$, для 12 - $2,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ в сравнении с гепарином - $2,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$. Однако максимум катализа достигался при концентрациях 3 и 9 - 1,300 мкМ, 12 - 0,200 мкМ и для гепарина - 0,024 мкМ. Используя случайную бинарную модель взаимодействия исследовали сродство образцов СХ и гепарина к протеазе и ингибитору. Константы диссоциации с тромбином для образцов СХ (3 и 9 - 175 нМ, 12 - 71 нМ) были выше, чем для гепарина (16 нМ). Константы диссоциации с антитромбином III для образцов СХ 3 и 9 составили 100 нМ, для 12 и гепарина - 93 нМ и 87 нМ, соответственно. Таким образом, в механизме антикоагулянтного действия образцов СХ ведущую роль играет сродство с антитромбином III. Чем больше сродство с данным ингибитором, тем выше специфическая антикоагулянтная активность образца СХ.

Образцы сульфата хитозана, в зависимости от молекулярной массы и степени сульфатирования обнаруживали антитромбиновую активность 7-42 ед/мг. Константы диссоциации между антитромбином III и тромбином в присутствии наиболее активных образцов СХ составили 16-190 нМ и не коррелировали с α , измеренной в системе *in vitro* по Фармакопейной статье. Отмечено наличие катализа ингибирования тромбина через кофактор II гепарина в системе *in vitro* при больших концентрациях гликозаминогликана. При использовании модели венозного стаза у крыс (с активацией внутреннего пути свертывания) наблюдалась антитромбиническая активность образцов СХ. При внутривенном введении исследуемых веществ в единицах антитромбиновой активности, геморрагический эффект был ниже, в сравнении со стандартным нефракционированным гепарином, что может объясняться незначительным тромбоцитопеническим эффектом и низким агрегационным воздействием на тромбоциты при активации аденозиндифосфорной кислотой. В настоящее время закончены доклинические испытания антитромботического средства на основе смеси нефракционированного гепарина и одного из образцов сульфата хитозана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Franz G., Alban S. // *Int. J. Biol. Macromol.* 1995. V. 17. N 6. P. 311-314.
2. Samal A.B., Koliadko M.G., Sogrina E.N. et al. // *Eksp. Klin. Farmakol.* 1996. V. 59. N 2. P. 27-30.
3. Gavrilova E.A., Barbanova I.I., Usov A.I. et al. // *Ibid.* 1997. V. 60. N 1. P. 42-44.
4. Logeart D., Prigent-Richard S., Boisson-Vidal C. et al. // *Eur. J. Cell Biol.* 1997. V. 74. N 4. P. 385-390.
5. Barbucci R., Lamponi S., Magnani A. et al. // *Biomaterials* 1998. V. 19. N 7-9. P. 801-806.
6. Magnani A., Alhanese A., Lamponi S. et al. // *Thromb. Res.* 1996. V. 81. N 3. P. 383-395.
7. Abatangelo G., Barbucci R., Brun P. et al. // *Biomaterials* 1997. V. 18. N 6-7. P. 1411-1415.
8. McGee M.P., Teuschler H., Parthasarathy N. et al. // *J. Biological Chemistry* 1995. V. 270. N 44. P. 26109-26115.

9. Alberdi E., Hyde C.C., Becerra S.P. // *Biochemistry* 1998. V. 37. N 30. P. 10643-10652.
10. Denuziere A., Taverna M., Ferrier D. et al. // *Electrophoresis* 1997. V. 18. N 5. P. 745-750.
11. Colucci M., Sardella L., Barbanti M. et al. // *Thromb. Res.* 1997. V. 87. N 5. P. 441-446.
12. Cofrancesco F., Colombi M., Gianese F. et al. // *Ibid.* 1990. V. 57. N 3. P. 405-414.
13. Koenig A., Norgard-Sumnicht K., Linhardt R. et al. // *Clin. Invest.* 1998. V. 101. N 4. P. 877-889.
14. Kaiser B., Hoppensteadt D.A., Jeske W. et al. // *Thromb. Res.* 1994. V. 75. N 6. P. 609-616.
15. Barrowcliffe T.W., Gray E., Merton R.E. et al. // *Thromb. Haemost.* 1986. V. 56. N 2. P. 202-206.
16. de Raucourt E., Mauray S., Chaubet F. et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* 1998. V. 41. N 1. P. 49-57.
17. Maaroufi R., Jozefowicz M., Tapon-Bretaudiere J. et al. // *Biomaterials.* 1997. V. 18. N 6-7. P. 359-365.
18. Bagheri-Yarmand R., Kourbali Y., Mabilat C et al. // *Br. J. Cancer.* 1998. V. 78. N LP. 111-118.
19. Onishi M., Miyashita Y., Motomura T. et al. // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1998. V. 9. N 9. P. 973-984.
20. Pike R.N., Potempa J., Skinner R. et al. // *Biol. Chem.* 1997. V. 272. N 32. P. 19652-19655.
21. Hook M., Bjork I., Hopwood J. et al. // *FEBS Lett.* 1976. V. 66. N 1. P. 90-93.
22. Carter C.J., Kelton J.G., Hirsh J. et al. // *Blood.* 1982. V. 59. N 6. P. 1239-1245.
23. Toida T., Maruyama T., Ogita Y. et al. // *Int. J. Biol. Macromol.* 1999. V. 26. N 4. P. 233-241.
24. Alban S., Jeske W., Welzel D. et al. // *Thromb. Res.* 1995. V. 78. N 3. P. 201-210.
25. Wall D., Douglas S., Ferro V. et al. // *Ibid.* 2001. V. 103. N 4. P. 325-335.
26. Tollefsen D.M., Majeris D.W., Blank M.X. // *Biol. Chem.* 1982. V. 257. N 5. P. 2162-2169.
27. Bray A., Lane D.A., Freyssine J.M. et al. // *Biochem. J.* 1989. V. 262. N 1. P. 225-232.
28. Petitou M., Lormeau J.C., Perly B. et al. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. N 18. P. 8685-8690.
29. Casu A. // *Dimitru S., editor-Polymeric biomaterials.* N.Y.: Marcel Dekker, 1994. P. 159-177.
30. Barbucci R., Magnani A., Lamponi S. // *Inorg. Biochem.* 2000. V. 81. N 4. P. 229-237.
31. Barbucci R., Magnani A., Casolaro M. et al. // *J. Thromb. Thrombolysis.* 1998. V. 6. N 2. P. 109-115.
32. Barbucci R., Magnani A., Lamponi S. et al. // *Pol. Adv. Tech.* 1996. V. 7. P. 675-685.
33. Vyas K.A., Patel H.V., Vyas A.A. et al. // *Biochemistry.* 1998. V. 37. N 13. P. 4527-4534.
34. Folkman J., Shing Y. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. N 16. P. 10931-10934.
35. Gengrinovitch S., Berman B., David G. et al. // *Ibid.* 1999. V. 274. N 16. P. 10816-10822.
36. Lopez-Casillas F., Wrana J.L., Massague J. et al. // *Cell.* 1993. V. 73. N 7. P. 1435-1444.
37. Schlessinger J., Lax J., Lemmon M. // *Ibid.* 1995. V. 83. N 3. P. 357-360.
38. Henke C.A., Roongta U., Mickelson D.J. // *Clin. Invest.* 1996. V. 97. N 11. P. 2541-2552.
39. Lindhal U., Lindhal K., Spillmann D. et al. // *Thromb. Res.* 1994. V. 75. N 1. P. 1-32.
40. Stivala S. // *Fed. Proc.* 1977. V. 36. N 1. P. 83-88.
41. Lages B., Stivala S. // *Biopolymers.* 1973. V. 12. N 5. P. 961-974.
42. Casu B. // *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 1985. V. 43. P. 51-56.
43. Lindahl U., Abildgaard U., Larsen B.M. // *Thrombosis Research.* 1991. V. 62. N 6. P. 607-614.
44. Thomas D.P. // *Thromb. Haemost.* 1992. V. 67. N 5. P. 491-493.
45. Samama M. // *Thrombosis and its management.* Ed. by Poller L and Thomson J.M. 1993. P. 188-200.
46. Ofosu F.A., Fernandez F., Anvari N. et al. // *Thromb. Haemost.* 1988. V. 60. N 2. P. 188-192.
47. Ofosu F.A., Fernandez F., Anvari N. // *Ibid.* 1988. V. 60. N 2. P. 193-198.
48. Hirano S., Tanaka Y., Hasegawa M. et al. // *Carbohydr. Res.* 1985. V. 137. P. 205-215.
49. Kato Y., Onishi H., Machida Y. // *J. Pharm. Pharmacol.* 2002. V. 54. N 4. P. 529-537.
50. Usami Y., Okamoto Y., Takayama T. et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* 1998. V. 42. N 4. P. 517-522.
51. Tanaka Y., Tanioka S., Tanaka M. et al. // *Biomaterials.* 1997. V. 18. N 8. P. 591-595.
52. Okamoto Y., Shibasaki K., Minami S. et al. // *J. Vet. Med. Sci.* 1995. V. 57. N 5. P. 851-854.
53. Okamoto Y., Tomita T., Minami S. et al. // *Ibid.* 1995. V. 57. N 4. P. 765-767.
54. Denuziere A., Ferrier D., Domard A. // *Ann. Pharm. Fr.* 2000. V. 58. N 1. P. 47-53.
55. Denuziere A., Ferrier D., D'Amour A. et al. // *Biomaterials.* 1998. V. 19. N 14. P. 1275-1285.
56. Genta I., Perugini P., Pavanetto F. et al. // *EXS* 1999. V. 87. P. 305-313.
57. Rossi S., Ferrari F., Bonferoni M.C. et al. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000. V. 10. N 4. P. 251-257.
58. Chellat F., Tabrizian M., Dumitriu S. et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* 2000. V. 53. N 5. P. 592-599.
59. Chellat F., Tabrizian M., Dumitriu S. et al. // *Ibid. Res.* 2000. V. 51. N 1. P. 107-116.
60. Sabnis S., Block L.H. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2000. V. 27. N 3. P. 181-186.
61. Muzzarelli R.A., Mattioli-Belmonte M., Pugnaroni A. et al. // *EXS.* 1999. V. 87. P. 251-264.
62. Muzzarelli R.A. // *Ibid.* 1999. V. 87. P. 1-6.
63. Hiraku O., Yoshiharu M. // *Biomaterials* 1999. V. 20. N 19. P. 175-182.

64. Ogawa Y., Yamamoto M., Okada H. *et al.* // Chem. Pharm. Bull. 1988. V. 36. N 3. P. 1095-1103.
65. Ogawa Y., Yamamoto M., Takada S. *et al.* // Ibid. Bull. 1988. V. 36. N 4. P. 1502-1507.
66. Yamada T., Onishi H., Machida Y. // Yakugaku Zasshi. 2001. V. 121. N 3. P. 239-245.
67. Yokoyama M., Miyauchi M., Yamada N. *et al.* // Cancer. Res. 1990. V. 50. N 6. P. 1693-1700.
68. Yokoyama M., Okano T., Sakurai Y. *et al.* // Ibid. 1991. V. 51. N 11. P. 3229-3236.
69. Davies R.C., Neuberger A., Wilson B.M. // Biochim. Biophys. Acta. 1969. V. 178. N 8. P. 294-305.
70. Amano K., Ito E. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 85. N 20. P. 97-104.
71. Pangburn S.H., Trescony P.V., Heller J. // Biomaterials. 1982. V. 3. N 5. P. 105-108.
72. Yomota C., Komuro T., Kimura T. // Yakugaku zasshi. 1990. V. 110. N 7. P. 442-448.
73. Ichikawa H., Onishi H., Takahata T. *et al.* // Drug. Des. Discov. 1993. V. 10. N 4. P. 343-353.
74. Li Y.P., Machida Y., Sannan T. *et al.* // STP Pharma. Sciences. 1991. V. 1. P. 363-368.
75. Sato M., Onishi H., Kitano M. *et al.* // Biol. Pharm. Bull. 1996. V. 19. N 2. P. 241-245.
76. Kamiyama K., Onishi H., Machida Y. // Ibid. 1999. V. 22. N 2. P. 179-186.
77. Hata H., Onishi H., Machida Y. // Biomaterials. 2000. V. 21. N 17. P. 1779-1788.
78. Российская Фармакопейная статья 42-1256-79.
79. Hull P., Delmore T., Genton E. *et al.* // N. Engl. J. Med. 1979. V. 301. N 16. P. 855-858.
80. Kakkar V.V., Stamatakis J.D., Bentley P.D. *et al.* // JAMA. 1979. V. 241. N 1. P. 39-42.
81. Hoylearts M., Owen W.G., Collen D. // Biol. Chem. 1984. V. 259. N 6. P. 5670-5677.
82. Johnson E.A., Kirkwood T.B.L., Stirling Y. *et al.* // Thromb. Haemost. 1976. V. 35. N 5. P. 586-597.
83. Borg J.Y., Owen M.C., Soria C. *et al.* // J. Clin. Invest. 1988. V. 81. N 10. P. 1282-1290.
84. Li E.H., Fenton T.T., Feinman R.D. // Arch. Biochem. Biophys. 1976. V. 175. N 2. P. 153-159.
85. Зорин Н.А., Себелева О.А. // Вопр. мед. хим. 1986. Т. 32. Н. 2. С. 132-137.
86. Мазов М.Ю., Кобяков В.В., Андреевичева Т.Ю. // Хим. Фарм. Ж. 1983. Т. 27. НО. С. 1260-1262.
87. Hirsh J., VanAken W.G., Gallus A.S. // Circulation. 1976. V. 53. N 4. P. 691-695.
88. Beguin S., Lindhout T., Hemker H. // Thromb. Haem. 1988. V. 60. N 3. P. 457-462.
89. Плиско Е.А., Нудьга Л.А., Данилов С.Н. // Успехи химии. 1977. Т. 46. С. 1470-1487.
90. Blackburn M.N., Smith R.L., Carson J. *et al.* // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. N 3. P. 939-941.
91. Jorgensen A.M., Borders C.L., Fish W.W. // Biochem. J. 1985. V. 231. N 1. P. 59-63.
92. Speight M.O., Griffith M.J. // Arch Biochem Biophys. 1983. V. 225. N 2. P. 958-963.
93. Chang J.A., Tran T.H. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. N 8. P. 1174-1176.
94. Plecher C.H., Cunningham M., Nelsestuen G.L. // Biochim. Biophys. Acta. 1985. V. 838. N 4. P. 106-113.
95. Thomas D.P., Merton R.E., Gray E. *et al.* // Thromb. Haem. 1981. V. 61. N 6. P. 204-207.

ХИТОЗАН И ЕГО ПРОИЗВОДНЫЕ В БИОИНКАПСУЛИРОВАНИИ

Е.А. Марквичева

Институт биоорганической химии им. Семенова РАН, Москва
lemark@ibch.ru

Как известно, хитозан является водорастворимым биосовместимым и биодegradуемым полимером. Сочетание в хитозане этих свойств привлекает к нему и некоторым его производным внимание ученых, работающих в области биоинкапсулирования. Под биоинкапсулированием понимают создание различных полимерных систем в форме гидрогелевых нано- и микрочастиц, нано- и микрокапсул или полимерных пленок с иммобилизованным (включенным в них) биоматериалом. Биоматериал может быть представлен различными биологически активными веществами (белками, в том числе ферментами, ДНК, пептидами, низкомолекулярными гормонами, антибиотиками и др.), а также живыми клетками (микроорганизмами, растительными или животными).

Рассмотрим несколько направлений биотехнологии и биомедицины, в которых хитозан (и/или его производные) используются в качестве единственного компонента или в сочетании с другими полимерами для создания полимерных матриц с иммобилизованным в них биоматериалом. Отметим наиболее интересные и перспективные в ближайшем будущем, на наш взгляд, области применения хитозана и его производных для биоинкапсулирования.

1. Создание полимерных покрытий с иммобилизованными в них различными терапевтическими агентами (ферментами, пептидами, антибиотиками, антиоксидантами и др.) для терапии ран.

2. Доставка лекарств с пролонгированным высвобождением из полимерной матрицы.

3. Получение пероральных и назальных вакцин пролонгированного действия.

4. Конструирование ДНК-содержащих носителей для получения генетически модифицированных клеток.

5. Трансплантация генноинженерных животных клеток-продуцентов терапевтических агентов (белков, ферментов, факторов роста, гормонов, пептидов и др.) в организм для лечения наследственных и ненаследственных болезней.

СОЗДАНИЕ ПОЛИМЕРНЫХ ПОКРЫТИЙ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ В НИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ АГЕНТАМИ ДЛЯ ТЕРАПИИ РАН

Разработка новых методов местного лечения ран и ожогов с использованием полимерных покрытий с заданными свойствами - одно из быстро развивающихся направлений биомедицины.

Известно, что на естественное протекание раневого процесса влияют различные факторы, связанные с характером внешней среды на поверхности раны. Так, окклюзия раневой поверхности (закрытие раны) уменьшает воспалительную реакцию и ускоряет биосинтез коллагена [1,2].

Для обеспечения надежного лечебного эффекта покрытия должны удовлетворять ряду специальных требований, включающих: минимальную травми-

зацию раневой поверхности при наложении и снятии повязки (атравматичность); достаточную сорбционную способность, предотвращающую скопление раневого экссудата под покрытием; плотное прилегание к поверхности раны; защиту от инфицирования извне; возможность контролируемого освобождения лекарственного вещества.

Все полимерные покрытия с инкапсулированными в них лекарствами должны обеспечивать дозированное и пролонгированное освобождение последних в ране. В качестве лекарств обычно используются обезболивающие, антибактериальные и гемостатические препараты, антиоксиданты, факторы роста, протеолитические ферменты (террилитин, коллитин, трипсин, химотрипсин, протеиназа С и др.) [2-4].

В настоящее время используется широкий спектр полимерных покрытий для лечения ран, в частности тканые и формованные пленки [2], губки [5], пены [6], гидроколлоидные и гидрогелевые покрытия [7]. Для получения последних используются различные синтетические, искусственные и природные полимеры: поливиниловый спирт [4], коллаген [5], желатин [8], целлюлоза и альгинат [9, 10], хитозан и карбоксиметилхитин [11, 12]. Основные свойства гидрогелевых покрытий должны обеспечивать возможность длительного нахождения покрытия на ране, существенно снижая ее травматизацию, так как отсутствует необходимость частых смен повязки; дренаж раны, степень которого зависит от толщины и состава покрытия; высокую герметизирующую способность; надежную защиту от внешней инфекции; возможность стимулирования процесса заживления, так как покрытия являются подходящей матрицей для миграции, адгезии и пролиферации клеток в ране.

Следует отметить, что покрытия на основе хитиновых соединений занимают особое место в этом списке, и первые попытки использования хитинов и хитозанов для заживления ран, в том числе ожоговых, были описаны еще в середине 1970-х гг. [13]. Дело в том, что эти соединения, помимо всех перечисленных выше свойств, имеют некоторые особо ценные качества. Например, показано, что хитозан обладает антимикробной активностью, активизирует макрофаги, усиливает пролиферацию фибробластов [14].

Для того, чтобы понять, насколько важны эти свойства хитозана, следует рассмотреть некоторые биологические процессы, протекающие в ране.

Известно, что процесс ранозаживления включает три фазы: воспаление, пролиферацию и созревание грануляционной ткани [15; 16]. Обычно фаза воспаления длится около трех дней, стадия пролиферации завершается к седьмому - десятому дню после ранения. Фаза воспаления характеризуется присутствием большого количества макрофагов и других клеток (нейтрофилов, лимфоцитов), принимающих участие в остром адаптивном ответе организма в ране. Фаза пролиферации сопровождается резким увеличением количества пролиферирующих фибробластов, продуцирующих коллаген и другие структурные компоненты, участвующие в процессе репарации ткани, а также образованием сосудов (ангиогенезом) в грануляционной ткани.

Известно также, что ацетилглюкозаамин (структурная единица хитинов) может использоваться организмом в качестве предшественника мукополисахаридов, таких как гиалуроновая кислота, кератин, кератинсульфат, хондроитинсульфат, муцины и др., которые являются важными компонентами биоструктур. Так, мукополисахариды типа кератинсульфата входят в состав протеогликанового комплекса, который, в свою очередь, образует комплекс с гиалуроновой кислотой и играет важную роль в архитектурном формировании стенки кровеносных сосудов.

Таким образом, предполагается как минимум два механизма, посредством которых хитиновые соединения могут вносить свой положительный вклад в процесс ранозаживления: иммунный ответ (через стимулирование макрофагов с последующим "запуском" цепочки всех биологических событий) и использование ацетилглюкозамина в качестве предшественника мукополисахаридов, непосредственно участвующих в создании различных биоструктур в организме [17].

Таким образом, очевидно, что хитозан и некоторые его производные помимо основных перечисленных выше качеств, которыми должны обладать все полимерные материалы-кандидаты для использования в терапии ран, имеет некоторые специфические особенности, которыми эти материалы не обладают, что, несомненно, привлекает к нему интерес исследователей.

Отметим, что полимерные покрытия на основе хитозана и его производных успешно разрабатываются в течение последних лет для терапии ран как в России, так и за рубежом (например, коммерческий препарат Omiderm). В то же время продолжают исследования с целью улучшения их механических (эластичность, прочность) и физико-химических свойств, таких как набухаемость, селективность, биоадгезивность и др. Для решения этой задачи используются различные подходы. Так в работе [18] предложено использовать для растворения хитозана не уксусную кислоту, как это делается в большинстве технологий при получении хитозановых пленок, а молочную кислоту, что существенно улучшает как упомянутые выше свойства пленок, так и позволяет избежать нежелательные аллергические реакции (эритема, эдема и др.). В работе [19] авторами предлагается использовать для поперечной сшивки хитозана не традиционный глутаровый альдегид, а природный реагент генипин. Такая сшивка обеспечивает возрастание предела прочности на разрыв. Более интересным подходом для решения этой задачи, на наш взгляд, является получение привитых сополимеров хитозана с другими сополимерами, например с метакриловыми сополимерами: акрилонитрилом, акриламидом и диметиламиноэтилметакрилат-метилсульфатом) [20]. Прочность на разрыв таких пленок возрастает более, чем в три раза по сравнению с пленками из чистого хитозана. Показано, что термообработка хитозановых пленок также позволяет регулировать их прочностные свойства, набухаемость и "транспортные характеристики" (проницаемость и селективность) [21].

Отметим, что часто полимерные покрытия содержат хитозан или его производные в качестве одного из компонентов полиэлектrolитного комплекса. В качестве другого (противоположно заряженного полимера) предлагаются различные полимеры, например, альгинат [22, 23] или пектин [24], или некоторые другие. Предлагаются также двуслойные покрытия, например, состоящие из верхнего слоя гидрогеля карбоксиметилхитина и нижнего на основе хитозана [12].

Хотя благодаря особым свойствам хитозана и его производных как биологически активных соединений, удастся ускорить процесс ранозаживления, наибольший эффект, безусловно, можно достигнуть, если инкапсулировать в такие пленки лекарственную "начинку". В качестве последней обычно используются обезболивающие, антибактериальные и гемостатические препараты, антиоксиданты, факторы роста, протеолитические ферменты (террилитин, коллитин, трипсин, протеиназа С) [25, 26, 3].

Нами предложено в качестве такой "начинки" применять соединения, которые используются самой природой в процессе репарации тканей. Мы инкапсулировали в альгинат-хитозановые пленки протеолитический фермент тромбин [27] или некоторые пептиды, которые обладают тромбино-подобным действием, в частности агонист тромбинового рецептора TRAP-6) [28]. Известно, что

тромбин (протеиназа семейства трипсина) регулирует свертывающие и противосвертывающие механизмы, сосудистый тонус. Кроме того, тромбин включается в воспалительную и пролиферативную фазы заживления ран. При этом он стимулирует адгезию кровяных пластинок, моноцитов и Т-лимфоцитов к эндотелиальным клеткам и агрегацию клеток. Тромбин стимулирует также пролиферацию клеток эндотелия, фибробластов и Т-лимфоцитов, действует как хемоаттрактант для клеток, принимающих участие в остром адаптивном ответе организма в ране, а также для фибробластов [29-32]. Наконец, показано, что тромбин стимулирует продукцию коллагена фибробластами и, таким образом, ускоряет развитие соединительной ткани [30, 33]. Отметим, что попытки использовать тромбин и его пептидные фрагменты как факторы роста при заживлении ран предпринимались неоднократно, но наталкивались на крайнюю нестабильность фермента, а следовательно невозможность обеспечить его пролонгированное действие на ране. Иммобилизация тромбина (пептидов) в гидрогелевые пленки может обеспечить решение обеих задач: как стабилизацию, так и возможность контролируемого пролонгированного освобождения из полимерной матрицы. Отметим, что параллельно с хитозан-альгинатными пленками нами исследовались покрытия на основе альгинат-поли-L-лизинового интерполимерного комплекса, и результаты в случае хитозана были значительно лучше, чем при использовании поли-L-лизина [28].

В настоящее время известен только один препарат тромбина, используемый в качестве гемостатического и ранозаживляющего средства. Это так называемый фибриновый клей или сиапант (фирма Immuno, Austria), который представляет собой сгусток, фибрина, образуемый непосредственно на поверхности раны при ее обработке свежеприготовленной смесью растворов фибриногена и тромбина [34, 35]. Следует отметить, что препараты фибринового клея имеют высокую стоимость, поскольку требуют тщательной очистки, и, видимо, поэтому не нашли широкого применения в России. В качестве примера разработки аналогичного препарата-клея (или мази резорбтивного действия) отечественного производства, можно привести "Адгелон-гель", полученный на основе вязкотекучих растворов хитозана с введенной в них "начинкой" сывроточного гликопротеина (который авторы никак не называют) и салициловой кислоты (в виде салицилата хитозана) [36].

ДОСТАВКА ЛЕКАРСТВ С ПРОЛОНГИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ ИЗ ПОЛИМЕРНОЙ МАТРИЦЫ

Большинство используемых ныне терапевтических средств, несмотря на безусловную эффективность при лечении того или иного заболевания, вызывают нежелательные побочные эффекты. Идеальная лекарственная система должна осуществлять точную доставку лекарственного вещества в больной орган и его высвобождение в нужный момент, когда организм в нем нуждается, и в минимальном количестве, необходимом для лечения. Создание такой системы позволило бы существенно снизить дозы лекарственных веществ и, следовательно, избежать их побочных воздействий.

Наиболее удобный традиционный способ введения лекарств - пероральный - позволяет избежать связанных с инъекциями боли и риска инфицирования. Более того, лекарственные формы, предназначенные для перорального приема, более дешевы, поскольку для их приготовления не нужны стерильные

условия. Скорость выделения контролируется количеством лекарства в матрице, растворимостью его в полимере, степенью гидратации геля, кинетикой набухания-обезвоживания полимера [37-39]. Скорость сорбции и десорбции можно направленно менять путем введения в гель лигандов, способных специфически связываться с сорбируемым веществом [39-41].

Кишечная стенка представляет собой основной барьер, через который терапевтические вещества могут проникать в кровоток. Однако если маленькие молекулы, такие как аминокислоты и сахара могут свободно преодолеть стенку кишечника за счет активного транспорта через клеточную мембрану, то для таких крупных молекул, как белки, мембрана клеток кишечника практически непроницаема. Таким образом, для создания лекарственных форм белков, пептидов, гормонов и других высокомолекулярных гидрофильных соединений необходимо воспользоваться принципом "Троянского коня": макромолекулы должны быть "замаскированы" (включены внутрь гидрофобных микрочастиц, которые путем эндоцитоза смогут попасть внутрь клетки кишечной стенки).

В настоящее время известны примеры успешного использования целого ряда полимерных систем на основе хитозана для доставки и контролируемого освобождения биологически активных веществ через слизистые и, в частности, при их пероральном введении. Основные требования к лекарственной форме, предназначенной для перорального приема, следующие: обеспечение защиты "начинки" от действия протеолитических ферментов и кислой среды желудка (pH2) и контролируемое высвобождение лекарства в нейтральной среде (pH7,0-7,4) тонкого кишечника или прямой кишки. Среди множества примеров из литературы приведем лишь несколько. Например, английские ученые предложили разработку новых полимерных микрочастиц на основе гиалуроновой кислоты-хитозана для назальной (через слизистые носовой полости) доставки гентамицина, которая оказалась в 30-40 раз эффективнее, чем доставка этого антибиотика в виде раствора или сухого порошка [42]. Польскими учеными предлагается использовать микрокристаллический хитозан в виде гидрогелевых частиц в качестве эффективного средства пролонгированной доставки кетопрофена [43]. Отметим также публикацию испанских ученых, которые предлагают использовать хитозановые носители для доставки доксорубина для терапии рака [44]. В Японии предлагают использовать хитозановые капсулы, нагруженные противовоспалительным лекарством (5-аминосалициловой кислотой), для лечения колитов в модели на крысах [45]. Наконец, параллельно несколько лабораторий занимаются разработкой хитозановых микрокапсул с инкапсулированным в них инсулином для перорального применения [46, 47].

Однако не всегда можно достичь желаемого результата пероральным или назальным введением лекарств. Наиболее эффективными, особенно когда пациент находится в критической ситуации, как известно, являются внутримышечные или внутривенные инъекции. Интересно отметить, что в последние годы возникло целое новое направление, изучающее введение внутримышечно пациенту лекарств не в виде растворов, а в виде нано- или микрочастиц (или микрокапсул) на основе биосовместимых биodeградирующих природных или синтетических полимеров, либо в виде полимерных водных растворов, которые образуют гель при попадании в тело пациента [48]. Это так называемые "инъектируемые гели" (injectable gels), а научное направление называется клеточной инженерией и представляет собой новый подход к лечению самых различных заболеваний, и в частности для восстановительной хирургии костей и хрящевых

тканей. Такие гели имеют преимущества перед традиционным способом введения имплантантов в виде заранее полученных полимерных структур: 1) полимерный раствор легко принимает форму дефекта, 2) может содержать различные терапевтические агенты (например, ростовые факторы, которые вводятся в полимерный раствор непосредственно перед инъекцией) и 3) наконец, что самое существенное, для введения его не требуется хирургической операции. Отметим, что механизмы гелеобразования *in situ* могут быть следующими: желирование при изменении температуры или pH, сшивка различными ионами, изменение растворителя или кристаллизация. Хитозан и здесь находит все более широкое применение благодаря своей биосовместимости, биodeградируемости и отношению к pH-обратимым полимерным гелям. Следует особо отметить, что хитозан и его комплексы с гепарином или декстрансульфатом являются прекрасным структурным материалом для репарации тканей, так как обеспечивают хорошую адгезию, распластывание и рост клеток [49].

Что касается микрокапсул, то они могут содержать различные лекарства, например, факторы роста эндотелиальных клеток и тромбоцитов, которые необходимы для восстановления сосудов (ангиогенеза) [50], или терапевтические агенты для лечения опухолей мозга [51] и другие. Особо выделим японскую публикацию, в которой на молекулярном и клеточном уровне доказано, что хитозан сам может индуцировать апоптоз (запрограммированную смерть) раковых клеток мочевого пузыря, а следовательно, использоваться в раковой терапии [52].

Следует заметить, что в микрокапсулы в качестве терапевтических агентов можно иммобилизовать не отдельные химические соединения, а живые клетки-продуценты этих лекарств (белков, ферментов, гормонов, пептидных иммуностимуляторов и т.д.). Особенности иммобилизации животных клеток, в частности в хитозансодержащие микрокапсулы, будут рассмотрены ниже.

ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРОРАЛЬНЫХ И НАЗАЛЬНЫХ ВАКЦИН ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ

Введение вакцин перорально/назально имеет ряд преимуществ, к которым, в частности, можно отнести большую эффективность действия благодаря стимулированию местного иммунного ответа слизистой, опережающего общий иммунный ответ организма [53-55]. Наиболее эффективной и перспективной формой иммунизации при этом считают вакцины, инкапсулированные в полимерные матрицы, из которых они могут освобождаться в течение длительного времени (1-6 месяцев). Такие вакцины пролонгированного действия называются "вакцинами однократного введения", так как такой способ введения не требует повторных иммунизаций, которые не всегда удается провести, особенно у детей, а следовательно, не получить ожидаемого эффекта [56].

Ранее было показано, что хитозан и его производные (N-триметилхитозан, моно-N-карбоксиметил хитозан и др.) могут эффективно сорбироваться на слизистых и таким образом улучшать доставку гидрофильных макромолекул (белков, пептидов) пероральным или назальным путем [57]. При этом интересно отметить, что неспецифическая адъювантная активность хитозанов зависит от степени деацетилирования и типа лекарства. В настоящее время ведутся интенсивные исследования по созданию вакцин, инкапсулированных в хитозансодержащие полимерные матрицы. При этом используются самые различные антигены, начиная от дифтерии, холерного токсина [58] и заканчивая СПИДом [59].

КОНСТРУИРОВАНИЕ ДНК-СОДЕРЖАЩИХ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Трансфекция эукариотических клеток (введение чужеродного гена в генотип клетки) с целью использования таких генетически модифицированных клеток в качестве продуцентов некоторых рекомбинантных белков или пептидов является мощным инструментом целенаправленного изменения генома и одновременно одним из самых больших достижений молекулярной и клеточной биологии последнего времени. Этот метод открывает неограниченные возможности в биотехнологии (получение ценных рекомбинантных белков и пептидов), медицине (генная терапия), сельском хозяйстве (получение генноинженерных клеточных линий растений). Отметим, что в настоящее время параллельно развивается несколько подходов к созданию эффективных инструментов доставки ДНК в клетку. Среди них использование катионных липосом [60, 61], а также адено- и ретровирусов. Наконец, в качестве третьего перспективного инструмента для доставки ДНК в клетку рассматриваются полимерные нанокапсулы (200-800 мкм).

В настоящее время для трансфекции клеток плазмидной ДНК используются рН-чувствительные липосомы [62, 63]. Это липосомы, в состав которых включены катионные липиды, которые содержат амины с рК в физиологическом интервале (4,5-8). В кислых условиях они способны связывать ДНК и проникать в клетку; а при изменении рН - сливаться с мембраной эндосомы, освобождая ДНК. Однако их использование имеет несколько недостатков, таких как высокая стоимость, иммуногенность, а также, возможность агрегации липосом.

Что касается использования вирусов в качестве носителей ДНК, они нетоксичны для клеток и обеспечивают хорошую эффективность трансфекции. Хотя большинство медицинских протоколов в настоящее время базируется именно на вирусных ДНК-векторах, использование таких систем ограничено по некоторым причинам: в частности, стоит учитывать биологические особенности вирусов, например, возможные их онкогенные свойства; ограниченное количество генетического материала (ДНК), которое можно доставить с помощью вируса; а также необходимость соблюдения правил общей безопасности при производстве вирусов.

В настоящее время некоторые ДНК-векторы являются коммерчески доступными и широко используются (например, липофектин фирмы Qiagen), однако исследования по созданию новых, более дешевых и эффективных полимерных систем на основе наносфер/нанокапсул продолжаются. Такие наноносители с инкапсулированными в них ДНК-векторами имеют несколько преимуществ перед всеми рассмотренными выше: 1) на их поверхность можно ковалентно "пришить" лиганды, которые обеспечивают высокоспецифическое ("адресное") взаимодействие с клеточными рецепторами; 2) можно ввести в клетку не одну, а несколько ДНК-плазмид в одной нанокапсуле; 3) можно защитить ДНК от расщепления ферментами сыворотки (нуклеазами); 4) такие нанокапсулы с инкапсулированной ДНК можно лиофильно высушить и длительно хранить в такой форме без потери активности.

Хитозан является перспективным кандидатом для конструирования носителей ДНК-векторов как по упомянутым выше причинам (биосовместимость, малая токсичность, биodeградируемость), так и в силу своей способности достаточно легко проникать через биологические поверхности (мембрану), при этом вводить ("протаскивать") в клетку ассоциированные с ним макромолекулы. Так

как хитозан положительно заряжен, то легко образует комплексы с отрицательно заряженными молекулами ДНК. Показано, что при комплексообразовании хитозана с другими макромолекулами и формировании при этом коллоидных частиц могут быть задействованы несколько механизмов, включая ионную поперечную сшивку, ионное комплексование, хотя некоторые из этих систем могут быть реализованы только при конъюгировании с молекулами ДНК.

Хотя в литературе описано достаточно много примеров использования хитозановых носителей ДНК-векторов как в виде коллоидных частиц, так называемых "полиплексов" ДНК-хитозан (20-25 нм) [64], так и в виде более крупных наночастиц (100-250 нм) [65], механизм хитозанспецифической трансфекции остается до конца неясным. Однако показано, что уровень трансфекции зависит от молекулярной массы хитозана, при этом диапазон используемых молекулярных масс от 22 кДа [66] до 400 кДа [67]; структуры самой молекулы, соотношения азота хитозана к фосфору ДНК (N/P ratio); среды, используемой для трансфекции (с сывороткой или без), pH этой среды, и, конечно, линии клеток [68]. Заметим, что в некоторых работах показано, что ДНК носители на основе низкомолекулярного хитозана (22 кДа) менее токсичны и более эффективны для трансфекции, чем другие полиплексы, например, на основе поли-L-лизина [66].

Повысить эффективность трансфекции, как ранее замечено, можно с помощью введения специфического лиганда в макромолекулу полиплекса. Этот лиганд взаимодействует с рецепторами именно тех клеток, которые нужно трансфицировать. Именно таким способом можно осуществить адресную доставку ДНК. Так, для трансфекции клеток печени (гепатитов Нер G2) был использован галактозилированный хитозан (галактозная группа является лигандом для ациалогликопротеинового рецептора гепатоцита). Такой направленно модифицированный хитозан сополимеризовали с полиэтиленгликолем и использовали в качестве носителя ДНК вектора. Это позволило получить более стабильный комплекс с ДНК в сравнении с комплексом хитозан-ДНК и обеспечить эффективную трансфекцию гепатоцитов [69].

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЕННОИНЖЕНЕРНЫХ КЛЕТОК-ПРОДУЦЕНТОВ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ И НЕНАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Последние достижения в генной инженерии открывают перспективы для разработки новых подходов к лечению различных заболеваний, в том числе наследственных, с использованием генноинженерных клеточных линий. Имобилизованные в полимерные микрокапсулы и затем имплантированные пациенту, эти генноинженерные клетки могут секретировать необходимые рекомбинантные продукты (гормоны, цитокины, ферменты, факторы роста, различные пептидные иммуностимуляторы и др.), не вызывая отклонений в функционировании иммунной системы пациента. Напомним, что если классическая генная терапия предполагает генетическую модификацию клеток хозяина с последующей их перфузией тому же пациенту, то задачей так называемой "соматической генной терапии" является создание универсальных неаутологичных клеточных линий, которые могут быть использованы для различных пациентов с одним и тем же заболеванием. При этом в качестве этих универсальных линий вовсе нет необходимости использовать клетки человека: это могут быть клетки мыши, крысы, хомячка или других животных. Наличие микрокапсулы, отделяющей

генноинженерные клетки-продуценты, от клеток хозяина, обеспечит защиту этих чужеродных клеток от иммунной системы хозяина (пациента).

Таким образом, микрокапсулы могут выполнять двойную функцию: работать в качестве микрореактора, "полупроницаемые" стенки которого обеспечивают выход генноинженерного терапевтического продукта, секретируемого клетками, и защищать эти инкапсулированные клетки от иммунной системы хозяина.

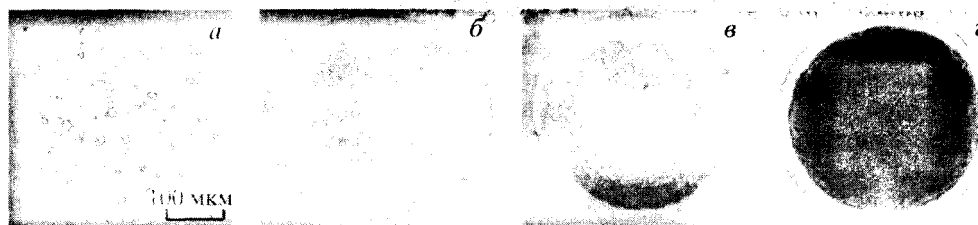
Список болезней, которые можно будет лечить в будущем с помощью такого подхода, очень широк. Отметим те, что уже описаны в литературе, например, диабет [70], анемия и гемофилия [71], дефициты некоторых лизосомальных ферментов, например дефицит β -глюкокоронидазы [72], заболевания центральной нервной системы [73]. Этот же подход может быть предложен для лечения рака или рассеянного склероза.

Инкапсулирование животных клеток - достаточно сложная задача, так как сама процедура должна протекать за несколько десятков минут и в физиологических условиях (рН, температура), чтобы сохранить как можно больше жизнеспособных клеток. Поэтому спектр полимеров, которые можно использовать для решения этой задачи (по сравнению с описанными выше по инкапсулированию лекарств, вакцин и ДНК) значительно меньше. Формирование микрокапсул обычно осуществляют с помощью противоположно заряженных полимеров, причем понятно, что все ранее описанные требования к этим материалам сохраняются, а добавляется фактор времени: мембрана должна формироваться в присутствии живых клеток как можно быстрее. Самая распространенная пара полиэлектролитов - альгинат и поли-L-лизин. Совсем недавно было показано, что поли-L-лизин может провоцировать нежелательный провоспалительный эффект в концентрациях выше 0,02% [74]. Однако использование таких низких концентраций не позволяет получить стабильные мембраны, поэтому в некоторых работах предложено использовать мультислойные мембраны [73], технология получения которых предполагает существенное удлинение процедуры инкапсулирования, что может отрицательно влиять на сохранение жизнеспособности клеток. Поэтому хитозан представляется одним из наиболее перспективных материалов в ближайшем будущем, которые найдут применение для микрокапсулирования животных клеток с целью их дальнейшей имплантации.

В настоящее время внимание исследователей сосредоточено в основном на изучении механизма взаимодействия альгината с хитозаном при формировании мембраны [75], исследовании механической стабильности и проницаемости мембраны микрокапсул, полученных различными методами [76].

Кроме того показано, что комплекс альгинат-хитозан прочнее комплекса альгинат-поли- β -лизин. Недостатком хитозана по сравнению с поли-L-лизином является его плохая растворимость при нейтральных рН, т.е. в физиологических условиях, которые так необходимы при инкапсулировании клеток. Одним из решений проблемы может быть использование олигохитозанов с ММ 2000-10000 Да, которые можно, например, получить методом радикальной дегградации коммерческих хитозанов [76] или ферментативной деполимеризацией хитинолитическим комплексом [77, 78]. В нашей работе был использован хитозан с ММ 30000 Да и степенью деацетилирования 97%, полученный методом твердофазного деацетилирования [79]. Альгинат-хитозановые микрокапсулы формировали в две стадии: 1) получали Са-альгинатные гранулы, покрытые хитозаном, с иммобилизованными в них клетками, и 2) растворяли альгинатное ядро с помощью натриевой соли ЭДТА или цитрата натрия [80].

Было показано, что механическая прочность микрокапсул определяется в значительной степени толщиной полученной мембраны, которая в свою оче-



Динамика роста СНО клеток в альгинат-хитозановых микрокапсулах

а - сразу после инкапсулирования, б-г - на 5-й, 12-й и 21-й день соответственно

редь, зависит прежде всего от pH раствора хитозана и времени инкубирования Са-альгинатных гранул в этом растворе. Как и ожидали, толщина мембраны уменьшалась при увеличении величины pH и увеличивалась при возрастании времени инкубирования гранул в растворе хитозана. В микрокапсулы были иммобилизованы клетки перевиваемой линии яичника китайского хомячка (СНО), которые после их трансфекции могут использоваться в качестве продуцентов различных генно-терапевтических продуктов в частности белка - эндостатина, который может использоваться в терапии рака, или р-интерферона для лечения рассеянного склероза. Динамика роста клеток в микрокапсуле в процессе их длительного культивирования представлена на рисунке [80].

Таким образом, показано, что альгинат-хитозановые микрокапсулы можно использовать для длительного культивирования клеток *in vitro*. В ближайшем будущем планируется разработать методы инкапсулирования различных генетически модифицированных (трансфицированных) клеточных линий, в частности продуцентов белка эндостатина, который может использоваться для лечения раковых заболеваний, и цитокина р-интерферона для терапии рассеянного склероза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Levine R., Agren M., Mertz P. // *J. Cut. Med. Surg.*, 1998. V. 2. P. 193-198.
2. Bradley M., Cullum N., Nelson E.A. et al. // *Health Technol. Assess.* 1999. V. 3, P. 90-103.
3. Вурник А.Д., Скокова И.Ф., Юданова Т.Н. и др. // *Прикл. Биохим. Микробиол.*, 1996. Т. 32. С. 615-619.
4. Kushwaha V., Bhowmick A., Behera B.K., Ray A.R. // *Artif. Cells Blood. Substit. Immobil. Biotechnol.*, 1998. V. 26. P. 159-172.
5. Natsume T., Ike O., Okada T. et al. // *J. Biomed. Mater. Research*, 1993. V. 27. P. 867-875.
6. Young T. // *Community Nurse*, 1998. V. 4. P. 47-48.
7. Rowley J.A., Madlambayan G., Mooney D.J. // *Biomaterials*, 1999. V. 20. P. 45-33.
8. Draye J.P., Delaey B., Van de Voorde A. et al. // *Ibid.* 1998. V. 18. P. 1677-1687.
9. Agren M. // *Acta Derm. Venereol.*, 1998. V. 78. P. 119-122.
10. Segal H., Hunt B.J. // *J. Biomater. Appl.*, 1118. V. 12. P. 249-257.
11. Ueno H., Yamada H., Tanaka I. et al. // *Biomaterials*, 1999. V. 20. P. 1407-1414.
12. Loke W.K., Lau S.K., Yong L.L. et al. // *J. Biomed. Mater. Res*, 2000. V. 53. P. 8-17.
13. Muzarelli R.A.A. *Chitin*. Oxford: Pergamon Press. 1977. 309 с
14. Ueno H., Mori T., Fujinaga T. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001. V. 52. N 2. P. 105-115.
15. Воспаление. Руководство для врачей / Под ред. В.В. Серова и В.С. Паукова. М.; Медицина, 1995. 640 с.
16. Regan M.C., Barbul A. // *Wound healing* / Ed. G. Schlag and H. Redl. N.-Y.-Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, 1994. P. 3-17.
17. Olsen R., Schwartzmiller D., Weppner W., Winandy R. // *Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and applications* / Ed. by G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, P. Sandford. L., N.Y.: Elsevier Applied Science, 1989. P. 813-828.

18. Peh K., Khan T., Gh'ing H. // J. Pharm. Pharm. Sci. 2000. V. 3. N 3. P. 303-311.
19. Mi F.L., Tan Y.C., Liang H.C. et al. // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 2001. V. 12. N. 8. P. 835-850.
20. Смирнова Л.А., Сергеева М.В., Пастухова Н.В. и др. // Материалы Шестой Междунар. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 2001. С. 57-58.
21. Вухореев Г.А., Зоткин М.А., Агеев В.П. и др. // Там же. С. 14-18.
22. Yan X., Khor T., Lim L.Y. // Chem. Pharm. Bull. 2000. V. 48. N 7, P. 941-946.
23. Kim H.J., Lee H.C., Oh J.S. et al. // J. Biomater. Sci. Polym. Ed., 1999. V. 10. N 5, P. 543-556.
24. Ofori-Kwakye K., Fell J.T. // Int. J. Pharm. 2001. V. 226. N 1-2. P. 139-145.
25. Ameer G.A., Harmon W., Sasisekharan R., Longer R. // Biotechnol. Bioeng., 1999. V. 62. P. 602-608.
26. Alvarez O.A., Zimmerman G. // Med. Pediatr. Oncol., 2000. V. 34. P. 200-205.
27. Markvicheva E.A., Kuptsova S.V., Mareeva T.Yu. и др. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2000. V. 88. N 1-3. P. 145-157.
28. Strukova S.M., Dugina T.N., Chistov I.V. et al. // Clin. Appl. Thrombosis/Hemostasis. 2001. V. 7. N 4. P. 325-329.
29. Naldini A., Sower L., Bocci V. et al. // J. Cell. Physiol. 1998. V. 177. P. 76-84.
30. Chambers R.C., Dabbagh K., McAnulty R.J. // Biochem. J. 1998. V. 333. P. 121-127.
31. Stiernberg J., Redin W.R., Carney D.H. // Thromb. Haemost. 1993. V. 70. P. 158-162.
32. Carney D.H., Redin W., McCroskey L. // Semin Thromb. Hemost. 1992. V. 18. P. 91-103.
33. Dabbagh K., Laurent G.J., McAnulty R.J., Chambers R.C. // Thromb. Haemost. 1998. V. 79. P. 405-409.
34. Scardino M.S., Swaim S.F., Morse B.S. et al. // J. Biomed. Mater. Res. 1999. V. 48. P. 315-321.
35. Dunn C.J., Goa K.L. // Drugs. 1999. V. 58. P. 863-886.
36. Тихонов В.Е., Краюхина М.А., Гнатюк Н.Г. и др. // Материалы Шестой Междунар. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО. 2001. С. 235-236.
37. Tanaka T. // Phys. Rev. Lett. 1978. V. 40. P. 820-823.
38. Nirokawa Y., Tanaka T. // J. Chem. Phys. 1984. V. 81. P. 6379-6380.
39. Matsukata M., Takei Y., Aoki T. et al. // J. Biochem. (Tokyo), 1994. V. 116. P. 682-686.
40. Hoffman A.S., Afrassiabi A., Dong L.C. // J. Controlled Release. 1986. V. 4. P. 213-222.
41. Kokufuta E., Zhang Y.-Q., Tanaka T. // Nature. 1991. V. 351. P. 302-304.
42. Lim S.T., Forbes B., Berry D.J. et al. // Int. J. Pharm. V. 23. N 1. P. 73-82.
43. Bodek K.H. // Acta Pol. Pharm., 2001. V. 58. N 3. P. 185-194.
44. Janes K.A., Fresneau M.P., Marazuela A. et al. // J. Control Release 2001. V. 15. N 73 (2-3), P. 255-267.
45. Tozaki H., Fujita T., Terabe A., Okabe S. et al. // J. Pharm. Pharmacol. 1999. V. 51. N 10. P. 1107-1112.
46. Ramadas M., Paul W., Dillep K.J. et al. // J. Microencapsul. 2000. V. 17. N 4. P. 405-411.
47. Tozaki H., Komoike J., Tada C et al. // J. Pharm. Sci. 1997. V. 86. N 9. P. 1016-1021.
48. Gutovska A., Jeon B., Jasionowski M. // The Anatomical Records. 2001. V. 263. P. 342-349.
49. Chupa J.M., Foster A.M., Sumner S.R. et al. // Biomaterials. 2000. V. 21. N 22. P. 2315-2322.
50. Richardson T.P., Petrs M.C., Ennett A.B., Mooney D.J. // Nature Biotechnology 2001. V. 19. P. 1029-1034.
51. Chandy T., Das G.S., Rao G.H. // J. Microencapsulation. 2000. V. 17. N 5. P. 625-638.
52. Hasegawa M., Yagi K., Iwakawa S., Hirai M. // Jpn. J. Cancer Res. 2001. V. 92. N 4. P. 459-466.
53. Chen S.C., Jones D.H., Fynan E.F. et al. // J. Virol. 1998. V. 72. P. 5757-5761.
54. Fassano A. // Trends in Biotechnol. 1998. V. 16. P. 152-157.
55. Bowersock T.L., Hogen E. H., Suckow M. et al. // Vaccine. 1999. V. 17. P. 1804-1811.
56. Cleland J.L. // Tibtech. 1999. V. 17. P. 25-29.
57. Van der Lubben I.M., Verhoef J.C., Borchard G., Junginger H.E. // Eur. J. Pharm. Sci. 2001. V. 14. N 3. P. 201-207.
58. Ilium L., Jabbal-Gill L., Hinchcliffe M. et al. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2001. V. 51. N 1-3. P. 81-96.
59. Le Buanes H., Vetu C, Lachgar A. et al. // Biomed. Pharmacother. 2001. V. 55. N 6. P. 316-320.
60. Oudrhiri N., Vigneron J.P., Peuchmaur M. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1997. V. 94. P. 1651-1656.
61. Kikuchi A., Aoki Y., Sugaya S., Serikawa T. et al. // Hum. Gene Ther. 1999. V. 10. P. 947-955.
62. Vitiello L., Bockhold K., Joshi R.B., Worton R.G. // Gene Ther. 1998. V. 5. P. 1306-1313.
63. Zuidam N.J., Barenholz Y. // Int. J. Pharm. 1999. V. 183. P. 43-46.
64. Koping-Hoggard M., Tubulekas I., Guan H. et al. // Gene Ther. 2001. V. 8. N 14. P. 1108-1121.
65. Mao H.Q., Roy K., Troung-Le V.L. // J. Control. Release. 2001. V. 23. N 3. P. 399-412.

66. Lee M., Hah J.W., Kwon Y. et al. // Pharm. Res. 2001. V. 18. N 4. P. 427-431.
67. Wang Shu, Ma N., Gao S.J. et al. // Mol. Ther. 2001. V. 3. N 5. P. 658-664.
68. Ishii T., Okahata Y., Sato T. // Biochim. Biophys. Acta. 2001. V. 1514. N 1. P. 51-64.
69. Park I.K., Kim T.H., Park Y.H. et al. // J. Control Release 2001. V. 19. N 76. P. 349-362.
70. Sakai S., Ono T., Ijima H., Kawakami K. // J. Microencapsulation 2000. V. 17. N 6. P. 691-699.
71. Hortelano G., Chang P. // Art. Cell Blood Subs, and Immob. Biotechnol. 2000. V. 28. N 1. P. 1-24.
72. Ross C J., Bastedo L., Maier S.A. et al. // Hum. Gene Ther. 2000. V. 11. N 15. P. 2117-2127.
73. Ross C J., Ralph M., Chang P. Ibid. 1999. V. 10. N 1. P. 49-59.
74. Strand B.L., Ryan L., Veld P.I. et al. // Cell Transplantation. 2001. V. 10. P. 263-275.
75. Gaserod O. // Biomaterials 1998. V. 19. P. 1815-1825.
76. Bartkowiak A., Hungeler D. // Chemistry of Materials. 2000. V. 12. N 1. P. 206-212.
77. Varum K.M., Holme H.K., Hume M. // Biochim. Biophys. Acta. 1996. V. 1291. N 8. P. 5-15.
78. Ильина А.В., Варламов В.П. // Материалы Шестой Междунар. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 2001. С. 280-283.
79. Пат. 1760749 РФ. С08В37/08.
80. Марквичева Е.А., Купцова С.В., Вухорева Г.А., и др. // Там же. С. 212-216.

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ХИТОЗАНА

С.Н. Чирков

Институт микробиологии РАН, Москва

Одной из уникальных биологических активностей хитозана является его способность индуцировать устойчивость к вирусным заболеваниям у растений, ингибировать вирусные инфекции у животных и предотвращать развитие фаговых инфекций в зараженной культуре микроорганизмов. Ниже будут рассмотрены данные о влиянии хитозана на вирусные инфекции у микроорганизмов, растений и животных, проанализировано влияние на противовирусную активность хитозана таких факторов, как средняя степень полимеризации (средняя молекулярная масса), степень N-деацетилирования, величина положительного заряда и характер химических модификаций молекулы. Обсуждаются возможные механизмы подавления вирусных инфекций хитозаном.

ВЛИЯНИЕ ХИТОЗАНА НА ФАГОВЫЕ ИНФЕКЦИИ

Хитозан, добавленный в питательную среду, препятствует размножению вирулентных бактериофагов в зараженной культуре грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что выход инфекционных ДНК-содержащих фагов в присутствии хитозана может снижаться на несколько порядков [1-3].

Степень подавления инфекции зависит от вида бактериофага и вида микроорганизма, от состава питательной среды, а также от концентрации хитозана и его физико-химических свойств. Так хитозаны со степенью полимеризации 250 и выше значительно сильнее ингибировали колифаговые инфекции, чем их фрагменты со степенью полимеризации $CD = 15-19$ [4]. С другой стороны, олигомеры хитозана более эффективно, чем их полимерный предшественник, предотвращали размножение фага 1-97A в культуре *Bacillus thuringiensis* [5].

Была исследована также активность нескольких дезаминированных производных хитозана, которые отличались степенью дезаминирования (от 10 до 50%) и степенью полимеризации (от 28 до 4, соответственно). Способность этих производных подавлять развитие инфекций, вызываемых бактериофагами T2, T7 и 1-97A, не зависела от степени дезаминирования [4, 5].

Таблица 1. Ингибирование фаговых инфекций высокополимерным хитозаном*

Микроорганизм	Бактериофаг	Концентрация хитозана, мкг/мл	Выход бактериофага, % от контроля
<i>E. coli</i> , штамм В1	Т2	100	10^{-4}
		10	4,5
		1	75,1
	Т7	100	2×10^{-2}
		10	3×10^{-2}
		1	50,2
<i>B. thuringiensis subsp galleriae</i> штамм 1-97	1-97А	100	10^{-3}
		10	10^{-2}
		1	84,8
	1-97В	100	0,1
		10	24,2
		1	72,5
<i>G. oxydans</i> , штамм 15	Gs2, Gs3, Gs5,	30	10^{-6} – 10^{-5}
	Gs10	3	0,1–1

* Хитозан, полученный из криля. Степень полимеризации 250 (в опытах с фагами *E. coli* и *B. thuringiensis*) и 600 (в опытах с фагами *G. oxydans*). Степень деацетилования хитозана 81%.

Анионные производные 6-О-сульфат хитозана и N-сукцинат-6-О-сульфат хитозана не влияли на развитие фаговых инфекций [4, 5]. Вероятно, положительный заряд молекулы хитозана имеет важное значение для подавления инфекции.

Предполагается, что хитозан препятствует размножению бактериофагов несколькими путями: а) снижая жизнеспособность бактериальной культуры; б) нейтрализуя инфекционность зрелых фаговых частиц в инокулюме и/или дочерних фаговых частиц; в) блокируя процесс репродукции вирулентного фага [4].

Состояние бактериальной культуры имеет первостепенное значение для развития фаговой инфекции, потому что фаги способны размножаться только в жизнеспособных клетках. Вместе с тем, известно, что хитозан обладает бактерицидными свойствами в отношении многих видов микроорганизмов, в том числе в отношении *Escherichia coli* и клеток рода *Bacillus* [6, 7]. Предполагается, что бактерицидная активность хитозана может быть опосредована двумя механизмами. Согласно первому из них связывание хитозана с отрицательно заряженными структурами клеточной поверхности (липидом А, тейхоевыми кислотами, полярной группой фосфолипидов) приводит к усилению проницаемости и дезинтеграции клеточной стенки и плазматической мембраны микроорганизмов [6, 8, 9]. Второй механизм предполагает, что молекулы хитозана проникают в клетку и, электростатически связываясь с ДНК, ингибируют транскрипцию [6].

Исследование бактерицидной активности различных форм хитозана, эффективно подавлявших фаговые инфекции, показало следующее. Ни один из изученных препаратов хитозана или его производных не влиял на жизнеспособность культуры *B. thuringiensis* [2, 5]. Хитозан CD = 250 обладал заметной бактерицидной активностью в отношении культуры *E. coli*, в то время как его олигомеры ингибировали рост культуры только в первые минуты инкубации, а затем рост возобновлялся и достигал контрольного уровня [1, 4]. Не обнаружено влияния высокополимерного хитозана на рост культуры другого грамотрица-

тельного микроорганизма *Gluconobacter oxydans* [3]. Таким образом, бактерицидная активность хитозана, очевидно, не является фактором, определяющим его способность ингибировать фаговые инфекции.

В то же время, было обнаружено, что хитозан, добавленный к фаговой суспензии, снижает ее титр, т.е. каким-то образом нейтрализует инфекционность фаговых частиц. При этом олигомеры хитозана снижали титр суспензии фагов T2, T4 и T7 значительно сильнее, чем их полимерный предшественник в такой же концентрации [10]. Наоборот, высокополимерный хитозан намного эффективнее, чем его фрагменты, понижал инфекционность фага 1-97A [5]. Следует отметить, что дезаминированные хитозаны инактивировали колифаги слабее, чем их немодифицированные аналоги с такой же степенью полимеризации. С повышением степени дезаминирования инактивирующая активность в отношении фагов T2 и T7 понижалась, так что производное хитозана, дезаминированное на 50%, вообще не обладало такой активностью [10].

Электронномикроскопические исследования показали, что добавление хитозана к суспензии фаговых частиц вызывает заметные изменения структуры фагов. У фага 1-97A наблюдали распад частиц на головку и отросток и выход ДНК из фаговой головки. В случае фага T2 наблюдали сокращение чехла отростка, не сопровождавшееся инъекцией фаговой ДНК, и утрату длинных хвостовых фибрилл [10, 11]. Очевидно, что такие изменения структуры фаговых частиц ведут к потере их инфекционности. Другим важным результатом взаимодействия хитозана с фагом 1-97A является агрегация интактных частиц или отдельных отростков в районе базальной пластинки. Предполагается, что агглютинирующим агентом является хитозан. Не исключено, что именно связывание хитозана с базальной пластинкой, в которой локализованы рецептор-распознающие фаговые белки, провоцирует выход ДНК из фаговой частицы в отсутствие клетки-хозяина. Обусловлено ли это тем, что остатки глюкозамина являются crucialной структурой фагового рецептора, или имеет место неспецифическое взаимодействие хитозана с базальной пластинкой, еще предстоит выяснить [11].

Важно подчеркнуть, что степень выраженности структурных изменений фаговых частиц, наблюдаемых под электронным микроскопом, в целом, соответствовала уровню их инактивации, выявляемому при определении титра фаговой суспензии. Таким образом, инактивация играет важную роль в подавлении фаговых инфекций.

Вместе с тем, очевидно, что способность хитозана предотвращать развитие фаговых инфекций опосредована также и другими механизмами. Так, обнаружены производные хитозана, которые не влияли ни на рост культуры микроорганизмов, ни на фаговые частицы, но, тем не менее, ингибировали инфекционный процесс. Такими свойствами обладали, например, гидрохлорид хитозана [1, 2] и производное, дезаминированное на 50% (степень полимеризации 4) [4, 10]. Обнаружено также, что способности хитозана ингибировать инфекцию и инактивировать фаговые частицы не коррелируют между собой. Так, хитозан со степенью полимеризации 19 эффективно инактивировал фаг T2, однако сравнительно слабо ингибировал размножение фага. Напротив, хитозан со степенью полимеризации 250 практически не инактивировал фаги T2 и T7, однако препятствовал их репродукции [4, 10]. Олигомеры хитозана эффективно ингибировали размножение фага 1-97A в культуре бацилл, но слабо инактивировали зрелые фаговые частицы. В то же время высокополимерный хитозан, возможно, ингибировал фаговую инфекцию в основном за счет инактивации частиц фага 1-97A [5]. Чем бы ни объяснялись эти результаты, они недвусмысленно показы-

вают, что хитозан подавляет фаговые инфекции не только за счет инактивации фаговых частиц, но и препятствуя репродукции бактериофагов.

Пока неизвестно, какой из этапов репродукции является мишенью для действия хитозана. Установлено, что хитозан, добавленный в культуру сразу после завершения адсорбции фага, действует столь же эффективно, как и хитозан, внесенный до заражения [1, 2]. Поэтому представляется маловероятным, что хитозан ингибирует инфекцию, препятствуя адсорбции фага. Ряд данных указывает на то, что хитозан влияет на какие-то внутриклеточные стадии репродукции бактериофагов. Так олигомер хитозана, добавленный к зараженной культуре *B. thuringiensis* после завершения адсорбции фага 1-97А и лишенный возможности, в силу условий опыта, инактивировать дочерние фаговые частицы, полностью блокировал развитие инфекции. В то же время в его присутствии синтезировались неинфекционные фаговые частицы, лишенные ДНК [11]. Кроме того, обнаружено, что хитозан препятствовал индукции профага и предотвращал последующий лизис культуры *B. thuringiensis* [2]. Учитывая, что репликация фаговой ДНК и морфогенез фаговых частиц тесно связаны с мембранами [12], можно предположить, что ингибирование репродукции бактериофагов опосредовано влиянием хитозана на клеточные мембраны микроорганизмов.

Таким образом, основными причинами подавления фаговой инфекции хитозаном являются инактивация фаговых частиц и ингибирование репродукции бактериофагов на внутриклеточном уровне. Относительный вклад каждого из этих компонентов зависит от структуры молекулы хитозана и вида бактериофага.

Важно отметить, что, препятствуя размножению вирулентных бактериофагов в зараженной культуре микроорганизмов, хитозан предотвращал фаголизис культуры [1-3]. При этом хитозан не влиял, например, на сорбозо-продукцирующую активность *G. oxydans* [3]. Вполне вероятно, что хитозан может быть использован для индукции фагорезистентности в культурах промышленных микроорганизмов для предотвращения нежелательного фаголизиса, происходящего из-за контаминации инокулюма вирулентным бактериофагом или спонтанной индукции профага в лизогенной культуре.

ВЛИЯНИЕ ХИТОЗАНА НА ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

Обработка растений раствором хитозана (опрыскивание, полив или инъекции в листовую ткань) повышает устойчивость растений к заражению фитопатогенными вирусами. У растений с доминантным геном устойчивости к вирусу, которые реагируют на заражение образованием местных некрозов, это выражается в уменьшении количества некрозов, возникающих после заражения. У растений - системных хозяев вируса - хитозан ингибирует распространение вирусов и вириона по растению, так что значительная часть или все обработанные хитозаном растения перестают заражаться вирусом.

Данные табл. 2 показывают, что хитозан подавляет вирусную инфекцию на 11 видах растений, относящихся к семействам бобовых, пасленовых, маревых и амарантовых [13-20]. В таблице указаны в основном виды растений, используемые для лабораторной работы с вирусами. Не вызывает сомнений, что количество видов, у которых можно индуцировать противовирусную устойчивость с помощью той или иной формы хитозана, в действительности значительно больше.

Таблица 2. Противовирусная активность хитозана в растениях

Растение	Вирус	Тип инфекции
Фасоль <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	ВМЛ	с/мн
	ВЗМФ	с
	ВКА	с/мн
	ВНТ	мн
	ВТМ	мн
	ВЖМФ	с
	ВОМФ	с
Горох <i>Pisum sativum</i> L.	ВМЛ	с
	ВКА	с
Табаки:		
<i>Nicotiana tabacum</i> L. сорт Самсун NN	ВТМ	мн
	ВМЛ	мн
	сорт Самсун nn	с
	сорт Ксанти nc	мн
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	ВТМ	мн
<i>Nicotiana paniculata</i> L.	ВКА	мн
Томаты <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	ВТМ	с
	ХВК	с
	ВВКК	с
Картофель <i>Solanum tuberosum</i> L.	ХВК	с
	УВК	с
Лебеда <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	ВНТ	мн
	ВОМ	мн
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coult et Rose	ВТМ	мн
	ВМЛ	мн
Дурман <i>Datura stramonium</i> L.	ВМН	с
	ВТМ	мн
Гомфрена <i>Gomphrena globosa</i> L.	ХВК	мн

ВМЛ – альфавирус мозаики люцерны; ВЗМФ – геминивироз золотистой мозаики фасоли; ВКА – комовирус карликовости арахиса; ВНТ – некротизированный вирус некроза табака; ВТМ – тобамовирус табачной мозаики; ХВК – потексвирус Х картофеля; УВК – потивирус Y картофеля; ВМН – каулимовирус мозаики норичника; ВОМ – кукумовирус огуречной мозаики; ВЖМФ – потивирус желтой мозаики фасоли; ВОМФ – потивирус обычной мозаики фасоли; ВВКК – вирион веретеновидности клубней картофеля.

с – системная инфекция; мн – местные некрозы.

Следует подчеркнуть, что обработка растений хитозаном препятствовала их заражению вирусами, существенно различающимися по структуре вирусной частицы и механизмам экспрессии генома, и заражению вириоидом веретеновидности клубней картофеля. Представляется весьма вероятным, что хитозан подавляет инфекцию независимо от вида вируса. Таким образом, ни вид вируса, ни тип реакции растения на вирусное заражение, по-видимому, не имеют значения для проявления противовирусной активности хитозана. Однако были выявлены и изучены некоторые факторы, существенно влияющие на эффективность его действия.

Одним из важнейших факторов является вид растения. Растения из семейства бобовых (фасоль и горох) приобретают высокий уровень устойчивости к заражению различными вирусами после однократной обработки растворами с низкой концентрацией хитозана, и сохраняют этот уровень в течение продолжительного времени. Выраженное ингибирование инфекции имело место даже тогда, когда время контакта раствора хитозана с поверхностью листа фасоли не превышало 5 мин [14]. Более того, с тем же успехом растения фасоли могут быть обработаны даже спустя несколько часов после заражения [13]. В то же время, растения семейства пасленовых (табаки, дурман, картофель, томаты) менее восприимчивы к обработке хитозаном. Даже многократная обработка растений этих видов растворами с высокой концентрацией хитозана не приводит к полному подавлению вирусной инфекции [14-16, 19]. Наконец, у гибридного редиса *Brassica campestris* (семейство крестоцветных) не удалось индуцировать устойчивости к системному заражению каулимовирусом мозаики цветной капусты, потивирусом мозаики турнепса и комовирусом мозаики редиса [15]. Эти результаты показывают, что противовирусная активность хитозана опосредована его влиянием на растение. Причины различий в восприимчивости растений разных видов к обработке хитозаном не изучались и пока остаются неизвестными.

Противовирусная активность определяется также свойствами хитозана. С одной стороны, степень подавления вирусной инфекции прямо зависит от его концентрации. Например, при концентрации высокомолекулярного хитозана 0,1 мг/мл от трети до половины обработанных растений картофеля и томатов приобретали устойчивость к системному заражению вирусом Х картофеля (ХВК) или вирусом табачной мозаики (ВТМ), в то время как при концентрации 1 мг/мл становились устойчивыми уже около 80% растений [19]. С другой стороны, при концентрации хитозана 0,1 мг/мл полностью подавляется и системная, и местная инфекция вируса мозаики люцерны (ВМЛ) на фасоли, а подавление инфекции на 30-50% достигается при использовании концентрации хитозана 0,001 мг/мл [13, 14]. Во-вторых, противовирусная активность зависит от молекулярной массы хитозана. Высокомолекулярные хитозаны эффективнее, чем олигомеры, подавляли инфекции, вызываемые различными вирусами в растениях фасоли [21]. При подавлении инфекции ХВК в растениях картофеля крилевый хитозан ММ 120 кДа обладал более высокой активностью, чем хитозаны с ММ: 3 и 36 кДа, полученные из краба [22]. Вместе с тем, деполимеризация высокомолекулярных хитозанов хитиназами гриба *Aspergillus fumigatus* значительно повышала их активность при подавлении местных некрозов, образующихся при заражении растений табака ВТМ [23, 24].

Степень деацетилирования хитозана, в пределах 60-98%, не влияла на противовирусную активность хитозана в опытах на растениях фасоли [25], но, по-видимому, имела значение в опытах на растениях картофеля [22]. Таким образом, зависимость противовирусной активности от концентрации и от молекулярной массы хитозана, как и от степени деацетилирования, по-разному проявляется на различных видах растений. Эти результаты тоже позволяют предположить, что противовирусная активность хитозана опосредована его влиянием на растение.

Из всех изученных до настоящего времени производных хитозана самой низкой активностью обладали анионные производные, такие, как карбоксиметилхитозан, сульфат хитозана и б-О-сульфат-N-сукцинат хитозана. По-видимому, величина положительного заряда молекулы хитозана непосредственным образом сказывается на его противовирусной активности [17, 20, 21, 25]. Наи-

большей же активностью из всех изученных обладали дезаминированные производные хитозана [21, 25]. Поскольку при дезаминировании в месте разрыва полимерной цепи образуется новая структура 2,5-ангидроманнозы, предполагается, что наличием именно этого терминального остатка и определяется повышенная активность дезаминированных производных [21].

Следует отметить, что при температуре воздуха более 40 °С устойчивость, индуцированная хитозаном в растениях фасоли, заметно ослабевает. Таким образом, механизм противовирусной устойчивости, индуцированной хитозаном, является температуро-чувствительным [20].

Приведенные выше данные показывают, что способность хитозана подавлять вирусные инфекции опосредована его влиянием на растение. Известно, что хитозан, имитируя контакт растения с фитопатогеном, индуцирует широкий спектр защитных реакций [26, 27]. Некоторые из них могут влиять на вирусную инфекцию, например, снижать эффективность механической инокуляции вирусом, препятствовать размножению вирусов в зараженных клетках и/или распространению вируса по растению.

Благодаря катионной природе, хитозан может взаимодействовать с анионными компонентами биомембран и клеточных стенок, такими как фосфолипиды и пектины [28-30]. Предполагается, что такое взаимодействие затрудняет необходимую для начала инфекции адсорбцию вируса на клеточной стенке [20]. Известно также, что взаимодействие хитозана с полярной группой фосфолипидов плазмалеммы приводит к усилению проницаемости клеточной мембраны. При малых экспозициях наблюдают изменение трансмембранных ионных потоков (выход K^+ и повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} , защелачивание внешней среды), синтез каллозы и стимулирование вторичного метаболизма. При повышении концентрации хитозана, увеличении степени его полимеризации или времени инкубации клеточной культуры с хитозаном, проницаемость мембраны может усиливаться настолько, что наступает гибель клеток. Важно отметить, что эти эффекты наблюдали в суспензионной культуре клеток различных видов растений, когда клетки окружены полноценной клеточной стенкой. Вероятно, аналогичные процессы происходят и в интактном листе. Так после инъекции хитозан индуцировал образование местных некрозов в листьях пшеницы *Triticum aestivum*. Самые массивные некрозы наблюдали после инъекции хитозана ММ 96 кДа и степенью деацетилирования 65%. Хитозан со степенью деацетилирования 99% и ММ 170 кДа оказался менее активен. Не вызывали образования некрозов полностью деацетилированные олигомеры хитозана с ММ 1-1,5 кДа [31]. Таким образом, весьма вероятно, что обработка хитозаном приводит к уменьшению количества клеток, доступных для первичного заражения. Этим может объясняться и уменьшение количества местных некрозов на обработанных хитозаном листьях, и замедление системного распространения вируса по растению.

Снижение эффективности инокуляции не является единственной причиной подавления вирусной инфекции. Хитозан инициирует защитные реакции, которые могут препятствовать размножению вирусов в зараженных клетках. Например, в культуре протопластов табака хитозан индуцирует синтез клеточного белка ММ 130 кДа, являющимся, предположительно, РНК-зависимой РНК-полимеразой [32]. Предполагают, что этот фермент играет ключевую роль в механизме посттранскрипционного замалчивания генов посредством деградации матричных РНК, в том числе и РНК вирусов растений [33]. Установлено также, что хитозан влияет на активность рибонуклеаз в обработанных листьях картофеля, в частности, индуцирует рибонуклеазу ММ 23 кДа. При этом

обнаружена корреляция между динамикой рибонуклеазной активности и динамикой устойчивости к заражению ХВК [22]. Очевидно, что рибонуклеазы могут вызывать деполимеризацию вирусных РНК и препятствовать их транскрипции и трансляции.

Вероятно, хитозан затрудняет распространение вируса по растению. Как известно, для межклеточного транспорта вирус использует, с одной стороны, плазмодесмы, а дальний транспорт вирусных частиц осуществляется по сосудам флоэмы [34]. С другой стороны, хитозан индуцирует синтез каллозы (β -1,3-глюкозы) в клетках растений [28, 30, 35], и обнаружена корреляция между концентрацией каллозы в экстракте из обработанных листьев и степенью устойчивости к заражению ХВК [22]. Полагают, что отложения каллозы в порах ситовидных элементов флоэмы, возникающие при защитной реакции растения, механически препятствуют распространению вирусных частиц по сосудам, а внеклеточные отложения каллозы вокруг плазмодесм в виде так называемого каллозного воротника затрудняют межклеточный транспорт вируса [36-38]. Важно отметить, что синтез каллозы инициируется при поступлении внеклеточного кальция через плазматическую мембрану, повреждаемую хитозаном [35]. Другой Ca^{2+} -зависимой защитной реакцией является длительное закрывание плазмодесм, связывающих поврежденную клетку с соседними, в результате сокращения кальцийсвязывающего белка клатрина [39], что также должно существенно препятствовать межклеточному транспорту вируса в листьях обработанных хитозаном.

Важно подчеркнуть, что хитозан индуцирует не только местную (в обработанных листьях), но и системную устойчивость. Это показывают результаты опытов по заражению растений в условиях, исключающих контакт вируса с хитозаном [13, 14, 20]. При обработке хитозаном нижней поверхности листа фасоли устойчивость к заражению ВМЛ развивалась и на его верхней поверхности; при обработке нижних листьев устойчивость наблюдали также и в верхних, в том числе и в тех, которые отрастали уже после обработки; при обработке одной половины листа устойчивость развивалась не только в обработанной, но и в другой, необработанной хитозаном половине листа. Принимая во внимание, что олигомеры хитозана со степенью полимеризации более 6 не способны передвигаться по сосудам [40], можно предположить, что хитозан, контактируя с клетками эпидермиса листа, индуцирует сигнал, распространение которого по растению вызывает системную приобретенную устойчивость. Об этом же свидетельствуют, по-видимому, и данные об индукции противовирусной устойчивости высокомолекулярным хитозаном и даже нерастворимым микрокристаллическим хитозаном [41].

Роль медиатора может выполнять, например, салициловая кислота, которая является необходимым компонентом дистантного сигнала при развитии системной приобретенной устойчивости к вирусам, грибам и бактериям [42]. Показано, что обработка растений хитозаном повышает уровень эндогенной салициловой кислоты [43]. При этом конкретный механизм противовирусной устойчивости может не быть одинаковым для разных вирусов. Так, салициловая кислота препятствует системному распространению вируса огуречной мозаики по растению табака, не влияя на его репликацию или межклеточный транспорт, а при инфекции ВТМ устойчивость возникает из-за подавления синтеза вирусной РНК [44].

Следует подчеркнуть, что защитные реакции, индуцируемые хитозаном, повышают устойчивость растений не только к вирусным, но также к вирусным, бактериальным и грибным заболеваниям, усиливают нематодоустойчивость

растений и их сопротивляемость насекомым-вредителям [20, 45-47). Таким образом, хитозан способен индуцировать у растений неспецифическую болезнестойчивость широкого спектра действия и, очевидно, может быть использован как экологически безопасный пестицид для защиты растений от вредителей и заболеваний различной этиологии.

ВЛИЯНИЕ ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ НА ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ У ЖИВОТНЫХ

Десять лет назад появилось сообщение, по-видимому, первое такого рода, что N-карбоксиметилхитозан-N,O-сульфат ингибирует синтез вирусспецифических белков и подавляет размножение вируса иммунодефицита человека HIV-1 в культуре Т-клеток и в культуре моноклеарных клеток периферической крови человека, а также вируса мышшиной лейкемии Раушера в культуре мышшиных фибробластов. Было показано, что это производное хитозана препятствует взаимодействию вирусного гликопротеида gp120 (основного белка оболочки вируса) с соответствующим рецептором на Т-лимфоцитах, ингибируя адсорбцию вируса на CD4-клетках-мишенях, а также конкурентно ингибирует *in vitro* активность вирусспецифической обратной транскриптазы, препятствуя связыванию фермента с поли-А-олиго-dT-матрицей. Отмечалось практически полное отсутствие цитотоксичности производного хитозана в отношении этих клеточных культур [48]. Высокой активностью отличались производные хитозана, сульфатированные по второму и/или третьему атому кислорода в остатке глюкозамина. Эти производные эффективно ингибировали размножение HIV-1 в культуре Т-лимфоцитов человека линии MT-4, препятствуя слиянию вирусной и клеточной мембран [49]. Таким образом, синтезированы сульфопроизводные хитозана, специфически ингибирующие репродукцию вируса иммунодефицита человека. Отмечается, что, хотя способность анионных производных хитозана ингибировать ретровирусные инфекции в целом аналогична действию таких сульфополисахаридов, как гепарин, декстрансульфат и т.п., эффективность и конкретный механизм ингибирования зависят от местоположения сульфогрупп в глюкозаминовых остатках.

Важно отметить также, что хитозан ингибирует размножение хламидий *Chlamydia trachomatis* (которые, как и вирусы, также являются облигатными внутриклеточными паразитами) в клетках HeLa, угнетая, главным образом, адсорбцию паразита на клетках. С учетом способности хитозана предотвращать вирусные инфекции, передающиеся половым путем, высказано предположение, что хитозан может быть использован для комплексной профилактики и терапии урогенитальных инфекций [50].

Известны и другие механизмы, опосредующие влияние хитозана на вирусные инфекции у животных. Так, у млекопитающих хитозан стимулирует иммунный ответ на различные, в том числе и вирусные, антигены. Например, у мышей хитозан усиливал местный и системный иммунный ответ (продукцию антител классов IgA и IgG) к вирусу гриппа типа А и типа В при совместном интраназальном введении с антигеном - очищенными гемагглютинином и нейтрамидазой [51]. Такая схема может оказаться весьма перспективной при вакцинации против респираторных заболеваний, поскольку выявлена ее высокая эффективность также в отношении коклюшного [52] и дифтерийного токсинов [53]. Кроме того, наночастицы хитозана были использованы для приготовления вакцины против респираторно-синцитиального вируса [54].

Установлено, что хитозан стимулирует функциональную активность вспомогательных клеток иммунной системы, в первую очередь макрофагов. После подкожной имплантации хитозан вызывал хемотаксис макрофагов у собак и продукцию окиси азота макрофагами *in vitro*, а также стимулировал лейкоцитоз в периферической крови собак. Секреция окиси азота обусловлена преимущественно остатками N-ацетилглюкозамина в молекуле хитозана [55, 56]. Водорастворимый хитозан и у-интерферон обладали синергическим эффектом при стимулировании синтеза окиси азота и а-фактора некроза опухоли перитонеальными мышинными макрофагами [57]. Хитозан индуцирует секрецию арахидоновой кислоты макрофагами посредством стимуляции активности фосфолипазы A₂ [58]. Как известно, роль макрофагов в иммунном свете исключительно велика. Макрофаги осуществляют процессинг антигена и являются антигенпрезентирующими клетками. Их контакт с Т-хелперами инициирует гуморальный и клеточный иммунный ответ. Макрофаги выделяют медиаторы иммунного ответа, в частности, интерлейкин-1, стимулирующий пролиферацию Т-хелперов. Макрофаги осуществляют элиминацию антигена, опсонизированного антителами. По всей вероятности, адьювантная активность хитозана в значительной степени реализуется стимуляцией макрофагов и(или) непосредственно Т-хелперов [53]. Важное значение для повышения эффективности иммунного ответа имеет и стимуляция хитозаном активности гранулоцитов, преимущественно нейтрофилов [59, 60]. Кроме того, установлено, что у собак и мышей и хитин, и хитозан активируют систему комплемента по альтернативному пути [61, 62].

Обнаружено также, что фагоцитируемые частицы хитина и хитозана (но не их растворимые аналоги) вызывают усиленное образование активных форм кислорода в альвеолярных макрофагах мыши и индуцируют продукцию у-интерферона в культуре мышинных спленоцитов, обусловленную взаимодействием примированных макрофагов с природными киллерами [63]. Как известно, интерфероны подавляют размножение вирусов, нарушая способность вирионных или ранних вирусных мРНК к трансляции, влияя на иммунокомпетентные клетки и на природные клетки-киллеры. Поэтому индукция интерферона хитином и хитозаном, наряду с их влиянием на систему комплемента и мононуклеарно-фагоцитарную систему, может являться одним из важнейших компонентов неспецифического иммунного ответа, направленного на ограничение и подавление вирусной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочкина З.М., Поспешны Г., Чирков С.Н. // Микробиология. 1995. Т. 64. № 2. С. 211-215.
2. Кочкина З.М., Поспешны Г., Чирков С.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 1996. Т. 32. № 2. С. 247-250.
3. Григорьева Т.М., Кочкина З.М., Чирков С.Н., Азизбеян Р.Р. // Биотехнология. 1994. № 5. С. 14-16.
4. Кочкина З.М., Чирков С.Н. // Микробиология. 2000. Т. 69. № 2. С. 258-260.
5. Кочкина З.М., Чирков С.Н. // Микробиология. 2000. Т. 69. № 2. С. 266-269.
6. Sudarshan N.R., Hoover D.G., Knorr D. // Food Biotechnol. 1992. V. 6. № 3. P. 257-272.
7. Barrette J., Champagne C.P., Goulet J. // Appl. Environmental Microbiol. 1999. V. 65. № 7. P. 3261-3263.
8. Давыдова В.Н., Ермак И.М., Горбача В.И. и др. // Биохимия. 2000. Т. 65. № 9. С. 1278-1287.
9. Vaara M. // Microbiol. Revs. 1992. V. 56. № 3. P. 395-411.
10. Кочкина З.М., Сургучева Н.А., Чирков С.Н. // Микробиология. 2000. Т. 69. № 2. С. 261-265.
11. Кочкина З.М., Чирков С.Н. // Там же. 2001. Т. 70. № 6. С. 820-824.
12. Siegel P.J., Schaechter M. // Annu Revs. Microbiol. 1973. V. 27. P. 261-282.

13. Pospiesmy H., Atabekov J.G. // Plant Sci. 1989. V. 62. № 1. P. 29-31.
14. Pospiesmy H., Chirkov S., Atabekov J. // Ibid. 1991. V. 79. № 1. P. 63-68.
15. Chirkov S.N., Surguchova N.A., Atabekov J.G. // Arch. Phytopathol. Plant Protection. 1994. V. 29. № 1. P. 21-24.
16. Pospieszny H. // Phytopath. Polonica. 1995. V. 22. № 10. P. 69-74.
17. Pospiesmy H. // Proc. XIth Int. Plant Protection Congress. The Hague: Kluwer publ. 1995. Abstract 1305.
18. Pospieszny H. // Crop Protection. 1997. V. 16. № 2. P. 105-106.
19. Surguchova N.A., Varitsev Yu.A., Chirkov S.N. // J. Rus. Phytopathol. Soc. 2000. V. 1. № 1. P. 59-62.
20. Pospieszny H. // Chitin and Chitosan. Polish-Russian Monograph / Ed. by Struszczyk H., Pospieszny H., Gamzazade A. Lodz: Polish Chitin Society, 1999. P. 115-130.
21. Чирков С.Н., Сургучева Н.А., Гамзада А.М. и др. // Докл. РАН. 1998. Т. 360. № 2. С. 271-273.
22. Чирков С.Н., Ильина А.В., Сургучева Н.А. и др. // Физиология растений. 2001. Т. 48. № 6. С. 890-896.
23. Pospieszny H., Struszczyk H., Cajza M. // Chitin Enzymol. V. 2. Ed. by R.A.A. Muzzarelli. Sinegallia: ATEC - Edizioni - GROTTAMMARE, 1996. P. 385-389.
24. Struszczyk M.H., Pospieszny H., Schanzenbach D., Peter M.G. // Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives. V. 5. / Ed. by Struszczyk H. Lodz: Polish Chitin Society, 1998. P. 71-77.
25. Pospieszny H., Struszczyk H., Chirkov S.N., Atabekov J.G. // Chitin World. / Ed. by Karnicki Z.S., Brzaski M.M., Bykovski P.J., Wojtasz-Pajak A. Gdynia: Wirshaftsverlag NW, 1995. P. 246-254.
26. Ryan C.A., Farmer E.E. // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1991. V. 42. P. 651-674.
27. Benhamou N. // Trends Plant Sci. 1996. V. 1. № 7. P. 233-240.
28. Kauss H., Jeblick W., Domard A. // Planta. 1989. V. 178. № 2. P. 385-392.
29. Brodelius P., Funk C., Hanel A., Villegas M. // Phytochemistry. 1989. V. 28. № 10. P. 2651-2654.
30. Young D.H., Kohle H., Kauss H. // Plant Physiol. 1982. V. 70. № 5. P. 1449-1454.
31. Vender P., Varum K.M., Domard A. et al. // Ibid. 1998. V. 118. № 4. P. 1353-1359.
32. Чирков С.Н., Сургучева Н.А., Атабеков И.Г. // Докл. РАН. 1995. Т. 341. № 6. С. 836-838.
33. Schiebel W., Pelissier T., Riedel et al. // Plant Cell. 1998. V. 10. № 12. P. 2087-2102.
34. Carrington J.G., Kasschau K.D., Mahajan S.K., Schaad M.C. // Ibid. 1996. V. 8. № 10. P. 1669-1681.
35. Kohle H., Jeblick W., Poten F. et al. // Ibid. 1985. V. 77. № 2. P. 544-551.
36. Bell A.A. // Annu. Revs. Plant Physiol. 1981. V. 32. P. 21-81.
37. Knoblauch M., van Bel A.J.E. // Plant Cell. 1998. V. 10. № 1. P. 35-50.
38. Beffa R.S., Hofer R.-M., Thomas M., Meins F. // Ibid. 1996. V. 8. № 6. P. 1001-1011.
39. Overall R.L., Blackman L.M. // Trends Plant Sci. 1996. V. 1. № 9. P. 307-311.
40. Pena-Cortes H., Fisahn J., Willmitzer L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. № 10. P. 4106-4113.
41. Pospieszny H., Struszczyk H. Материалы Пятой конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. С. 59-61.
42. Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G. et al. // Plant Cell. 1996. V. 8. № 10. P. 1809-1819.
43. Sathiyambama M., Balasubramanian R. // Crop Protection. 1998. V. 17. № 4. P. 307-313.
44. Murphy A.M., Gilliland A., Wong C.E. et al. // Eur. J. Plant Pathol. 2001. V. 107. № 1. P. 121-128.
45. Васюкова И.И., Зиновьева С.В., Ильинская Л.И. и др. // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 1. С. 115-122.
46. Howe G.A., Lightner J., Browse J., Ryan C.A. // Plant. Cell. 1996. V. 8. № 11. P. 2067-2077.
47. Thaler J.S. // Nature. 1999. V. 399. P. 686-688.
48. Gama Sosa M.A., Fazely F., Koch J.A. et al. // Biochem. Biophys. Res. Comm. 1991. V. 174. № 2. P. 489-496.
49. Gama Sosa M.A., Fazely F., Koch J.A. et al. // Biochem. Biophys. Res. Comm. 1991. V. 174. № 2. P. 489-496.
50. Nishimura S., Kai H., Shinada K. et al. // Carbohydr. Research. 1998. V. 306. № 3. P. 427-433.
51. Petronio M.G., Mansi A., Gallinelli C et al. // Chemotherapy. 1997. V. 43. № 3. P. 211-217.
52. Arakawa T., Kamimura M., Miyazawa M., Kiuchi M.J. // Appl. Entomol. 2001. V. 125. № 3. P. 165-167.
53. Недосеков В.В., Селянинов Ю.О., Шинкарев С.М. и др. // Матер. VI междунар. конф. М.: ВНИРО, 2001. С. 366-367.

54. Bacon A., Makin J., Sizer P.J. et al. // *Infection and Immunity*. 2000. V. 68. № 10. P. 5764-5770.
55. Жоголев К.Д., Никитин В.Ю., Цыган В.Н., Егоров В.И. // Матер. VI междунар. конф. М.: ВНИРО, 2001. С. 163-167.
56. Jabbalghil I., Rappuoli R., Davis S.S., Ilium L. // *Vaccine*. 1998. V. 16. № 20. P. 2039-2046.
57. McNeela E.A., O'Connor D., Jabbalghil I. et al. // *Ibid*. 2000. V. 19. № 9-10. P. 1188-1198.
58. Lebuane H., Vetu C, Lachgar A. et al. // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2001. V. 55. № 6. P. 316-320.
59. Kumar M., Behera A.K., Zhang J. et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001. V. 107. № 2. P. 822.
60. Peluso G., Petillo O., Ranieri M. et al. // *Biomaterials*. 1994. V. 15. № 15. P. 1215-1220.
61. Kosaka T., Kaneko Y., Nakada Y. et al. // *J. Vet. Med. Sci.* 1996. V. 58. № 10. P. 963-967.
62. Seo W.G., Pae H.O., Kim N.Y. et al. // *Cancer Lett.* 2000. V. 159. № 2. P. 189-195.
63. Bianco I.D., Balsinde J., Beltramo D.M. et al. // *FEBS Letters*. 2000. V. 466. № 2-3. P. 292-294.
64. Usami Y., Okamoto Y., Takayama T. et al. // *Carbohydr. Polymers*. 1998. V. 36. № 2-3. P. 137-141.
65. Usami Y., Okamoto Y., Takayama T. et al. // *J. Biomed. Materials Res.* 1998. V. 42. № 4. P. 517-522.
66. Minami S., Suzuki H., Okamoto Y. et al. // Chitin and chitosan activate complement via the alternative pathway. *Carbohydr. Polymers*. 1998. V. 36. № 2-3. P. 151-155.
67. Suzuki Y., Okamoto Y., Morimoto M. et al. // *Carbohydr. Polymer*. 2000. V. 42. № 3. P. 307-310.
68. Shibata Y., Foster L.A., Metzger W.J., Myrvik Q.N. // *Infection and Immunity*. 1997. V. 65. № 5. P. 1734-1741.

ХИТОЗАН КАК ЭЛИСИТОР ИНДУЦИРОВАННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

О.Л. Озерецковская, Н.И. Васюкова

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, Ленинский проспект, 33

С.В. Зиновьева

Институт паразитологии РАН, Москва, Ленинский проспект, 33

Сельскохозяйственные растения постоянно находятся в условиях экологического стресса. Они страдают от болезней и вредителей, бесконтрольного применения пестицидов и избытка удобрений, а также других неблагоприятных факторов. Химическое и инфекционное давление на растения часто превышает порог возможностей их адаптации. В этих условиях растения просто не могут не быть иммунодефицитными. В силу этого сейчас особенно важна разработка различных средств иммунокоррекции с тем, чтобы эффективно контролировать иммунный ответ растений, преодолевая его дефицитность.

До самого последнего времени единственным способом защиты восприимчивых к болезням сортов растений являлась их обработка пестицидами. Между тем не следует забывать, что многие пестициды входят в классы соединений, среди которых встречаются мутагены и канцерогены. Часто пестициды поражают не только болезнетворные мишени, на которые направлено их действие, но и организмы, которые мишенями не являются. Некоторые, даже наиболее эффективные пестициды, обладают моносайтовым действием, вследствие чего в популяциях фитопатогенов могут накапливаться резистентные к ним формы.

Одним из наиболее перспективных способов защиты растений является метод индуцирования их устойчивости. Метод основан не на подавлении фитопатогенов, как это имеет место в случае использования пестицидов, а на индуцировании естественного потенциала растительной ткани. Поскольку каждое растение, как и любой другой организм, обладает способностью распознавать и отторгать чужеродную генетическую информацию, охраняя свою структурную и функциональную целостность [1], реальной представляется возможность индуцировать устойчивость во всех без исключения растительных сортах и видах, в том числе и восприимчивых к болезням. Создавая необходимые условия для индукции потенциала защитных систем растений, удастся наиболее полно использовать свойства их иммунитета и определяющего его генома.

Инструментом, с помощью которого удастся индуцировать иммунные системы растительной ткани, служат элиситоры или, как их раньше называли, индукторы защитных реакций. В результате обработки элиситорами в растениях индуцируется общая или неспецифическая устойчивость. Индуцированная устойчивость напоминает горизонтальную или полигенную, с той однако разницей, что последняя является генетическим признаком, тогда как индуцированная - фенотипическим. Под действием элиситоров происходит фенотипическая иммунокоррекция растений, в результате чего изменяется не геном растительной ткани, а его функционирование, связанное с уровнем экспрессии защитных генов.

В плане индуцированной устойчивости особенно перспективными являются биогенные элиситоры, представляющие собой метаболиты паразитов и их растений-хозяев, участвующие в процессах патогенеза. Индуцирование болезнеус-

тойчивости растений с помощью биогенных элиситоров характеризуется рядом преимуществ: экологической безопасностью, системностью и продолжительностью защитного действия, участием в индуцированной устойчивости многих защитных систем, что делает мало вероятным возможность адаптации патогенов к защищенным растениям, индукцией неспецифической устойчивости к ряду грибов, бактерий, вирусов, нематод и другими полезными свойствами.

Типичным примером биогенных элиситоров является хитин и его деацетилированное производное хитозан, представляющий собой поли-[b(1→4)-2-амино-2-дезоксид-D-глюкопиранозу]. И хитин, и хитозан являются нетоксичными, биоразлагаемыми, биосовместимыми полимерами. Эти свойства во многом определяют их практическое применение в медицине, косметологии, пищевой промышленности, а также в сельском хозяйстве для защиты от болезней. Эти полиаминосахариды обладают ранозаживляющими, антимутагенными, сорбционными, радиопротекторными и антираковыми свойствами [2].

Некоторым препятствием в использовании биополимеров хитина и хитозана является их плохая растворимость в воде при нейтральном значении pH. Для этих полиаминосахаридов синтезирован широкий спектр производных и продуктов деполимеризации, что помогает решить проблему их растворимости в воде или слабокислых водных растворах.

Чрезвычайно интересным представляется способность хитозана образовывать комплексы с нуклеиновыми кислотами [3]. Комплекс образуется с молекулами хитозана ММ 4-30 кДа и зависит от pH, числа NH₂-групп, а также расстояния между ними. Способность хитозана связываться с ДНК делает перспективным его использование в качестве вектора для переноса генов в процессе создания трансгенных форм [4, 5]. Возможно, что хитозан проникает внутрь ядра клетки, непосредственно взаимодействуя с ДНК и таким образом воздействуя на экспрессию генов.

Впервые элиситорные свойства хитозана были продемонстрированы Хэдвигером [6]. Им установлено, что предпосевная обработка семян растений хитозаном индуцировала у них болезнеустойчивость, утолщая и укрепляя стебель, способствуя развитию корневой системы, в результате чего растения предохранялись от полегания.

Известно, что индуцированная устойчивость растений может быть локальной и системной. Локальная устойчивость развивается только в тканях, соприкасающихся с патогеном или элиситором. Наоборот, системная устойчивость возникает по всем тканям растения или его органа, независимо от места нанесения индуцирующего агента.

Хитозан с ММ 5 кДа и СД 85% индуцировал системную и продолжительную устойчивость у картофеля к ряду специфических и неспецифических фитопатогенов. В частности, при обработке хитозаном клубней с поверхности устойчивость к возбудителю фитофтороза индуцировалась по всем тканям клубня, включая ткани сердцевинки. Фитофтороустойчивость оказалась продолжительной и распространялась как на клубни во время хранения, так и на вегетирующие растения. Более того, клубни нового урожая сохраняли остаточную устойчивость к этому патогену [7].

Близкие данные были получены на системе томаты-галловая нематода *Meloidogyna incognita* [8]. Замачивание в растворе хитозана семян томатов индуцировало системную нематодоустойчивость, которая распространялась на вегетирующие растения. Обработка семян препаратом хитозана способствовала образованию мощной корневой системы, сильного кущения и утолщения стеблей. Количество галлов в корнях снижалось вдвое, а плодовитость нематод уменьшалась в 1,5-2 раза по сравнению с контролем. При этом в популяции нематод

наблюдалось значительно большее количество самцов и личинок и существенно меньшее число половозрелых самок.

Способность вызывать у растений системную и продолжительную болезнестойчивость является чрезвычайно существенным преимуществом хитозана, что особо ценится в сельскохозяйственном производстве.

Как правило, элиситоры вызывают в растениях множественные защитные ответы, включающие образование индуцированных антибиотических веществ - фитоалексинов, индукцию PR-белков, ингибиторов протеиназ, активных форм кислорода и азота, уплотнение клеточной стенки путем синтеза лигнина, каллозы и гликопротеинов с высоким содержанием оксипролина. За исключением каллозы, синтез которой осуществляется каллозосинтетазой [9], индукция всех защитных белков в ответ на повреждение вызывается транскрипционной активацией соответствующих генов и, как следствие, коррелирует с экспрессией этих генов в растениях [10]. Хитин и хитозан индуцируют в растениях многие из перечисленных выше защитных ответов.

Так упомянутое выше укрепление и утолщение клеточной стенки связано с активизацией процесса лигнификации. Возможно, что повышенное образование лигнина связано со способностью хитина образовывать комплексы с анионной пероксидазой, участвующей в процессе лигнификации [11]. Установлено, что анионная пероксидаза связывается с хитином по ацетильным группам последнего. Хитозан в отличие от хитина имеет малое число ацетильных групп или не имеет их совсем, тем не менее способность хитозана вызывать утолщение стеблей была продемонстрирована на примере ряда растений [12].

Способность хитозана индуцировать фитоалексины у растений была установлена на системах картофель-возбудитель фитофтороза и томаты-галловая нематода [7]. Обе системы, несмотря на таксономическую разобщенность патогенов, имеют много общего. И томаты, и картофель принадлежат к одному и тому же семейству *Solanaceae*, поэтому образуют несколько близких по структуре фитоалексинов сесквитерпеноидной природы. К их числу принадлежит сесквитерпеноидный спирт ришитин. Этот фитоалексин образуется у картофеля в ответ на инфицирование несовместимой расой *Phytophthora infestans*, а также у устойчивых сортов томатов, инвазированных галловой нематодой *M. incognita* [13], что свидетельствует об участии ришитина в устойчивости растений-хозяев.

Предобработка хитозаном клубней картофеля и растений томатов определенными дозами хитозана индуцировала в их тканях ришитин в количествах, сопоставимых с уровнями, которые накапливаются в несовместимых комбинациях растений-хозяев и их патогенов.

Однако сходство патосистем картофель-возбудитель фитофтороза и томаты-галловая нематода не ограничивается только образованием общих фитоалексинов. Дело в том, что грибы семейства *Oomycetis*, к числу которых принадлежит род *Phytophthora*, так же, как и нематоды (и насекомые) неспособны к самостоятельному синтезу стероидного ядра [14, 15]. Между тем оба патогена нуждаются в стеринах, поскольку в их отсутствии нарушаются процессы репродукции. Стеринозависимые фитофтора и галловая нематода удовлетворяют свои потребности, используя стерин, содержащийся в тканях своих хозяев. Именно ауксотрофность обоих фитопатогенов в отношении стерина предопределяет особую значимость этих соединений как ведущих биохимических факторов фитофторо- и нематодоустойчивости.

Под воздействием хитозана, индуцирующего ришитин, содержание стерина в тканях картофеля и томатов резко уменьшается [12, 14]. Сокращение общего количества стерина, в основном, происходит за счет уменьшения содер-

жания сигмастерина в томатах, наиболее благоприятного для галловой нематоды, и ситостерина, преимущественно используемого фитофторой.

Предполагается, что вызываемое хитозаном уменьшение содержания стероидов в тканях картофеля и томатов связано со способностью этого препарата одновременно индуцировать образование фитоалексина, поскольку стероиды и сесквитерпеноидный фитоалексин ришитин образуются в тканях по единому метаболическому пути [14]. Таким образом, образование ришитина связано с уменьшением синтеза стероидов и, наоборот: оба процесса существуют в обратной пропорции. Сокращение количества стероидов, а также сопутствующее этому процессу накопление ришитина, к которому лишенный стероидов патоген приобретает повышенную чувствительность, и являются одним из механизмов устойчивости, индуцированной хитозаном в патосистемах картофель-возбудитель фитофтороза и томаты-галловая нематода.

Важной защитной реакцией является образование в тканях растений патоген-индуцированных белков [16]. К их числу относятся ферменты хитиназа и β -1,3-глюканаза. Некоторые патоген-индуцированные белки называют также PR-белками, которые подразделяют на пять групп [17]. Хитиназа и β -1,3-глюканаза относятся ко второй и третьей группе наиболее хорошо исследованных PR-белков. Предполагается, что эти ферменты являются участниками защитных механизмов растений, выполняя, по крайней мере, двойную функцию. С одной стороны, установлено, что они разрушают клеточные покровы патогенов, препятствуя тем самым их проникновению в ткани растений. С другой стороны, хитиназы и глюканы в процессе деградации соответствующих субстратов высвобождают биологически активные олигосахариды (олигосахарины), модулирующие защитные функции у растений [18].

В ряде случаев хитиназы и глюканы могут быть индуцированы салициловой кислотой, аспирином и этиленом [19]. Образование PR-белков в ответ на воздействие патогенов или элиситоров носит системный характер, поскольку они накапливаются не только в местах локализации паразита (или обработки элиситором), но и по всем тканям клубней. Известно, что хитин и хитозан или отсутствуют в тканях растений, или присутствуют в малых количествах, однако ферменты, способные их расщеплять, представлены достаточно широко. Ферментативная деградация хитозана в значительной степени неспецифична. Так различные формы хитозана деполимеризуются не только хитиназами и хитозаназами, но и липазами, целлюлазами, протеазами и гемицеллюлазами. Активность хитиназ и глюканаз значительно возрастает под действием биотических и абиотических стрессов.

Информация об участии хитиназ и β -1,3-глюканаз во взаимоотношениях растений с паразитическими нематодами крайне противоречива. В ряде работ [20] публикуются сведения об отсутствии индукции этих белков в ответ на нематодную инвазию, согласно другим публикациям, активность хитиназ и глюканаз возрастает в инвазированных растениях, однако связь этих ферментов с устойчивостью к нематодам не установлена [21]. Другие работы свидетельствуют о возможном участии хитиназ и глюканаз в защите растений от паразитических нематод [22].

Под влиянием предпосадочной обработки семян огурцов хитозаном 5 кДа индуцировалась устойчивость к галловой нематоде выросших из них вегетирующих растений: количество галлов на корнях сократилось больше, чем втрое, яйца в оотеке и половозрелые самки совсем отсутствовали [23]. Между тем оказалось, что активность хитиназ и β -1,3-глюканаз в этом варианте опыта не только не повышена, но наоборот, снижена.

Пониженная по сравнению с контролем активность этих ферментов еще не означает, что хитиназа и глюканаза не играют активной роли в иммунном отве-

те растительной ткани. Выше уже упоминалось о двоякой роли, которую выполняют эти ферменты в контроле защитных реакций растительной ткани. Такая роль иногда оказывается взаимоисключающей: с одной стороны, она состоит в повреждении покровов патогена и образовании элиситоров, повышающих устойчивость растительной ткани, тогда как с другой стороны, - в возникновении в процессах деградации субстратов иммуносупрессоров, индуцирующих восприимчивость растений.

Не исключено также, что под воздействием элиситора происходит замена экзоформ ферментов на эндоформы, наносящие значительно больший вред клеточным стенкам патогенов, что невозможно уловить при определении общей ферментативной активности.

Показано, что защитная роль хитиназы связана с ее непосредственным воздействием на нематод, покровы которых и стилет содержат хитин в качестве основных структурных элементов. Так, показано, что коммерческая хитиназа на 70% по сравнению с контролем ингибирует вылупление яиц *Globodera rostochiensis* (Ro 1) *in vitro* [24]. Установлено также, что хитиназы в фасоли вызывают гибель яиц и способствуют вылуплению незрелых личинок у галловой нематоды *Meloidogyne hapla* [25].

При инфицировании растений фитопатогенами, так же, как и при обработке их элиситорами, часто возрастает активность липоксигеназы, которая, по классификации Тарчевского [16], относится к числу патоген-индуцируемых белков растений. При участии этого фермента в растениях образуются метаболиты, выполняющие роль системных сигналов, опосредующих действие элиситоров. Одним из кандидатов на роль таких мессенджеров является жасмоновая кислота и ее метиловый эфир - метилжасмонат, начальные этапы синтеза которых осуществляются при посредстве липоксигеназы. Показано, что жасмонаты участвуют в индуцировании защитных систем растений, усиливая действие биогенных элиситоров. Так сочетание хитозана с метиловым эфиром жасмоновой кислоты значительно сильнее подавляло галлообразование и уменьшало число яиц в оотеке нематоды *M. incognita*, поражающей томаты, чем воздействие одного хитозана [12]. Повышенная нематодоустойчивость, индуцируемая хитозаном, а тем более композицией хитозана с метилжасмонатом, коррелировала с активностью липоксигеназы.

Известно, что в инфицированных патогенами или обработанных элиситорами тканях растений образуются патоген-индуцируемые белки, ингибирующие протеиназы. Ингибиторы протеиназ составляют большую и разнообразную группу белков растений, объединенных общей способностью образовывать с протеиназами обратимые белок-белковые комплексы, в составе которых ферменты утрачивают свою активность [26-28]. Принято считать, что ингибиторы протеиназ обладают полифункциональной активностью. Одной из сторон такой активности является их защитная роль, в результате чего нейтрализуются протеиназы патогенов и вредителей. За последнее время достигнуты большие успехи в исследовании свойств, структуры и механизмов взаимодействия с ферментами у ингибиторов протеиназ [28, 29].

Данные о способности хитозана индуцировать в растительных тканях ингибиторы протеиназ относительно немногочисленны. Так, для хитозана с ММ = 5 кДа была установлена способность индуцировать в тканях клубней картофеля ингибитор трипсина (класс сериновых протеиназ), в результате чего активность этой протеиназы заметно снижалась [7].

Одной из защитных реакций растений, активирующейся на самых первых этапах патогенеза, является генерирование растительной тканью активных форм кислорода и азота, так называемый окислительный взрыв - суперок-

сидного (O_2) и гидроксильного (ОН-) свободных радикалов, перекиси водорода (H_2O_2), синглетного кислорода (1O_2), а также оксида азота [30, 31]. Активные формы кислорода и азота оказывают токсическое действие на патогены, индуцируя деструктивные процессы в клеточных мембранах, а также являются посредниками в трансдукции сигналов, экспрессирующих защитные гены.

Повышенная концентрация активных форм кислорода и азота регистрируется в клетках растений под воздействием радиации, пестицидов, промышленных отходов и многих других факторов. Окислительный стресс - наиболее яркая составляющая инфекционного процесса как у животных, так и у растений, а генерирование окислителей - один из факторов защиты, используемых иммунной системой. Предполагается, что окислительный стресс лежит в основе механизмов старения и апоптоза (программируемой гибели клеток).

Установлено, что хитозан (5 кДа) вызывает в тканях клубней картофеля системное образование супероксида - одной из наиболее реакционноспособных форм активного кислорода [32]. Опыт проводился по схеме: интактные клубни картофеля обрабатывали с поверхности раствором хитозана, спустя 14 дней из клубней получали диффузаты, которые, как оказалось, обладали фунгитоксичностью. В диффузатах были обнаружены вещества, восстанавливающие нитроголубой тетразолиум. Восстанавливающая активность, так же, как и фунгитоксичность, снималась супероксиддисмутазой - ферментом, специфическим для супероксида кислорода.

Таким образом, водорастворимый хитозан с ММ = 5 кДа обладает элиситорной активностью широкого спектра действия, что, по-видимому, определяется его способностью индуцировать у растений неспецифическую болезнеустойчивость, защищающую растения от патогенов различных таксономических групп. Индукция устойчивости хитозаном основывается на его способности включать в растительных тканях комплекс защитных ответов, ограничивающих распространение инфекции. Все это позволяет рассматривать хитозан, как перспективное соединение для защиты растений.

Проведено определение биологической активности производных хитозана и хитина, а также продуктов их ферментативного гидролиза [33]. Все испытанные производные в соответствии с их активностью были разделены на четыре группы: 1) водорастворимый хитозан с молекулярной массой 3-10 кДа (поликатионный биополимер), продукты ферментативной деградации высокомолекулярного хитозана; 2) КМ-хитин и N-сукцинилсульфатхитин - производные хитозана, в состав которых были введены отрицательно заряженные группы с последующим ацетилированием (полианионные биополимеры); 3) 6-О-сульфатхитозан с молекулярной массой 5, 10 и 63 кДа и N-сукцинилхитозан - амфотерные производные хитозана; 4) дезаминированные производные, полученные после обработки исходного хитозана азотистой кислотой.

Наибольшая элиситорная активность оказалась присуща водорастворимому хитозану с молекулярной массой 3-10 кДа (поликатионный биополимер) и его дезаминированному производному. Полученные результаты позволяют предположить связь элиситорной активности с положительно заряженными аминогруппами.

Дезаминированные образцы хитозана отличались друг от друга продолжительностью ферментативного гидролиза. Возможно, что они проявляли биологическую активность за счет присутствия в гидролизате олигосахаридов.

Предполагается, что механизмы действия ацетилированных и деацетилированных хитоолигосахаридов различаются принципиально. В случае хитина и его производных не исключено высоко специфическое связывание с мембранными рецепторами растений лектиновой природы, тогда как фрагменты хито-

зана и его дезаминированные производные действуют за счет электростатического взаимодействия положительно заряженных молекул элиситора с отрицательно заряженными компонентами мембран или молекулами ДНК.

Работы выполнены при поддержке РФФИ (гранты №№ 98-04-48650, 99-04-48332, 00-04-49109).

ЛИТЕРАТУРА

1. Метлицкий Л.В. Иммунологический контроль в жизни растений // XXXXV Тимирязевское чтение. М.: Наука. 1987. 72 с.
2. Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С. // Материалы VI Междунар. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 2001. С. 248-251.
3. Евдокимов Ю.М., Салянов В.И., Ильина А.В., Варламов В.П. // Там же. С. 273-279.
4. Erbacher P., Zou S., Bellinger T. et al. // Pharm. Res. 1998. V. 15. P. 1332-1339.
5. Aral C Ozbas-Turan S., Kabasaki L. et al. // S.T.P. Pharma Sciences. 2000. V. 10. P. 83-88.
6. Hadwiger L.A., Frinstensky B., Riggleman R.C. // Chitin, chitosan and related enzymes / Ed. Zikakis J.P. N.Y.: Plenum Press, 1984. P. 291-298.
7. Переход Е.А., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г. и др. // Докл. РАН. 1997. Т. 355. № 1. С. 120-122.
8. Зиновьева СВ., Васюкова Н.И., Ильинская Л.И. и др. // Там же. 1999. Т. 367. № 6. С. 845-847.
9. Fink I., Jeblick W., Blaschek W., Kauss H. // Planta. 1987. V. 171. N 1. P. 130-135.
10. Lawton M.A., Lamb C.J. // Mol. Cell. Biol. 1987. V. 7. N 3. P. 335-341.
11. Максимов И.В., Хайруллин Р.М., Ахметова И.Э., Черепанова Е.А. // Материалы VI Междунар. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 2001. С. 88-91.
12. Васюкова Н.И., Зиновьева СВ., Ильинская Л.И. и др. // Прикл. биохим. микробиол. 2001. Т. 37. № 1. С. 115-122.
13. Zinovieva S.V., Ozeretskoykaya O.L., Illinskaya L.I. et al. // Russian J. Nematology. 1995. V. 3. N 1. P. 65-67.
14. Метлицкий Л.В., Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И. // Усп. совр. биол. 1980. Т. 89. Вып. 1. С. 28-40.
15. Bolla R. // J. Nematology. V. 11. P. 250-259.
16. Тарчевский И.А. // Прикл. биохим. микробиол. 2001. Т. 37. № 5. С. 517-532.
17. Linthorst H.J.M. // Plant Sci. 1991. V. 10. P. 123-150.
18. Озерецковская О.Л., Роменская И.Г. // Физиология растений. 1996. Т. 43. С. 743-752.
19. Васюкова Н.И., Герасимова Н.Г., Озерецковская О.Л. // Прикл. биохим. микробиол. 1999. Т. 35. № 5. С. 557-563.
20. Ока Y., Chet I., Spiegel J. // J. Nematology. 1997. V. 29. P. 501-508.
21. Rahimi S., Perry R.N., Wright D.J. // Physiol. Molec. Plant Pathology. 1996. V. 49. P. 49-59.
22. Qiu J., Hallmann J., Kokalis-Ruelle N. et al. // J. Nematology. 1997. V. 29. P. 523-530.
23. Зиновьева СВ., Васюкова Н.И., Удалова Ж.В. и др. // Докл. РАН. 2001. Т. 379. № 5. С. 712-715.
24. Conn E., Spiegel Y. // Plant roots: The hidden half / Ed. Waisel Y., Eshel A., Kafkafi U. N.Y.: Marcel Dekker. 1991. P. 789-805.
25. Mercer C.F., Greenwood D.R., Grant J.L. // Nematologica. 1992. V. 8. P. 227-236.
26. Richardson M. // Phytochemistry. 1977. V. 16. N 1. P. 159-161.
27. Laskowski M., Kato I. // Annu. Rev. Biochem. 1980. V. 49. P. 593-626.
28. Мосолов В.В., Григорьева Л.И., Валуева Т.А. // Прикл. биохим. микробиол. 2001. Т. 37. № 6. С. 1-7.
29. Мосолов В.В., Валуева Т.А. Растительные белковые ингибиторы протеолитических ферментов. М.: ВИНТИ, 1993. 207 с.
30. Аверьянов А.А. // Усп. совр. биол. 1991. Т. 111. С. 722-737.
31. Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. // Nature. 1998. V. 394. N 6. P. 585-588.
32. Переход Е.А., Чаленко Г.И., Озерецковская О.Л. и др. // Материалы V Междунар. конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. С. 96-97.
33. Васюкова Н.И., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г. и др. // Прикл. биохим. микробиол. 2000. Т. 36. № 4. С. 433-438.

ПРИМЕНЕНИЕ ХИТОЗАНА В ПРОИЗВОДСТВЕ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Т.М. Сафронова

(Дальрыбвтуз, Владивосток)

Полиаминосахарид хитин, ближайшим производным которого является хитозан, начали употреблять в составе пищи много раньше, чем этот полимер был открыт и описан как химическое соединение. Хитин содержится в значительных количествах в таких распространенных продуктах как грибы, мясо ракообразных, пивные и пекарские дрожжи. Хитин составляет органическую основу внешнего скелета более экзотической пищи - зоопланктона, мелких насекомых, их личинок, употребляемых сырыми или обработанными.

Хитозан в производстве продуктов питания целенаправленно применяют последние 20 лет. Использование хитозана в технологии пищи определяется функциональными свойствами и практически полным соответствием требованиям, предъявляемых к пищевым добавкам [1-14].

Токсико-гигиеническая характеристика хитозана изучена достаточно полно для обоснования рекомендаций по его использованию как многофункциональной добавки с лечебно-профилактическими свойствами. В тех странах, где хитозан разрешен к употреблению, его количество нормируется в соответствии с государственным законодательством. В России экспериментально обоснованная допустимая норма хитозана составляет 0,5% массы продукта [7, 15-17].

В зависимости от характера прикладных задач хитозан вводится в состав изделий или используется как внешний технологический фактор (рис. 1). В первом случае хитозан в основном применяют в виде 2-4 %-ных растворов в слабой уксусной или другой органической кислоте, а во втором чаще всего в твердообразном измельченном состоянии.

СВОЙСТВА РАСТВОРОВ ХИТОЗАНА

В производстве пищевых продуктов в качестве растворителя хитозана используют преимущественно слабый (0,5-2%) водный раствор уксусной кислоты. Продолжительность растворения порошкообразного хитозана при 20 °С составляет 35-40 мин, но ее можно сократить до 15 мин, применяя перемешивание и нагревание до температуры 80 °С. Продолжительность приготовления растворов хитозана с применением предварительной заливки водой составляет 7-9 мин, так как внесение хитозана в воду, которая, химически не взаимодействуя с ним, обеспечивает быстрое набухание полимера, причем каждая частица его набухает отдельно от других, и полученная масса не содержит комков. При добавлении концентрированной кислоты и последующем перемешивании взаимодействие между растворителем и хитозаном происходит по всей поверхности каждой частицы полимера, что и обеспечивает увеличение скорости растворения.

Минимальное необходимое для растворения хитозана содержание органических кислот, обладающих различной способностью к образованию ионной связи с аминогруппой полимера, неодинаково и составляет для уксусной кислоты 0,5%, лимонной - 2,5 и щавелевой - 5%. Определенной концентрации кислоты соответствует максимальное количество хитозана, способное к полному растворе-

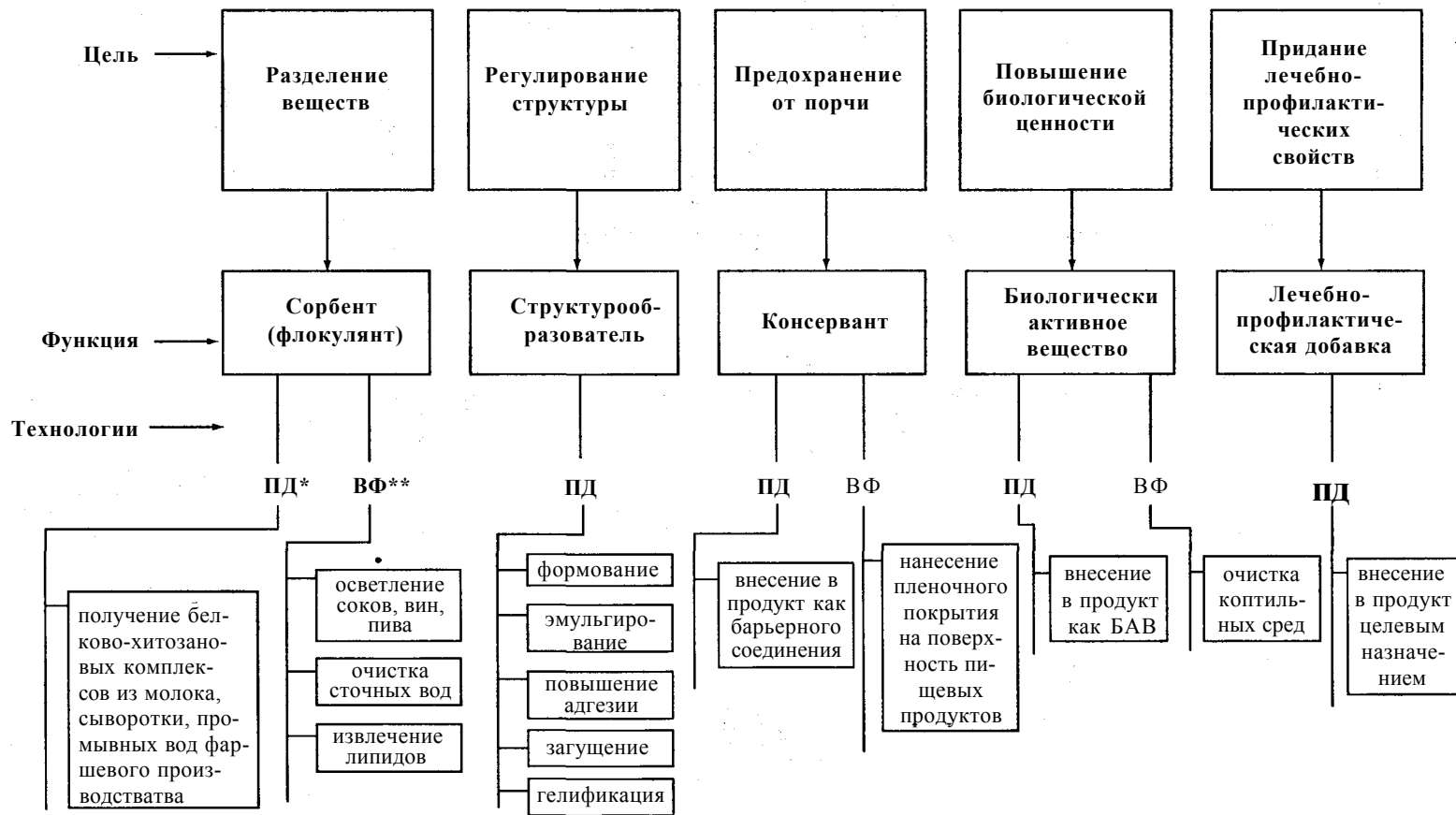


Рис. 1. Схема использования функциональных свойств хитозана в технологии продуктов питания

* - пищевая добавка; ** - внешний фактор

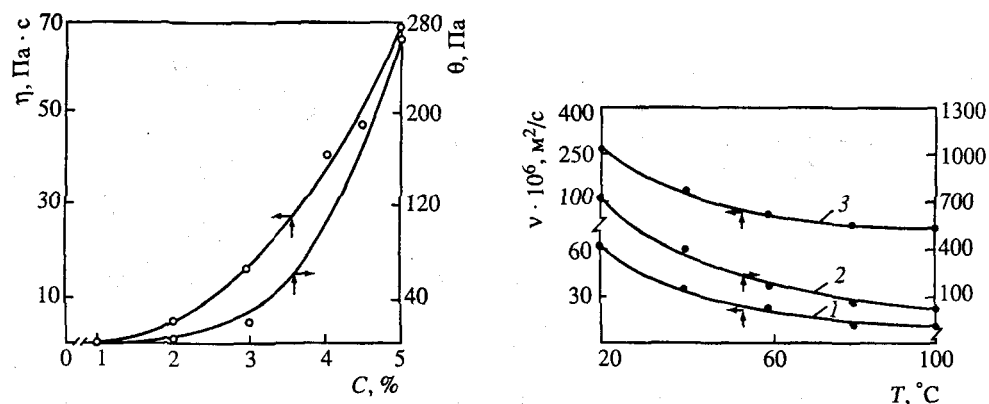


Рис. 2. Влияние концентрации растворов хитозана на их эффективную η вязкость и предельное напряжение сдвига θ

Рис. 3. Кинематическая вязкость растворов хитозана в зависимости от температуры

нию в ней. Например, 12%-ный раствор хитозана можно получить в уксусной кислоте не ниже 2%-ной концентрации. Рост содержания хитозана в растворе сдвигает pH к значениям, характерным для нейтральной среды, так как благодаря наличию аминогрупп хитозан проявляет свойства слабого основания. При подщелачивании растворов хитозана последний выпадает в осадок в интервале pH 6,8 до 7.

Плотность 0,2-1,0%-ных растворов хитозана возрастает с увеличением в них концентрации полимера от 1000 до 1006 кг/м³ [18].

Растворы хитозана имеют низкую степень обсемененности микроорганизмами, снижающаяся во времени (табл. 1).

В процессе хранения происходит отмирание микробных клеток, которое можно объяснить присутствием в растворе уксусной кислоты, а также бактерицидным действием хитозана [9, 19].

Вязкость и предельное напряжение сдвига растворов хитозана, как и большинства высокомолекулярных веществ, увеличиваются с ростом концентрации полимера (рис. 2). При хранении особенно первые 4 ч вязкость растворов хитозана уменьшается, и поэтому в технологических процессах рекомендуется использовать их свежеприготовленными [2, 19]. Вязкость растворов хитозана с увеличением температур уменьшается (рис. 3), особенно интенсивно в интервале температур 20-60 °C.

Таблица 1. Изменение микробной контаминации растворов хитозана во времени

Продолжительность хранения, ч	Объект исследования	Обсемененность раствора КМАФАнМ, ед/см ³	
		22 °C	6 °C
∞	Хитозан сухой	$1,2 \cdot 10^3$	—
0	2%-ный раствор хитозана в 1%-уксусной кислоте	$3 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^1$
1	То же	$2 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^1$
2	"	0	0
3	"	0	0
24	"	0	0
48	"	0	0
72	"	0	0

Благодаря наличию в макромолекулах функциональных гидроксильных и аминогрупп, растворы хитозана проявляют адгезионную способность (рис. 4). Липкость растворов хитозана увеличивается с ростом его концентрации и зависит от вида материала.

В определенных условиях хитозан и особенно его растворимые продукты химической модификации образуют термоустойчивые механически прочные гели, продолжительность формирования и синерезиса которых можно регулировать [19-21].

Хитозан проявляет свойства эмульгатора, если величина pH водной фазы обеспечивает его растворение.

Эмульсии масло-вода (50 : 50) с содержанием хитозана не менее 0,5% стабильны после центрифугирования, нагревания и замораживания, если при эмульгировании поддерживается температура 90-100 °С и pH среды не выше 4,12. Вязкостные характеристики эмульсий возрастают с увеличением в них концентрации хитозана, его качества, кинематической вязкости растворов в уксусной кислоте и содержании минеральных веществ (табл. 2 и 3)

При сенсорной оценке растворов хитозана и пищевых продуктов, содержащих его, обнаруживается вязущий привкус, воспринимаемый отрицательно [22]. Известное вязущее или терпкое ощущение, вызываемое при опробовании некоторых плодов и ягод, обусловлено наличием в них многих соединений: полифенолов, капсанцина, пиперина и его производных.

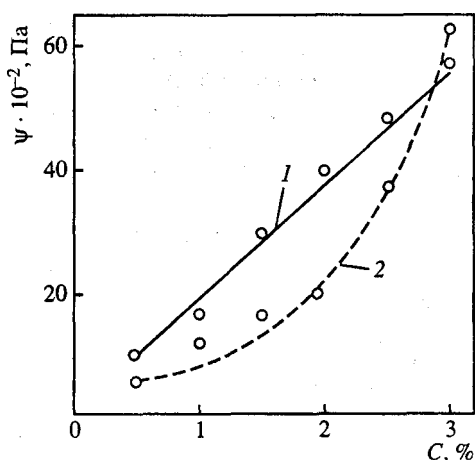


Рис. 4. Влияние концентрации хитозана в 0,5%-ной уксусной кислоте на адгезию металла (1) и оргстекла (2)

Таблица 2. Влияние хитозана на реологические свойства эмульсий

Вязкость хитозана, $10^{-6} \text{ в}^2/\text{с}$	Предельное напряжение сдвига, Па	Вязкость пластическая, Па • с
136	11,20	1,14
408	14,23	1,41
3110	2,76	1,76

Таблица 3. Стабильность эмульсий в зависимости от содержания минеральных веществ в хитозане

Содержание минеральных веществ, %	Хранение в течение 3 сут. при 20 °С	Центрифугирование	
		свежеприготовленной эмульсии	после замораживания-отепления
5,89	Стабильная	Следы масла на поверхности эмульсии	Слой масла около 15% объема эмульсии
0,93	То же	Стабильная	Стабильная
0,4	"	То же	То же

Психофизиологический механизм восприятия вяжущего ощущения соотносят с образованием поперечных связей между свободными гидроксильными группами дубильных веществ и белками смолы.

К особенностям восприятия вяжущего привкуса хитозана относятся длительность его возникновения, составляющая 1-10 с, и продолжительность послевкусия, равная 20-25 мин в случае, если ротовая полость не обрабатывается нейтрализаторами, или 1-15 мин при их использовании.

Наиболее чувствительным участком в ротовой полости к исследованному ощущению является мягкое небо, оно воспринимает едва различимые признаки вяжущего привкуса. По мере роста интенсивности вяжущего привкуса его ощущают последовательно спинка, задний край языка, затем гортань и глотка [23].

Концентрация хитозана, вид, состав и температура растворителя сказываются на интенсивности вяжущего привкуса незначительно по сравнению с влиянием на этот показатель молекулярной массы полимера. Снижение интенсивности вяжущего привкуса от 4,1 до 2,5 баллов происходит с повышением молекулярной массы хитозана с 4 до 80 кДа. Подобный привкус, но гораздо меньшей интенсивности присущ водным растворам карбоксиметилхитина [24-27].

Интенсивность вяжущего привкуса хитозана может быть в несколько раз снижена обработкой его в твердофазном состоянии жидким азотом предпочтительно при температуре минус 175 °С в течение 2-4 мин [28, 29]. Для сокращения криообработки хитозана ее ведут не в испаряющемся азоте, а в герметичных условиях при влагосодержании полимера не менее 60%, что обеспечивает одновременно снижение интенсивности вяжущего вкуса хитозана и его сушку до влажности 13-15% [6].

На воспринимаемую органолептически интенсивность вяжущего вкуса хитозана оказывает влияние вид продукта, в который он внесен. Существенное снижение интенсивности наблюдается в молочной сыворотке, соке из лука и чеснока, в меньшей мере - моркови.

В продуктах майонезного ряда, приготовленных из гиробионтов, растительного масла и хитозана (массовая доля 0,5%) эффект снижения вяжущего вкуса наиболее выражен в соусе, содержащем бульон из кальмара [25, 30].

Сорбция. Способность хитозана осветлять технологические жидкости используется в производстве соков, пива, вин, молочной сыворотке, промывных вод фаршевого производства, подпрессовых бульонов и других низконцентрированных жидкостей, содержащих мелкодисперсные частицы органических соединений различной природы [13, 14, 31]. Проявление свойств сорбента и частично эмульгатора обуславливает липофильный эффект хитозана.

Обработка измельченной мышечной ткани рыбы 0,2%-ным раствором хитозана при различных температурах позволяет снизить содержание липидов в ней с 6,03 до 1,2% (рис. 5). Максимальный эффект достигается

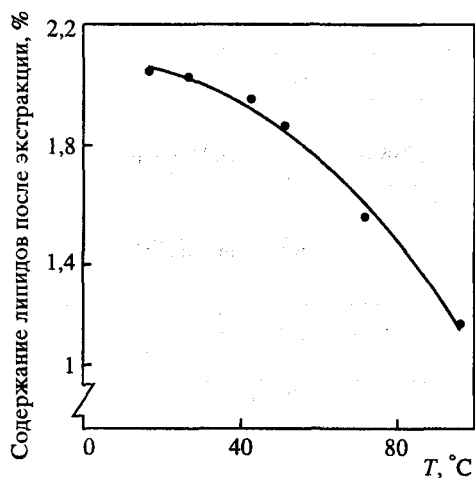


Рис. 5. Влияние температуры на степень извлечения липидов растворами хитозана

при 90-100 °С, очевидно благодаря наибольшей устойчивости эмульсии рыбный жир-раствор хитозана и ослаблению связей липидов в тканях [2, 32].

Из подпрессовых крабовых бульонов с добавлением 1-2%-ных растворов хитозана в 2%-ной соляной кислоте при интенсивном перемешивании высаждаются растворимые белковые вещества, которые улавливаются фильтрованием через плотные ткани, они оценены как кормовой продукт [33].

Осаждение белка раствором хитозана из термически обработанной жидкости - подсырной и творожной сыворотки, осуществляется при растворении хитозана в 0,5%-ной уксусной кислоте, что имеет наибольшее значение для интенсивного комплексообразования белок-хитозан [34, 35].

Вследствие термодинамической несовместимости хитозана и молока их смесь разделяется на белковую и полисахаридную безбелковую фракции. Интенсивность образования белково-хитозановых комплексов и слоистость их структуры находятся в зависимости от ряда факторов, которые обеспечивают оптимальные результаты при значениях: температура смеси 30 °С, соотношение раствора хитозана: молоко как 1 : 5, pH 4,5 раствора хитозана. Белково-хитозановые концентраты могут быть использованы как обогатители творожных изделий, сыров, сырных соусов, паст [36].

Некоагулированные белки рыб из промывных вод фаршевого производства, не задержанных в хранении, осаждают нейтрализованными до pH 6,9-6,4 растворами хитозана.

Оптимальным по количеству осажденного белка считается значение pH смеси промывной воды и раствора хитозана в интервале 6,8-7,1. Белково-хитозановый осадок благодаря ряду функциональных свойств (пенообразующая способность, лечебно-профилактические свойства) рекомендуется добавлять в пищевые рыбные продукты.

При содержании в промывной воде 1,2-1,4% сухих веществ хитозаном осаждают 88-92% белка. В полученном сухом белковом продукте содержится хитозана 32-35% или в пересчете на влажный материал 4—6%. Следовательно он может быть использован как добавка в количестве не более 10%, чтобы соблюсти нормированное содержание хитозана меньше или равно 0,5% [37, 38].

При динамической сорбции через влажный слой хитозана бульонов, образующихся при бланшировании рыбы, использованного тузлука, рыбного жира приводит к их эффективной дезодорации.

У исследованных рыбных бульонов устраняются запахи окисленного жира, горелый, металлический, туковый, у тузлука - окисленного жира и дезинфекции.

В хранившемся рыбном жире присущий ему запах окисления полностью не устраняется, но в несколько раз снижается его интенсивность [32, 39].

Хитозан в твердофазном состоянии, будучи внесен в копильный препарат (статическая сорбция), способен модифицировать его свойства. При pH 2,1-3,4 копильного препарата хитозан в нем не растворяется, но активно набухает, образуя смесь гелифицированных частиц с жидкой средой. Структура смеси остается стационарной в течение нескольких суток при условии содержания хитозана 0,5-2% и температуре 37 °С. Последующий синерезис сгустков хитозана приводит к разделению системы на жидкую фракцию и осадок.

Количество жидкой фракции находится в обратной зависимости от содержания хитозана и составляет 80-20% массы смеси.

Под влиянием контакта с твердофазным хитозаном в жидкой фракции происходит снижение оптической плотности, массовой доли кислот и веществ углеводной природы и возрастает количество фенолов, амфотерных соединений,

Таблица 4. Сравнительная характеристика жидких фракций в зависимости от содержания хитозана в исходной смеси копильный препарат-твердофазный хитозан

Образец	Состав смеси, %		Показатели							
	копильный препарат	хитозан	оптическая плотность*	pH	массовая доля, %					
					нейтральные соединения	фенолы	кислоты	амины пиридиновые основания	амфотерные соединения	вещества углеродной природы
1	99,5	0,5	0,278	2,41	0,04	0,44	0,68	0,05	0,09	2,73
2	99	1	0,122	2,5	0,05	0,68	0,19	0,06	0,17	2,41
3	98,5	1,5	0,12	2,58	0,06	0,56	0,45	0,13	0,18	2,51
4	98	2	0,116	2,67	0,1	0,82	0,33	0,11	0,2	2,66

* $\lambda = 540$

аминов и пиридиновых оснований, что свидетельствует об избирательной сорбции хитозана (табл. 4).

Расчетное значение сорбции хитозаном сухих веществ из смеси составляет при внесении его в твердофазном виде 2,2-2,6 г/г, набухание полимера 37 г/г.

Способность твердофазного хитозана, а также хитина улучшать свойства копильного препарата использована для повышения санитарно-гигиенического состояния качества рыбы бездымного копчения. Более высокими органолептическими характеристиками отличаются рыба бездымного копчения при использовании жидких фракций 1 и 2, чем копильного препарата и фракций 3 и 4 (см. табл. 4) [40-42].

Структурообразование. В технологии формованных изделий хитозан используется как структурообразующий агент, повышающий значения реологических характеристик пищевых масс. Хитозан обладает редким свойством соединять в упорядоченную структуру фрагменты материалов различного влагосодержания: сухих, с промежуточной влажностью и высоковлажных [1, 43].

Формирование изделий из мяса криля с хитозаном сопровождается изменением макроструктуры продукта. Раствор хитозана после его внесения в материал располагается в пространстве между гранулами в виде сплошного слоя, непрерывность которого со временем нарушается.

В связи с уплотнением геля и уменьшением его объема между границами мяса образуются пустоты. К концу становления структуры образуется прочная конструкция, связанная тонкими волокнами и пленками хитозана. Замораживание формованного мяса криля способствует образованию структуры.

Предельное напряжение сдвига материала по времени изменяется в соответствии со стадиями структурообразования, возрастая с $6 \cdot 10^{-2}$ до $17 \cdot 10^{-2}$ Па. Размороженное формованное мясо криля характеризуется напряжением сдвига на порядок выше, чем перед замораживанием [4].

Эмульгирующая способность хитозана проявляется при определенных условиях (содержание полимера, температура и pH среды, способ перемешивания компонентов) [13, 44]. Если осуществляется механическая гомогенизация, эмульсия равных частей масла и воды стабильна при концентрации хитозана более 0,5%, температуре 90-100 °C и pH не выше 4,12 [45]. Гидродинамическая

гомогенизация на роторно-кавитационной мельнице позволяет получать стабильные эмульсии при более низких температурах (20 ± 3 °C) и меньшей продолжительности процесса. Размеры эмульгированных частиц при данном методе гомогенизации составляют 0,1-0,2 мкм, что на порядок ниже, чем в эмульсиях традиционных технологий. Присутствие хитозана позволяет снизить содержание гидрофобной фазы эмульсии до 20% [46].

Эмульгирующая способность хитозана возрастает в сочетании с анионным полисахаридом агаром, некоторыми белками животного и растительного происхождения. Применение композиционного структурообразователя хитозан - соевый белковый изолят позволяет получить стабильную эмульсию с низким содержанием растительного масла (25%) при содержании хитозана 0,3 и соевого изолята 2,5% [47].

Функциональные свойства хитозана как загустителя, адгезива и пленкообразователя использованы при обжаривании и бездымном копчении рыбы. Раствор хитозана повышает вязкость жидкой панировки, придает ей способность прочно удерживать на поверхности изделия слой сухарей или муки. Наличие прочного слоя панировки предупреждает излишнее испарение воды из продукта во время обжаривания, способствует образованию равномерной хрустящей корочки и сохраняет количество масла, в котором ведется обжарка [3, 48].

Использование смеси копильного препарата с раствором хитозана для иммерсионного нанесения ее на поверхность рыбы перед подсушкой позволяет достичь однородной золотисто-коричневой блестящей окраски. Процесс становится более технологичным, так как уже при однократном погружении поверхность рыбы удерживает достаточное для достижения вкусоароматического эффекта количество копильного препарата [48].

Смесь раствора хитозана с копильным препаратом, представляющая собой вязкую, но текучую жидкость, через определенное время переходит в гелеобразное состояние.

Скорость формирования геля, его прочность и долговременность существования зависят от соотношения хитозана и препарата в смеси и таких факторов как температура, pH среды, присутствие электролита, вязкость хитозана, соотношение высоты и диаметра емкости, занимаемой смесью.

Гель устойчив после замораживания-размораживания, нагревания, но подвержен синерезису, в результате которого образуются две фракции - жидкая, подобная копильному препарату, но не пригодная для копчения и темно-коричневый с резким запахом осадок [48]. Гели системы копильный препарат-раствор хитозана отличаются резким запахом и вкусом копчения, вязкий привкус хитозана, что делает их органолептически неприемлемыми.

Механизм образования геля вероятно связан с взаимодействием хитозана и соединений углеводной природы, образующихся в результате неполного сгорания древесины [20, 49-54].

Источником целлюлозы и ее производных в пищевых продуктах помимо копильных агентов могут быть растительные ткани, пищевые волокна, загустители, эмульгаторы, адгезивы полисахаридной природы, и их взаимодействие с хитозаном возможно в значительном диапазоне концентрации реагентов, температуры и pH.

В смешанных растворах хитозана, карбоксиметилцеллюлозы и копильного препарата образование геля происходит в широком диапазоне концентраций реагентов, что послужило основанием для разработки нового вида термоустойчивых, биологически активных, желирующих заливок низкой энергетической ценности [55, 56].

Введение студнеобразователя белковой природы (желатин) способствует упрочению структуры геля бинарных смесей полисахарид-полиаминосахарид.

Гелеобразующие полисахаридные смеси при эмульгировании с растительным маслом (40-50%) сохраняют способность к формированию трехмерной сетки. Прочность в сравнении с гидрофильным гелем ниже, но достаточна чтобы удерживать в единой структуре твердую часть пресервов и заливку [57].

Добавление хитозана в масляно-томатную заливку, используемую в консервах из скумбрии, увеличивает ее стабильность с ростом концентрации полимера. Снижение вязкости этой системы по времени связано обратной зависимостью с содержанием хитозана [5]. Хитозан в присутствии термически гидролизованного белка, содержащегося в рыбном бульоне, проявляет более высокие свойства эмульгатора [45].

Бактерицидное действие. Факт бактерицидного действия хитозана, установленный для живых организмов или приближенных к ним стендовых опытов, был априори перенесен на пищевые материалы и экспериментально подтвержден при хранении различных видов продукции.

Наиболее широко показано защитное действие пленок из хитозана, нанесенных на поверхность плодов и овощей - яблок, апельсинов, земляники, томатов, перца. Поскольку плоды и овощи остаются живым организмом, будучи отделенными от материнского растения, они обладают определенным иммунитетом и в них проходят обменные процессы.

Однородные, гибкие, не дающие трещин хитозановые пленки, обладают избирательной проницаемостью, подобно другим полимерным покрытиям, на поверхности плодов и овощей играют роль микробного фильтра и/или регулируют состав газов у поверхности и в толще тканей, влияя тем самым на активность и тип дыхания, что в целом способствует продлению сроков хранения растительного сырья. Помимо этого покрытие из хитозана вызывает некоторые морфологические изменения в возбудителях порчи томатов и перца, например у *Botritis cinerea*, стимулирует закупорку межклеточного пространства в местах повреждения тканей, ограничивая проникновение фитопатогенной микрофлоры [11, 58, 59].

Пленка хитозана, способствующая продлению срока хранения мороженого тунца, вероятнее всего, играет роль барьера, регулирующего проникновение кислорода воздуха и испарение воды.

О некотором бактериоскопическом эффекте хитозана можно судить по состоянию микрофлоры варено-мороженого мяса криля, изготовленного с добавлением раствора хитозана как структурообразователя. КМАФАнМ мяса в 75% случаев было заметно ниже (в 1,3-1,8 раза), чем у аналогичного продукта, не содержащего хитозан [60]. Отнести полученный эффект за счет антибактериального влияния хитозана в данном случае не представляется возможным, так как не учтена вероятность консервирующего действия уксусной кислоты как растворителя хитозана.

Эмульсионные продукты, изготовленные из мышечной ткани креветки, краба и рыбы (терпуг) с добавлением различного количества раствора хитозана (0,08%, 4% сухого полимера), исследованы в процессе хранения при температуре 0-5 °С в сопоставлении с аналогичными продуктами без хитозана, но содержащими уксусную кислоту соответствующей концентрации.

Наличие хитозана в продуктах не влияло на характер динамики КМАФАнМ, в которой различались стадии снижения, стабилизации и последующего роста микрообсемененности. Но уровень численных значений КМАФАнМ на последней стадии хранения на порядок или два (в зависимости от вида изде-

лия) был ниже в продуктах с хитозаном, при этом достоверного влияния массовой доли хитозана в исследованных пределах на антибактериальную эффективность не отмечено. Подобное влияние хитозана на КМАФАнМ отмечено в пресервах из терпуга (рис. 6) [55, 61].

Совокупность сведений о бактерицидном действии хитозана, выявленных при хранении пищевых продуктов, позволяет отнести его к пищевым добавкам, обладающим барьерными свойствами.

Влияние на биологическую ценность пищи. Хитозан, присутствуя в составе пищевых продуктов, положительно влияет на их биологическую ценность, определяемую методом биотестирования по инфузории *Tetrachimena pyriformis* [55]. Направленность изменения относительной биологической ценности (ОБЦ) зависит от массовой доли хитозана и вида продукта (табл. 5).

В исследованных продуктах из ракообразных значений ОБЦ достигают экстремума при 0,16% хитозана и в дальнейшем снижаются с ростом массовой доли его.

В эмульсиях из терпуга с увеличением содержания хитозана наблюдается рост значений ОБЦ до выхода на практически постоянное значение, начиная с массовой доли хитозана 0,24%.

ОБЦ пудинга из креветки с внесением в него раствора хитозана (0,1-0,3% в пересчете на сухой полимер) повышается с 49 до 98%, а добавление твердофазного хитозана (0,2-0,7%) приводит к снижению ОБЦ с 95 до 53%. Различия в характере влияния на ОБЦ возможно связаны с внесением растворителя (уксусная кислота) и неодинакового размера частиц хитозана, высаждаемого в среде продукта с рН 7, и порошкообразного, вносимого без растворителя.

Динамика ОБЦ в зависимости от состава модельной системы рыбный бульон - копильный препарат "ВНИРО" - раствор хитозана позволяет оценить роль хитозана как антитоксиканта (рис. 7 и 8). ОБЦ рыбного бульона с копильным препаратом меньше на 3-16%, чем ОБЦ подобного продукта, но включающего хитозан.

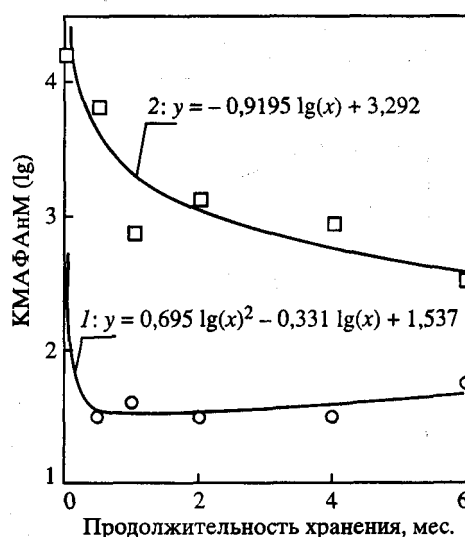


Рис. 6. Динамика микрообсеменности пресервов в процессе хранения

1 – адгезивный способ внесения копильного препарата с хитозаном; 2 – совмещенное с посолом внесение копильного препарата (без хитозана)

Таблица 5. ОБЦ эмульсионных продуктов, изготовленных из гидробионтов, в зависимости от содержания в них хитозана, %

Сырье в эмульсии	Массовая доля хитозана, %					
	0	0,08	0,16	0,24	0,32	0,4
Креветка	85	75	95	84	76	47
Краб	97	88	91	82	74	75
Терпуг	53	56	76	81	85	84

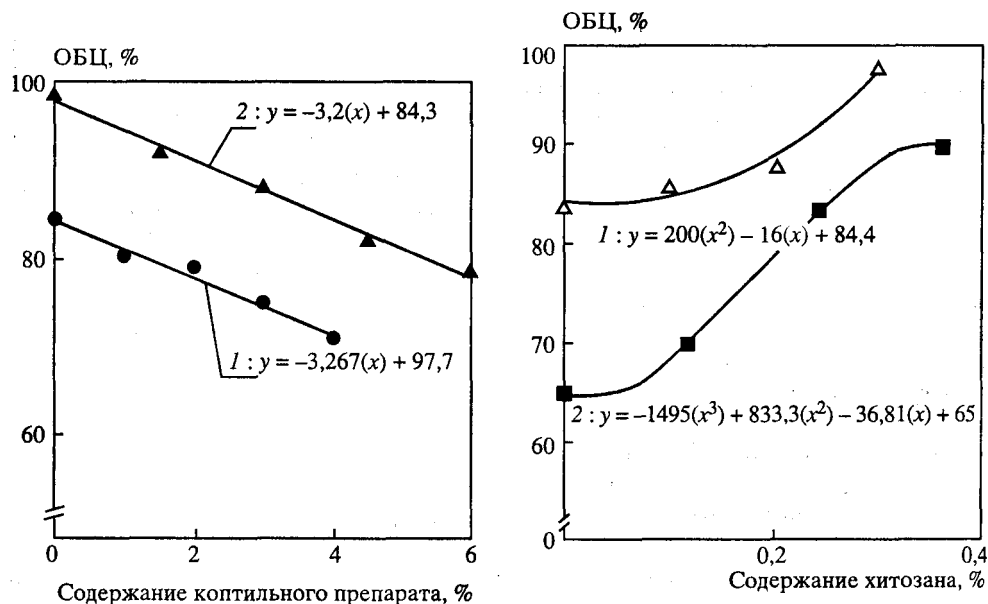


Рис. 7. Динамика ОБЦ в зависимости от содержания копильного препарата
/ - для рыбного бульона, 2 - для рыбного бульона с СД = 0,24% хитозана

Рис. 8. Динамика ОБЦ в зависимости от содержания хитозана
1 - для рыбного бульона, 2 - для рыбного бульона с 3% копильного препарата

У копильного препарата "ВНИРО" после одно- и двукратной обработки порошкообразным хитозаном снижается уровень токсичности, что показано на изменении значений ОБЦ модельной системы рыбный бульон - копильный препарат.

Положительное влияние хитозана на ОБЦ отмечены при исследовании продуктов с пищевым и волокнами (отруби) и их композитами с хитозаном (табл. 6) [55].

Несмотря на относительность метода биотестирования биологическая активность хитозана в составе пищевых продуктов достоверно прослеживается.

Лечебно-профилактическое действие. Хитозан относится к диетическим волокнам, которые не усваиваются организмом человека, а в кислой среде желудка образует раствор высокой вязкости [8, 62]. Поступающий перорально как

Таблица 6. Сравнительная оценка ОБЦ продуктов, содержащих обработанные и необработанные хитозаном пищевые волокна, %

Внесенная добавка	Термически обработанный фарш		Творог	Кефир	Хлебобулочные изделия
	телятина	горбуша			
Пищевое волокно (отруби)	75,6	68,5	54,3	81,6	65,4
Композиты (отруби, обработанные хитозаном)	78,2	72,3	64,1	86,4	93,8

лечебно-профилактический препарат или как компонент пищи хитозан проявляет свойства энтеросорбента, иммуномодулятора, антисклеротического и антиартрозного фактора, регулятора кислотности желудочного сока, ингибитора пепсина и др. [7, 15, 53, 63, 64].

Приведенные результаты исследования роли хитозана в производстве продуктов относятся в большей степени к иллюстрации его возможностей как пищевой добавки, чем объективно оценивают степень использования этого полимера в практическом плане.

Расширение фундаментальных исследований очевидно позволит применять в продуктах питания более удобные формы полимера, обладающие дифференцированными свойствами в отношении растворимости, сорбции, бактерицидного и антиокислительного влияния как фактора повышения биологической ценности пищи и его лечебного действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богданов В.Д., Голованец В.А., Мясина Л.А., Иванкина А.С. // Тез. докл. Первой науч. Всесоюз. науч.-техн. конф. по производству и использованию хитина и хитозана из панциря крыла и других ракообразных. Владивосток: Дальрыбвтуз, 1983. С. 57-58.
2. Богданов В.Д., Сафронова Т.М. Структурообразователи и рыбные композиции. М.: ВНИРО, 1993. 177 с.
3. Сафронова Т.М., Богданов В.Д. // Тез. докл. науч.-техн. конф. "Проблемы влияния тепловой обработки на пищевую ценность продуктов питания". Харьков: 1981. С. 182-183.
4. Сафронова Т.М., Богданов В.Д. Механизм формирования структуры изделий из мяса крыла при введении связующего вещества // ЦНИИТЭИРХ. Обработка рыбы и морепродуктов. Экспресс-инф. Вып. 1. М.: 1982. С. 5-7.
5. Сафронова Т.М., Богданов В.Д. // Тез. докл. Четвертой конф. "Проблемы научных исследований в области изучения и основания Мирового океана". Владивосток: 1983. С. 100-101.
6. Пат. 2147590 РФ. А 23L 1/33.
7. Петров В.А., Тарасенко Г.А. // Материалы III конф. "Совершенствование производства хитина и хитозана из панцирьсодержащих отходов крыла и пути их использования". М.: ВНИРО, 1992. С. 51-56.
8. Хирано С. Свойства и применение хитина // MOL, 1984. Т. 22, № 9. С. 45-48.
9. Цугиша Т. Получение и использование хитина и хитозана // Сёкухин то кайхацу. 1988. Т. 23, № 7. С. 66-69.
10. Чернецкий В.Н., Нифатьев Н.Э. // Росс. хим. журн. общ-во Д.И. Менделеева. 1997. Т. 41. N 1. С. 80-83.
11. Ami J., Ghaouth A.E. // III international conference of the European chitin society. Abstr. Book Brest - France, 1995. P. 18.
12. Shina N., Obara K. Применение хитозана в производстве пищевых продуктов // Сёкухин то кайхацу - Food ind. 1990. Vol. 33, № 18. С. 25-32.
13. Knorr D. // Food Technol, January, 1991. P. 114-122.
14. Soto-peralta N.V., Muller H., Knorr D. // J. Food. Sci. 1989. 54. P. 495.
15. Тарасенко Г.А. Медико-биологическая оценка хитозана из панциря ракообразных как формирующей пищевой добавки // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб. 1992. 22 с.
16. Сафронова Т.М., Богданов В.Д., Петров В.А. // Обработка рыбы и морепродуктов. Экспресс-информ. 1985. Вып. 1. С. 68-70.
17. Сафронова Т.М. // Химия и технология обработки гидробионтов. Изв. ТИНРО. 1999. E. 125. С. 103-107.
18. Grawits M.A. La Chitine une ancienne Substance meconue // Chimie Actualites. 1975. 12 fevrier P. 33-36.
19. Marine Colloids // Food Emulsifiers: Chem., Technol., Funct. Prop. and Appl. Amsterdam, ets., 1989. P. 235-334.
20. Бабак В.Т., Риндо М. // Материалы Пятой конференции "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана" М.: ВНИРО, 1999. С. 206-210.

21. *Ким Г.Н., Сафронова Т.М.* //Тез. докл. Междунар. симп. "Пищевые биотехнологии: проблемы и перспективы в XXI веке" Владивосток: ДВГА ЭУ, 2000. С. 54-56.
22. *Сафронова Т.М., Максимова С.Н.* Определение вкуса пищевых продуктов, содержащих хитозан: Метод, указания. Владивосток: ДВГУ, 1997. 15 с.
23. *Максимова С.Н.* Интенсивность вяжущего вкуса хитозана в различных пищевых средах // Научн. тр. Дальрыбвтуза. Вып. 2, Владивосток: 1998. С. 104-107.
24. *Игнатюк Л.Н., Максимова С.Н., Сафронова Т.М.* // Материалы Третьей конф. "Совершенствование производства хитина и хитозана из панцирьсодержащих отходов криля и пути их использования". М.: ВНИРО, 1992. С. 83-89.
25. *Максимова С.Н.* Совершенствование технологии пищевого хитозана // Автореф. дисс. на соиск. степ. канд. техн. наук. Владивосток, 1998. 25с.
26. *Максимова С.Н., Игнатюк Л.Н.* Фракционирование хитозана // Науч. тр. Дальрыбвтуза. Вып. 2, Владивосток: 1998. С. 127-129.
27. *Г.А. Вихорева, В.П. Варламов, СВ. Немцев* и др. //Материалы Пятой конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. С. 219-222.
28. Пат. 1692012 РФ. А 23 L 1/33.
29. Пат. 1821471 РФ. А 23 L 1/33.
30. *Сафронова Т.М., Тунгусов Н.Г., Максимова С.Н.* //Тез. докл. V Междунар. симп. "Экология человека: пищевые технологии и продукты на пороге XXI века". Москва-Пятигорск: 1997. С. 214-215.
31. Пат. 2143826 РФ. А 23 L 1/33.
32. А.С. 1564764 РФ. А 23 L 1/33.
33. *Виноградов Б.Д., Ефимов А.А., Лукина Л.Н.* // Материал Третьей конф. "Совершенствование производства хитина и хитозана из панцирьсодержащих отходов криля и пути их использования" М.: ВНИРО, 1992. С. 105-107.
34. *Храмцова А.Г., Василисин СВ., Евдокимов И.А.* // Изв. вузов. Пищ. технол. 1997. № 1. С. 39-41.
35. *Евдокимов И.А., Василисин СВ., Алиева Л.Р.* //Материалы Пятой конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана" М.: ВНИРО, 1999. С. 31.
36. *Василисин СВ., Евдокимов И.А., Алиева Л.Р.* //Там же. С. 21-22.
37. Пат. 2137390 РФ. А 23 L 1/33.
38. *Сафронова Т.М., Бойцова Т.М.* //Там же. С. 251-252.
39. *Бондаренко И.В.* // Тез. докл. междунар. симп. "Пищевые биотехнологии: проблемы и перспективы в XXI веке". Владивосток: ДВГА ЭУ, 2000. С. 307-309.
40. *Ким Т.Н., Сафронова Т.М., Сахарова Т.Г.* // Материалы Шестой Международной конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана". М.: 2001. С. 177-178.
41. *Сафронова Т.М., Ким Т.Н., Ким И.Н.* // Тез. докл. междунар. симп. "Пищевые биотехнологии: проблемы и перспективы в XXI веке". Владивосток: ДВГА ЭУ, 2000. С. 52-54.
42. Патент РФ. А 23 L 1/33.
43. *Сафронова Т.М., Богданов В.Д., Максимова С.Н., Патришев СМ.* //Тез. докл. Четвертой конф. "Производство и применение хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1995. С. 63-65.
44. *Porre L., Knorr D.* // Food Technol. 1990. Vol. 44, N 7. P. 84-89.
45. *Богданов В.Д.* // Тез. докл. междунар. конф. Технология переработки гидробионтов. М.: ВНИРО, 1993. С. 92-94.
46. *Разыков А., Быков В.П.* // Тез. докл. Четвертой конф. "Производство и применение хитина и хитозана" М.: ВНИРО, 1995. С. 65-66.
47. *Богданов В.Д., Цимерман Е.И.* // Материалы Пятой конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. С. 213-214.
48. *Ким Т.Н., Сафронова Т.М.* //Тез. докл. междунар. симп. "Пищевые биотехнологии: проблемы и перспективы в XXI веке". Владивосток: ДВГА ЭУ, 2000. С. 191-193.
49. *Курко В.И.* Основы бездымного копчения. М.: Легкая и пищевая промышленность. 1984. 232 с.
49. *Ким Э.Н.* Основы бездымного копчения гидробионтов. Владивосток: Дальрыбвтуз, 1998, 180 с.
51. *Лейченко И.А.* Модифицирование целлюлозных материалов хитином и полиэлектролитным комплексом хитозан-карбоксиметилцеллюлоза. Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Рига. Институт химии древесины, 1991. 71 с.
52. *Вихорева Г.А.* Синтез и свойства водорастворимых производных хитина. Автореф. дис.... докт. хим. наук. М.: ВНИИПВ, 1998. 34 с.

53. Кайминъши И.Ф. // Материалы Пятой конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. С. 230-231.
54. Thomas W.R. // Prodr. Food, and nutr. S. 1982. № 6. P. 341-351.
55. Ким Г.Н., Сафронова Т.М., Ким И.Н., Кращенко В.В. Исследование взаимодействия хитозана с компонентами копильного препарата // Труды ТИНРО-центра. Т. 129. Владивосток: ТИНРО, 2001. С. 312-326.
56. Патент РФ А 23 L 1/33.
57. Кращенко В.В. // Материалы Шестой Междунар. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана" М.: ВНИРО, 2001. С. 201-204.
58. Papineau A.M., Hooker D.G., Knorr D. // Food biotechnol. 1990. V. 12, N 4. P. 215.
59. Wachter A.M., Stenberd E. // 1st international conference of the European chitin society. Abstracts Book Brest-France, 1995. P. 18.
60. Москаленко Т.М., Шепель Т.А., Сахарова Т.Г. // Тез. Четвертой конф. "Производство и применение хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1995. С. 17-18.
61. Сафронова Т.М., Ким Г.Н. // Материалы Четвертой Междунар. науч.-техн. конф. "Пища. Экология. Человек". М.: МГУПБ, 2001. С. 141-142.
62. Razdan A., Petterson D. // 1st international conference of the European chitin society. Abstracts Book Brest - France, 1995. P. 21.
63. Леваньков СВ., Купна Н.М., Блинов Ю.Г./I Материалы Пятой конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана" М.: ВНИРО, 1999. С. 44-46.
64. А.с. СССР 1035056. А 23 L 1/33.

ХИТОЗАН В КОСМЕТИКЕ

А.И. Албулов, А.Я. Самуйленко, М.А. Фролова

ЗАО "Биопрогресс", ВНИТИ БП, Щелково

Одним из наиболее перспективных направлений практического применения хитозана является парфюмерно-косметическая промышленность. Толчком для изучения хитозана как компонента косметических композиций послужил нефтяной кризис, наступивший после "синтетического бума" 1950-1960 гг. и массового увлечения синтетическими продуктами. Многие фирмы стали искать замену синтетическим полимерам, которые бы не уступали им по стоимости и по безопасности.

Впервые хитозан в качестве сырья для косметической промышленности был использован в 1970-е годы фирмой "Wella" (ФРГ) являющейся крупнейшим производителем косметики для волос. На прилавках магазинов появился шампунь с хитозаном, который сразу же завоевал популярность у потребителей. Широкое применение хитозана в косметике началось в 1985-1987 гг., когда японская компания "Fine cosmetic" разработала серию средств с хитозаном для ухода за волосами.

В лабораториях крупнейших производителей косметической продукции, а также косметического сырья (фирмы "Wella", ФРГ; "L'Oreal", Франция; "Fine cosmetic", Япония; "Union Carbide", США; в последние годы компания "Cognis", Германия, компания "Atrium Biotechnologies", Канада; ПКФ "Линда", Россия и ряда других) началось интенсивное исследование хитозана, его свойств и механизмов воздействия на кожу и волосы в составе косметических средств.

Поскольку нерастворимость хитозана в нейтральных водных средах сильно препятствовала его широкому использованию в косметике, были разработаны его водорастворимые формы - сукцинат, глутамат, сульфат, хлорид и др. [1-3]. В ЗАО "Биопрогресс" (г. Щелково) разработан способ получения натриевой соли сукцината хитозана, который выгодно отличается от уже известного способа, характеризующегося проведением синтеза водорастворимых форм хитозана в органических средах [4]. Полное удаление полярных органических молекул из полимеров или олигомеров возможно лишь из их тонких пленок в высоком вакууме и при повышенных температурах. Поэтому удаление органических растворителей из макрообъемов хитозана и его производных в вакууме и, тем более, при сушке на воздухе практически невозможно, вследствие этого в натриевой соли сукцината хитозана, получаемого по методике [4] обнаруживается при анализе и ощущается по запаху наличие органических растворителей.

В разработанном в ЗАО "Биопрогресс" способе получения натриевой соли сукцината хитозана применена интенсификация процесса посредством активации хитозана и его диспергирования, с которым и связано повышение степени доступности функциональных аминокрупп хитозана в реакции его химической модификации в водной среде.

Концентрат натриевой соли сукцината хитозана после его фильтрования подвергается высушиванию сублимационным методом или распылительной сушкой. Готовый препарат представляет собой чешуйки (при сублимационной сушке) или мелкодисперсный порошок (при распылительной сушке) без запаха, белого цвета с кремовым или сероватым оттенком, растворимый в воде, нерастворимый в этиловом спирте. Промышленная технология получения натриевой соли сукцината хитозана, разработанная и внедренная в ЗАО "Биопрогресс", является более

дешевой, а полученный препарат отвечает требованиям стандарта по наличию примесей, растворимости, вязкости, pH среды, влажности и другим показателям [5]. Полученная натриевая соль сукцината хитозана с положительным результатом прошла испытания в качестве биологически активной добавки в косметических кремах, шампунях, жидком мыле, гелевых зубных пастах.

Хитозан является одним из немногих катионных гидроколлоидов. Это придает ему уникальные свойства и большие преимущества при использовании в средствах по уходу за кожей и волосами. Будучи положительно заряженным, хитозан способен взаимодействовать с отрицательно заряженными биологическими тканями - кожей и волосами. Поликатионные свойства хитозана объясняют и второе важное его свойство - растворимость в водных кислых средах.

Гидрофобные свойства хитозана, связанные с наличием ацетилированных аминогрупп, обуславливают его взаимодействие с белками и липидами, входящими в состав не только клеточных мембран, но и межклеточного вещества. Липиды, как известно, играют важную роль в барьерной функции эпидермиса. Кроме того, хитозан удобен с точки зрения производственного процесса. Он прекрасно совместим с другими ингредиентами рецептуры косметических средств, не обладает токсичностью и аллергенностью, биodeградируем (разрушаем имеющимися в окружающей среде микроорганизмами), хорошо проникает через кожу, не имеет цвета и запаха, поэтому его можно считать сырьем для косметической продукции с высокой степенью безопасности [6].

В настоящее время хитозан нашел применение в составе средств для кожи и волос, а также в дезодорирующих композициях. В средствах для волос используется адсорбционная способность хитозана, он работает не только как фиксирующий полимер, но и как оптимизирующий пленкообразующий агент [7].

Как уже сказано, хитозан, содержащий в молекуле аминогруппы, в кислой среде ведет себя, с одной стороны, как катионный полимер. С другой стороны, поверхность волос в тех же условиях заряжена отрицательно, и между поверхностью волос и хитозаном возникает взаимодействие за счет ионного связывания. Адсорбция сильно зависит от pH, ионной силы и сопутствующих веществ, поэтому при производстве косметических средств необходимо тщательно следить за этими показателями.

Хитозан обладает в несколько раз большей влагоудерживающей способностью по сравнению с низкомолекулярными неионными и анионными соединениями. За счет удерживаемой воды увеличивается электропроводность волос, ингибируется накопление образующихся электростатических зарядов, а наличие одновременно катионных групп приводит к сильному эффекту удаления отрицательных зарядов с поверхности волос за счет нейтрализации. В результате у хитозана появляются более ярко выраженные антистатические свойства, чем у других катионных поверхностно активных веществ.

Хитозан хорошо фиксируется на волосах, не отшелушивается и не скатывается, делает волосы более эластичными без ощущения утяжеления и липкости, препятствует спутыванию волос за счет формирования на их поверхности пленки. Обработка волос средствами, содержащими хитозан, снимает электростатический заряд, придает им блеск. Кроме того, хитозан обладает некоторой противоперхотной активностью. Он также нашел применение в средствах для укладки волос, придавая им форму и объем [8-10].

Хитозан введен в рецептуру шампуней, бальзамов-ополаскивателей, жидкого мыла, гелей для душа, средств для укладки и завивки волос.

В средствах по уходу за кожей хитозан образует защитный слой, снижающий трансэпидермальную потерю воды, служит носителем для других ингредиентов,

не снижая их эффективности, а также повышает эффективность УФ-фильтров. К аминогруппам хитозана можно ковалентно присоединить вещества, поглощающие вредоносные УФ-излучения. Кроме того, аминогруппы хитозана, легко вступающие в реакцию с химически активными продуктами окисления и деградации непредельных жирных кислот (такими, как альдегиды, этоксисоединения и т.п.), эффективно защищают от них живые клетки кожи. Хитозан хорошо совместим с кожей, оставляет на ней приятное ощущение, делает кожу мягкой и гладкой [11].

В качестве компонента дезодорантов хитозан обладает рядом преимуществ по сравнению с другими ингредиентами (например, триклозаном или триэтилцитратом), а именно повышает дезодорирующий эффект, снижает риск раздражения, улучшает адгезию отдушки [12].

Благодаря своим бактерицидным свойствам, хитозан используется в противовирусных препаратах, а также любых других рецептурах с целью увеличения срока сохранности системы.

Свойства хитозана в значительной степени зависят от величины его молекулярной массы и степени деацетилирования. Хитозан, имеющий самую низкую молекулярную массу, показан к использованию для увеличения уровня антимикробных свойств продукта. Следующая молекулярно-массовая градация широко используется в продуктах по уходу за кожей и волосами. Самая высокая молекулярная масса соответствует хитозану, который обычно используют как натуральный вспомогательный ингредиент для улучшения вязкости продукта и его стабильности.

Разработан способ получения гидрогелеобразователя из хитозана. Продукт бесцветен и образует с водой высоковязкие гидрогели при концентрациях ниже 0,15%, отличающиеся однородностью и высокой вязкостью [13].

В последние годы начались интенсивные работы по использованию хитозана в качестве пленкообразователя для получения микрокапсулированных систем доставки активных ингредиентов, пригодных для использования в косметике. Поскольку хитозан формирует однородные и очень тонкие пленки, эти свойства стали использовать для отложения хитозана вокруг микрочастиц, представляющих собой активный ингредиент (витамины, отдушки, вкусовые добавки и др.). Стабильность активных веществ, находящихся внутри капсул, гораздо выше по сравнению с их некапсулированными формами. Обычно размер таких частиц составляет несколько миллимикрон. Полученный таким образом продукт состоит из твердых микрокапсул и имеет порошкообразный вид. Поскольку хитозан растворим в кислой водной среде, чтобы избежать растворения хитозановой стенки, микрокапсулы должны быть введены в масляную фазу или водную среду с нейтральным или щелочным pH. Микрокапсулы могут быть включены в состав помады для обеспечения пролонгированного вкусового эффекта, они подходят также для использования в других косметических продуктах, например, в твердых дезодорантах [14]. Нет сомнения, что подобные формы гидроколлоидов найдут широкое применение в косметике. За рубежом уже имеется опыт применения микрокапсул в новых косметических продуктах.

Открыта возможность применения раствора хитозана в пластической хирургии. Исторически сложилось, что для закрытия раневых поверхностей с XIX века и до 1990-х годов использовались концентрированные растворы перманганата калия (5%-ный раствор), что вызывало дополнительную болевую травму у пациентов и длительный отек мягких тканей, образование трещин на коже и иногда кровотечения. Как следствие такой обработки возникал химический ожог. Эти осложнения удалось исключить, применяя растворы хитозана. Проведенные в ЗАО "Академия красоты и здоровья" работы с хитозаном производства ЗАО

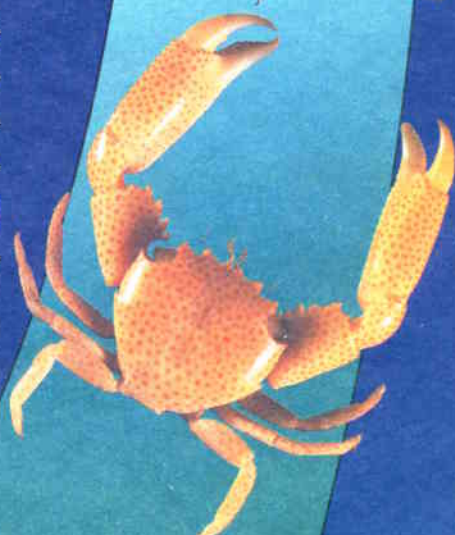
"Биопрогресс" позволили практически полностью исключить необходимость обработки раневой поверхности растворами марганца. Хитозановые покрытия применялись при операциях по поводу гемангиом, лазерных устранений пигментных невусов кожи, лазерной коррекции гипертрофических келлоидных рубцов, устранения морщин или рубцовой деформации кожи вследствие "угревой болезни". Неоспоримое преимущество хитозанового покрытия в послеоперационном периоде для закрытия эпидермальной или дермальной раны заключается в принципиально новой технологии течения раневого процесса по сравнению с ранее существующими препаратами, так как хитозан при наложении на кожу образует полупроницаемую мембрану, приводящую к выходу через нее послеоперационного экссудата. Вследствие этого полностью исключается обработка тканей в послеоперационном периоде растворами марганца. Дополнительный положительный лечебный эффект определяется благодаря таким качествам хитозансодержащих препаратов, как эластичность образующейся биопленки на любом участке лица и тела, что улучшает качество жизни пациента в раннем послеоперационном периоде. Кроме того, хитозановые препараты характеризуются отсутствием токсичности и аллергенности [15].

Интерес косметологов к хитозану по-настоящему велик. На российском рынке уже имеется большое разнообразие косметических средств, содержащих в своем составе хитозан. Теперь уже можно с определенностью говорить, что это продукция не только импортного, но и отечественного производства. Такие фирмы, как "Линда" (серия "Муссон"), "Маграв" (серия "Визави"), "Лорен косметик" (серия "Формула моря"), "Элси +" (серия "Домашний косметический салон"), "МН-Вуд" (серия "Жемчужина океана"), "Инат-Фарма", "Скена +", "Мимоза", "Агроветзащита" (серия зоошампуней) освоили хитозан в качестве косметического сырья и включили его в свои рецептуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Симонова Л.В., Пашук Л.К., Албулов А.И. и др. //Тез. докл. II Межд. науч.-практ. конф. "Биологически активные вещества и новые продукты в косметике". М.: РПКА, 1997. С. 13-17.
2. Иифантьев Н.Э., Чернецкий В.Н., Воронов А.Ф. и др. //Там же. С. 9.
3. Албулов А.И., Симонова Л.В., Фролова М.А. и др. // Материалы V конференции "Новые перспективы и исследования хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. С. 117-119.
4. Быков В.П., Быкова В.М., Кривошеина Л.И. и др. // Тез. докл. IV Всеросс. конф. "Производство и применение хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1995. С. 26-27.
5. Албулов А.И., Комаров Б.А., Самуйленко А.Я. и др. // Материалы V конференции "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: ВНИРО, 1999. С. 7-8.
6. Симонова Л.В., Пашук Л.К. II Косметика и медицина. 1998. № 1. С. 15-18.
7. Griesbach U., Panzer C., Wachter R. // Cosmetics & Toiletries. 1999. V. 114. P. 81-83.
8. Симонова Л.В., Пашук Л.К., Албулов А.М., Форменко А.С. //Тез. докл. Междунар. науч.-практ. конф. "Биологически активные вещества и новые продукты в косметике". М.: РПКА, 1996. С. 31.
9. Wachter R., Sternberg E. II Adv. Chitin Sci. 1996. V. 1. P. 381.
10. Ueno K., Yamaguchi T., Sakairi N. et al. // Adv. Chitin Sci. 1997. V. 2. P. 156.
11. Горлов И. И Сырье и упаковка для парфюмерии, косметики и бытовой химии // Приложение к журналу "Красота для профессионалов". 2001. № 3(13). С. 17.
12. Hohle M., Griesbach U. II Cosmetic & Toiletries. 1999. V. 114. P. 61-64.
13. Пат 2099352 РФ. С 08 В 37/08.
14. Виладот Ж.Л. II SOFW Journal (русская версия). 2001. № 3. С. 21-28.
15. Ларская М.В. //Матер. Науч. конф. "Физиотерапия, лазеротерапия, биологически активные вещества естественного происхождения (БАВЕП) в XXI веке". Черноголовка: ИПХФ РАН. С. 84-87.

Хитин и хитозан справедливо называют биополимерами 21 века. Их изучение становится отдельной отраслью науки, называемой «хитинологией». Получаемые из панцирей ракообразных и покрова насекомых эти вещества используются практически во всех сферах человеческой деятельности. Это экологически чистые биопестициды и радиопротекторы, биологически активные добавки и лекарства, косметические и ветеринарные препараты, биосенсоры и хроматографические материалы, а также многое другое.



«НАУКА»

ISBN 5-02-006435-1



9 785020 064355