

УДК 664.959

*С.В. Немцев***ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЕ ХИТИНА
В ГОМОГЕННЫХ УСЛОВИЯХ****Введение**

Как известно, при обработке хитина концентрированными (40–50%) растворами щелочей происходит отщепление ацетильных групп полимера с образованием хитозана при содержании свободных NH_2 -групп не менее 75%. Деацетилирование твердого измельченного хитина обычно проводят водными растворами щелочей при высоких температурах (100–140 °С), то есть в гетерогенных условиях. В аморфных участках полимера деацетилирование проходит быстрее, чем в кристаллических, в связи с чем распределение остаточных ацетамидных групп в полученном хитозане, видимо, неравномерно по длине цепи и может изменяться в зависимости от условий реакции, а также агрегатного состояния и свойств самого хитина (источника и способа получения, размера частиц, степени кристалличности и др.) [Muzzarelli, 1977].

Для снижения степени влияния этих факторов на воспроизводимость основных характеристик хитозана предпринимаются попытки перевести хитин в раствор и тем самым от гетерогенных условий реакции деацетилирования перейти к гомогенным.

Одной из таких попыток является возможность получения хитозана в 40%-ном растворе щелочи при длительном выдерживании суспензии хитина при 20 ± 2 °С [T. Sannan et al., 1976]. Такой способ проведения реакции позволяет получить хитозан со степенью деацетилирования до 90% и более равномерным распределением остаточных ацетамидных групп.

Другой попыткой перехода к гомогенным условиям деацетилирования является растворение хитина в щелочах умеренных концентраций при условии их замораживания — размораживания с образованием так называемого щелочного раствора хитина. Хитин, как и целлюлоза, имеет свойство набухать в щелочах, причем степень набухания увеличивается при снижении температуры. Ранее было показано [Лозинский и др., 1981], что при многократном замораживании — размораживании суспензии хитина в 8 %-ной NaOH образуется щелочной раствор хитина, и этот процесс не сопровождается заметным деацетилированием полимера. Поздними работами (Рогожин и др., 1986) была показана возможность проведения процесса растворения хитина в щелочах в одну стадию. Набухание и растворение хитина в щелочах приводят к активации полимера, аморфизации его структуры. Можно предположить, что деацетилирование криоактивированного хитина проходит в более мягких условиях с одинаковой скоростью во всех областях полимера, что дает возможность получать хитозан, характеризующийся равномерным распределением ацетамидных групп и свободных аминок групп по длине цепи.

Целью работы являлось изучение процесса растворения различных хитинов в разбавленных щелочах в широком температурном диапазоне и оптимизация деацетилирования этих хитинов в гомогенных условиях с дальнейшим определением параметров процесса получения хитозана из хитина, активированного однократным замораживанием — размораживанием в щелочи.

Материалы и методы

Для исследования процесса растворения хитинов в щелочах и дальнейшего деацетилирования их в гомогенных условиях брали хитин антарктического криля (*Euphausia superba* Dana), северной креветки из Баренцева моря (*Pandalus borealis*) и хитин камчатского краба *Paralithodes camtschaticus*. Хитин получали из замороженного панциря путем депротеинирования ферментными препаратами микробиологического и животного происхождения: протосубтилином Г20Х и панкреатином медицинским соответственно. Депротеинированный панцирь очищали от карбонатов раствором соляной кислоты и затем сушили либо замораживали.

Сухой или размороженный хитин механически измельчали и суспендировали в разбавленных щелочах до получения 1; 2; 3; 4 и 5%-ных суспензий, которые затем замораживали в криостате при температуре от -10 до -35 °С. Набухание и растворение хитина контролировали по внешнему виду образца. Было замечено, что процесс протекает наиболее эффективно в интервале от -27 до -35 °С. Размораживание щелочных растворов хитина проводили при 20 ± 2 °С. Хитин при этом сильно набухал, образуя щелочной раствор — вязкую, текучую, опалесцирующую жидкость от желтого до коричневого цвета.

Щелочной раствор хитина (ЩРХ) для деацетилирования выдерживали при комнатной температуре или подвергали нагреванию, при этом он терял текучесть и образовывал гель, который затем механически измельчали до частиц размером 3–5 мм и отмывали от щелочи дистиллированной водой. Хитин деацетилировали таким образом до хитозана, который сушили при 50 – 55 °С.

Степень деацетилирования образцов хитозана определяли методом кондуктометрического титрования, вязкость растворов — на ротационном вискозиметре, а молекулярную массу — методом капиллярной вискозиметрии на вискозиметре Убеллоде.

Результаты и их обсуждение

О ходе реакции деацетилирования хитина судили по качественным характеристикам полупродуктов и хитозана (растворимость в 2%-ной уксусной кислоте, вязкость растворов, степень деацетилирования (СДА) и молекулярная масса). Щелочные растворы с высокой концентрацией хитина (5%) имеют вид полупрозрачной опалесцирующей вязкой массы, а хитин — сильно набухших нерастворившихся частиц. При снижении концентрации хитина до 2% наблюдается образование однородных растворов, не разделяющихся на фракции. Концентрация хитина в ЩРХ зависит от источника и способа получения, так хитины, не подвергавшиеся сушке, растворяются в концентрациях до 4%, а сушеные хитины предпочтительно растворять при концентрациях 2–3%.

Зависимость степени растворения хитина от концентрации используемой щелочи наиболее ярко проявляется при приготовлении растворов с концентрацией полимера 1%. Хитин лучше растворяется в 13–15%-ных щелочах. Впоследствии было установлено, что такие растворы обладают наибольшей устойчивостью во времени, сохраняя текучее состояние без образования геля (желирования). Реологические свойства ЩРХ в 13%-ной NaOH характеризуют кривые, представленные на рис. 1, которые показывают, как с течением времени ЩРХ теряет текучесть до образования геля. ЩРХ, приготовленные с использованием 19- и 24%-ных растворов щелочи, обладают меньшей текучестью и менее устойчивы во времени (несколько часов), быстрее желируют. Растворение хитина в щелочи продолжается и после размораживания системы, так что ее неоднородность, на-

блюдаемая сразу после размораживания, снижается. К моменту желирования ЩРХ имеет вид однородной массы.

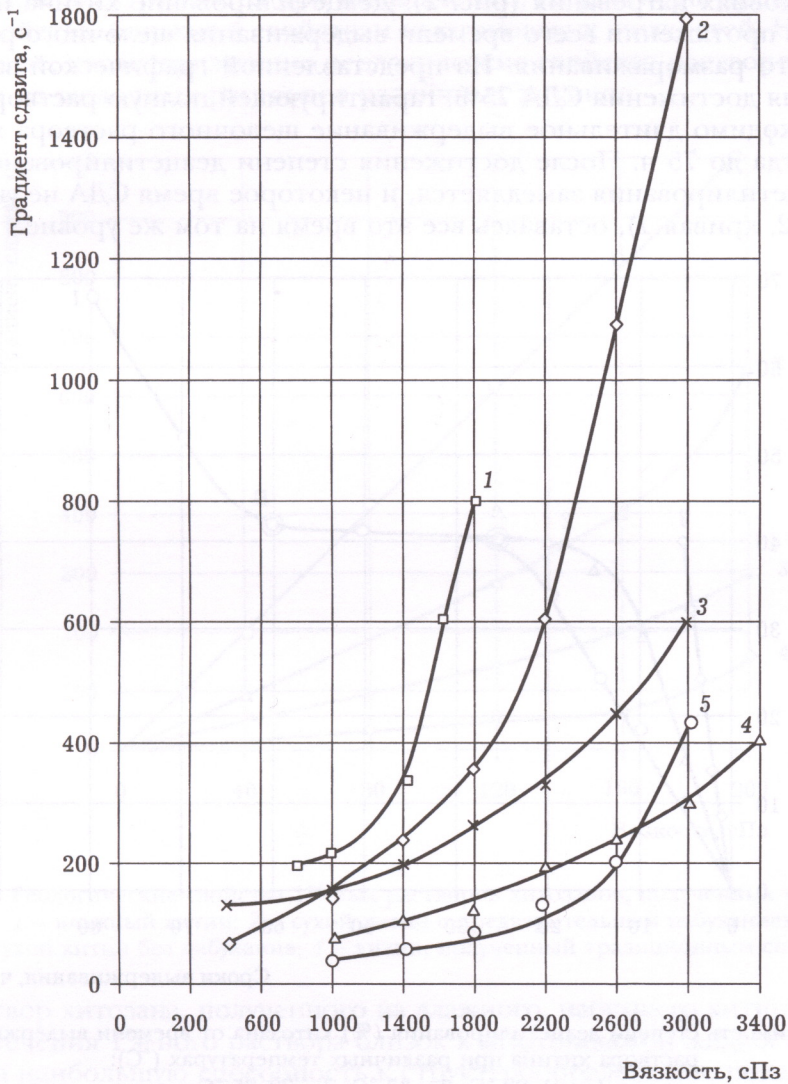


Рис. 1. Изменение вязкости щелочных растворов хитина разных сроков выдерживания при 20–22 °С ($C_{\text{хитина}} = 2\%$, $C_{\text{NaOH}} = 15\%$):
1 – 24 ч; 2 – 48 ч; 3 – 68 ч; 4 – 144 ч; 5 – 196 ч

Измельчение хитина до частиц размером 0,1–0,3 мм позволяет получать более однородные растворы. ЩРХ при выдерживании его при 18–20 °С с течением времени образует гель, обладающий способностью к синерезису. Происходит его фазовое расслоение с отделением щелочи исходной концентрации. Желирование ЩРХ связано с тем, что в нем проходит деацетилирование хитина и тем быстрее, чем выше концентрация использованной щелочи.

По достижении определенной СДА хитином ослабевает его взаимодействие со средой и усиливаются межмолекулярные контакты. Устойчивость ЩРХ к желированию зависит от скорости протекания деацетилирования и в комнатных условиях может колебаться от нескольких часов до нескольких суток.

Проведены опыты для выяснения вопроса об обратимости процесса образования щелочного раствора хитина. Для этого однородный ЩРХ, приготовленный из хорошо очищенного и тонко измельченного хитина, распределяли на стеклянной поверхности слоем толщиной 1–1,5 мм и сушили при 20±2 °С в течение 20–22 ч и при 40–50 °С в течение 5 ч. Хитин при этом образовывал пленку, способную снова растворяться в тех же условиях, при которых был получен его исходный ЩРХ.

Изучение деацетилирования хитина в щелочном растворе во времени при $20 \pm 2^\circ\text{C}$ показало, что процесс имеет ступенчатый характер, отличный от наблюдаемого в условиях нагревания (рис. 2). Деацетилирование хитина при $20 \pm 2^\circ\text{C}$ протекало на протяжении всего времени выдерживания щелочного раствора хитина после его размораживания. Из представленной графической зависимости видно, что для достижения СДА 75%, гарантирующей полную растворимость хитозана, необходимо длительное выдерживание щелочного раствора хитина при $20 \pm 2^\circ\text{C}$, иногда до 75 ч. После достижения степени деацетилирования 40–45% реакция деацетилирования замедляется, и некоторое время СДА не увеличивается (см. рис. 2, кривая 1), оставаясь все это время на том же уровне.

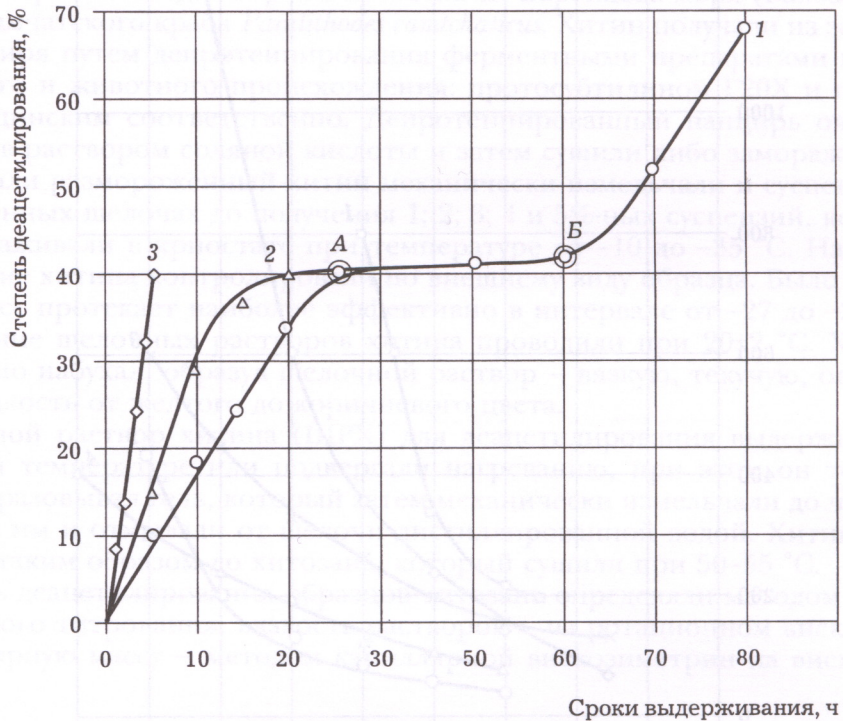


Рис. 2. Зависимость степени деацетилирования (%) хитозана от времени выдерживания (ч) раствора хитина при различных температурах ($^\circ\text{C}$):
1 — $21-22^\circ\text{C}$; 2 — 37°C ; 3 — $70-75^\circ\text{C}$

При наблюдении за состоянием ЩРХ замечено, что в промежуток времени, соответствующий на графике отрезку АБ, раствор остается в устойчивом гелеобразном состоянии. Это значит, что при СДА 40–45% (точка А) начинается желирование щелочного раствора хитина, а в момент, соответствующий точке Б, начинается синерезис геля. Таким образом, при проведении деацетилирования хитина в щелочном растворе при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ желирование ЩРХ наступает при достижении 40–45% СДА. Кривая 3 на том же рисунке иллюстрирует протекание деацетилирования хитина в щелочном растворе при нагревании до $70-75^\circ\text{C}$. При термообработке щелочной раствор хитина желирует в первые 20–30 мин и реакция деацетилирования проходит таким образом, что СДА хитина 40–45% достигается за 3–5 ч. Следовательно, если подвергнуть термообработке гель, образовавшийся при выдерживании щелочного раствора хитина при комнатной температуре (точка А), то можно получить высокодеацетилированный хитозан за более короткое время. Проведенные опыты подтвердили это предположение. Щелочной раствор хитина выдерживали при комнатной температуре до момента желирования, а затем нагревали без перемешивания до $70-75^\circ\text{C}$ в толще массы и поддерживали эту температуру 3–5 ч для ускорения реакции. Гель после термообработки измельчали, отделяли выделившуюся в результате синерезиса щелочь и затем отмывали до нейтральной реакции, получая в результате хитозаны с СДА 80–95%.

Хитозаны, полученные в описанных выше мягких условиях, отличаются по своим свойствам от хитозанов, изготовленных традиционными способами. Они практически не электризуются при измельчении, их растворы проявляют реологические свойства, близкие к свойствам ньютоновских жидкостей. На рис. 3 приведены кривые, характеризующие реологические свойства растворов хитозанов, полученных из щелочных растворов различных хитинов.

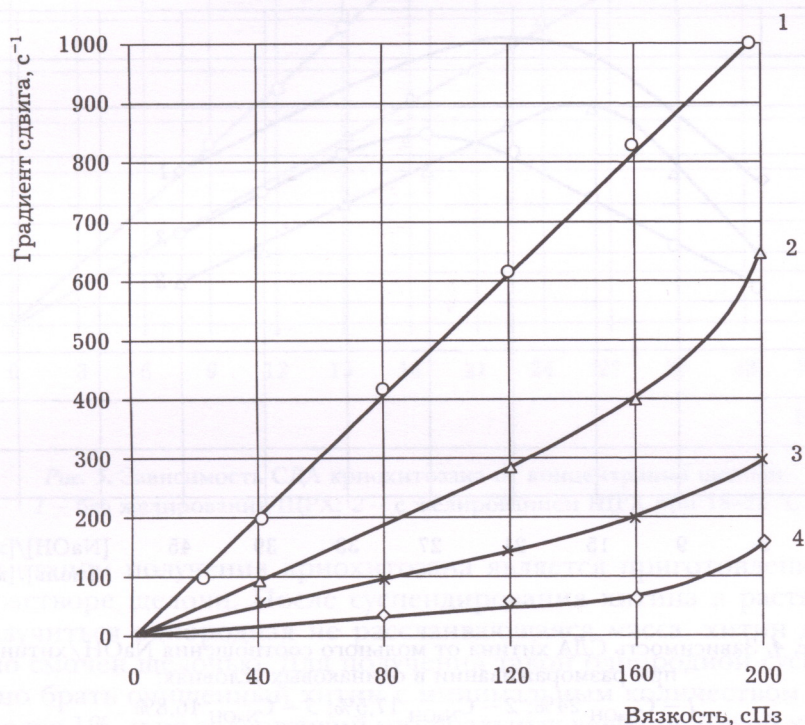


Рис. 3. Реологические свойства 1%-ных растворов хитозанов, полученных из ЩРХ: 1 — влажный хитин; 2 — сухой хитин с предварительным набуханием; 3 — сухой хитин без набухания; 4 — хитин, полученный традиционным способом

Так, раствор хитозана, полученного из влажного, набухшего хитина, по характеру кривой течения 1%-ного раствора близок к ньютоновской жидкости (см. рис. 3, кривая 1), а наибольшую способность к структурообразованию показывают хитозаны, изготовленные из сухого хитина без предварительного набухания перед замораживанием (см. рис. 3, кривая 3). Вероятно, что более полное растворение хитина в щелочи обеспечивает получение хитозана с более равномерным распределением амино- и ацетамидных групп и обладающего в связи с этим пониженной способностью к агрегации. Растворы такого хитозана при высокой молекулярной массе (500–600 кДа) имеют сравнительно низкую вязкость (200–250 сПз), а традиционные хитозаны при молекулярной массе 250–300 кДа имеют вязкость 600–700 сПз.

На рис. 4 представлены кривые зависимости СДА хитозанов от концентрации хитина в щелочном растворе (в виде мольного соотношения NaOH/хитин) при различных концентрациях используемых растворов щелочей. Наиболее эффективно деацетилирование проходит в областях сравнительно низких концентраций полимера, от 2,5 до 8%. При этом следует отметить, что применение более концентрированных щелочей (24%) дает возможность получать растворимый хитозан из щелочных растворов хитина с концентрацией до 8%, тогда как более разбавленные растворы щелочи (16,8%) предусматривают использование меньших концентраций хитина (2,5–4%). Из графиков, представленных на рис. 4, видно также, что повышение концентрации хитина в суспензии до 15% и выше приводит к получению хитозана с СДА менее 70%, что соответствует по свойствам нерастворимому набухающему полимеру. Вместе с тем высококонцентрированные по хитину щелочные растворы обладают очень высокой вязкостью, быс-

тро желируют, образуя при этом прочные гели. Эти свойства препятствуют проведению термообработки геля при перемешивании, а при термообработке в тонком слое такие прочные гели плохо отмываются от щелочи. Таким образом, для эффективного проведения деацетилирования хитина и последующей отмывки хитозана оптимальными оказываются 4–8%-ные ЩРХ.

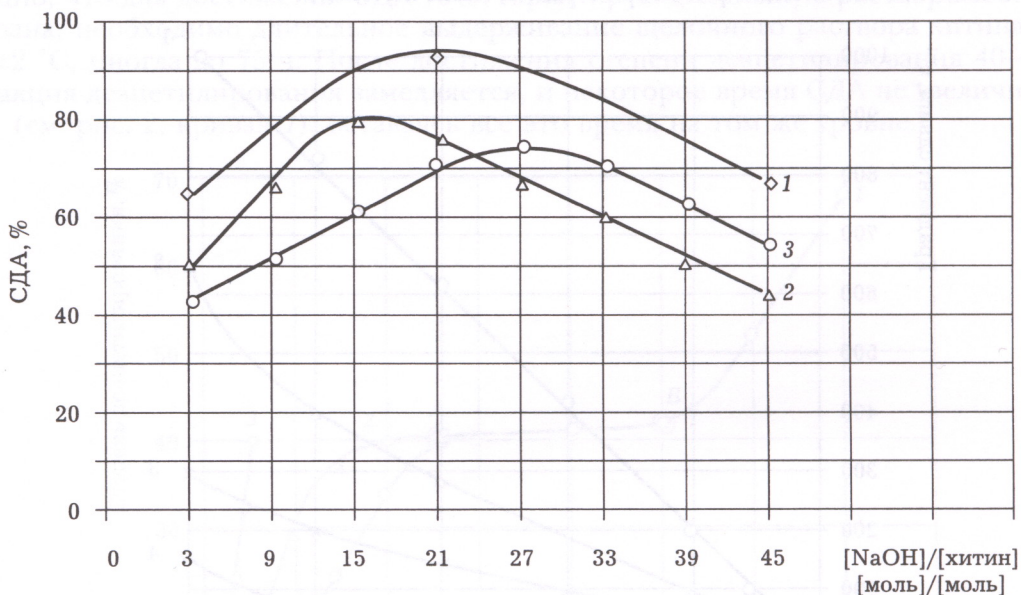


Рис. 4. Зависимость СДА хитина от мольного соотношения NaOH/хитин при размораживании в одинаковых условиях:
 1 — C_{NaOH} 24%; 2 — C_{NaOH} 17,5%; 3 — C_{NaOH} 16,8%

Выбор концентрации щелочи для получения ЩРХ определяется тем, чтобы обеспечить набухание и растворение хитина и при этом получить высокодеацетилированный хитозан. Кривые на рис. 5 иллюстрируют зависимость СДА хитозанов от концентрации используемой щелочи. Из представленных данных видно, что получение растворимого хитозана с СДА выше 70% возможно либо без предварительного выдерживания щелочного раствора хитина при комнатной температуре для желирования с использованием 30%-ной щелочи, либо с предварительным 16–20-часовым выдерживанием щелочного раствора хитина для желирования с использованием 19–24%-ной щелочи. На рис. 5 показано, что высокой степени деацетилирования можно достичь и с применением щелочи более низкой концентрации (13–16%), но в этом случае эффективное деацетилирование можно провести при концентрации хитина ниже 4%.

Таким образом, применение 19–24%-ного раствора щелочи оказывается предпочтительным, так как обеспечивает высокую степень деацетилирования за сравнительно короткое время и дает возможность остановить реакцию в любой момент, регулируя СДА получаемого хитозана.

Процесс получения хитозана из ЩРХ заключается в проведении термообработки при условии обеспечения равномерного прогревания всего раствора. Это условие может быть достигнуто либо при перемешивании ЩРХ, либо при его прогревании в тонком слое. Термообработка ЩРХ в тонком слое обеспечивает эффективную отмывку хитозана от щелочи, хотя и требует больших площадей для размещения поддонов с ЩРХ. Концентрация и источник получения хитина для приготовления ЩРХ определяют способ проведения термообработки. Более концентрированные (4–8%) по хитину растворы, приготовленные из чистого хитина и имеющие большую вязкость, обрабатывают в слое толщиной 1–1,5 см. Менее концентрированные (2–4%) ЩРХ и массы, содержащие не полностью растворившийся, набухший хитин, обрабатывают при перемешивании.

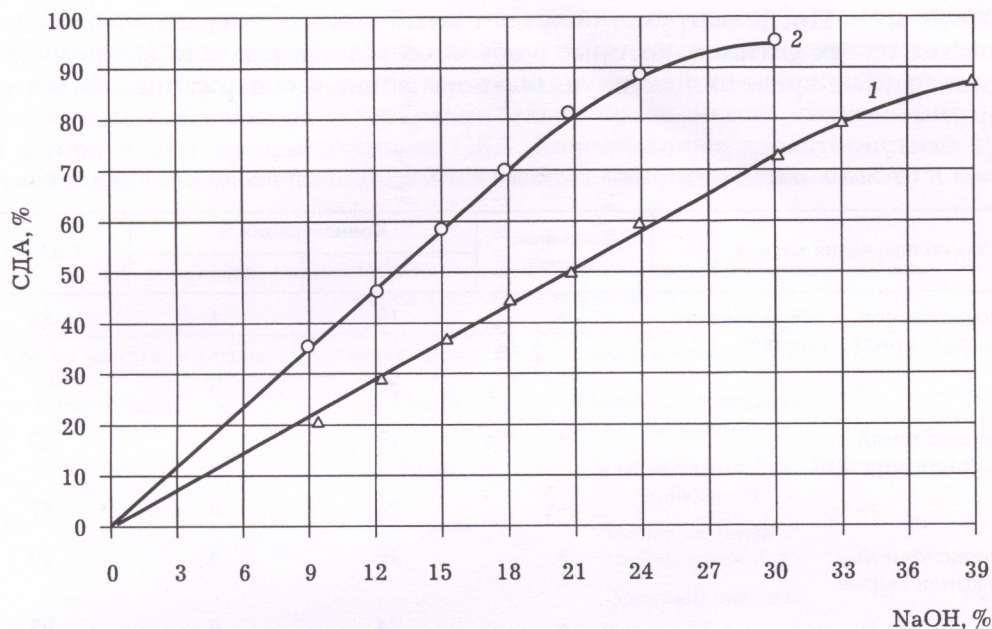


Рис. 5. Зависимость СДА криохитозана от концентрации щелочи: 1 — без желирования ЩРХ; 2 — с желированием ЩРХ при 18–22 °С

Первым этапом получения криохитозана является приготовление суспензии хитина в растворе щелочи. После суспендирования хитина в растворе щелочи должна получиться однородная не расслаивающаяся масса, хитин должен быть равномерно смочен щелочью. Для получения такой однородной суспензии предпочтительно брать очищенный хитин с минимальным количеством остаточного белка, не более 1%, и не содержащий минеральных веществ. Сухой хитин должен быть измельчен до порошкообразного состояния с размером частиц менее 0,3 мм, а влажный (сразу после получения) или размороженный хитин можно использовать без измельчения.

Хитины, полученные из панциря ракообразных различными способами, образуют щелочные суспензии различной плотности и устойчивости к расслоению. Самые плотные, нерасслаивающиеся суспензии образуют хитины, полученные путем последовательного депротенирования панциря крыла ферментным препаратом протосубтилином и 1–2%-ным раствором NaOH. Хитины, полученные из креветки и краба, хуже растворяются в щелочи при замораживании — размораживании. Так при описанных выше условиях крылевый хитин образует однородные вязкие ЩРХ, креветочный хитин — неоднородные растворы с явно выраженными слоями, а крабовый хитин не образует текучих растворов.

Данные по оптимальной концентрации хитинов разных способов получения в ЩРХ и СДА полученных из них хитозанов приведены в табл. 1. Для получения растворимого хитозана из различных хитинов требуется подбор условий суспендирования для каждого конкретного случая. Так хитины крыла, образующие устойчивые нерасслаивающиеся суспензии при концентрации полимера 4%, способны образовывать хитозан с СДА выше 75% уже в 16–18%-ных растворах щелочи. Хитины крыла, образующие устойчивые суспензии при более высоких концентрациях полимера (6–8%), и грубые хитины креветки и краба, не образующие устойчивых суспензий, требуют для получения из них хитозана применения щелочей 20–24%-ной концентрации.

Для дополнительной активации хитина перед замораживанием проводили набухание полимера в течение 2–3 ч. Эффективным оказался также способ мокрого размола хитина, суспендированного в щелочи необходимой концентрации. Опыты по мокрому размолу хитина проводили на измельчителе-экстракторе конструкции НПО «Мир» (Россия). Для этого брали сухой неизмельченный хитин, смешивали его с раствором щелочи и подвергали обработке в измельчителе в те-

чение 20–30 мин. После выгрузки получали устойчивую нерасплаивающуюся суспензию даже из тех хитинов, которые в обычных условиях давали неоднородные суспензии (грубые креветочные хитины с повышенным содержанием белка – до 3% и др.).

Таблица 1. Оптимальная концентрация хитина в ЩРХ и СДА полученного из них хитозана

Способ получения хитина	Состояние хитина	Концентрация, %		СДА, %
		NaOH	хитина	
Кислотно-щелочной, с добавлением ПАВ, панцирь криля сушеный	+	19	4	86
>>	-	24	8	88
Кислотно-щелочной, панцирь криля вареный	+	19	4	85
>>	-	24	8	87
Кислотно-щелочной, панцирь криля сырой	+	19	4	90
>>	-	24	8	93
Ферментативный, протосубтилин, панцирь криля вареный	+	19	4	96
>>	-	24	8	91
Ферментативный, панкреатин, панцирь криля вареный	+	19	4	88
>>	-	24	8	90
Кислотно-щелочной, панцирь креветки	+	24	4	89
Ферментативный, протосубтилин, панцирь креветки	+	24	8	88
Кислотно-щелочной, панцирь краба	+	24	8	48
>>	-	24	4	61

Примечание. + хитины, подвергнутые сушке; – несухие хитины.

Проведение активации хитинов перед криообработкой не только улучшало качество ЩРХ, но и позволяло получать хитозаны с более высокой СДА, данные по которым приведены в табл. 2.

После замораживания – размораживания суспензии хитина оценивали качество полученного ЩРХ и принимали решение о способе его термообработки. Однородные ЩРХ распределяли тонким слоем (1–1,5 см) на поддоне из нержавеющей стали и выдерживали 18–24 ч при комнатной температуре для желирования. Затем гель хитина подвергали термообработке при 75–85 °С в течение 3–5 ч, отделяли его от выделившейся щелочи, измельчали на фрагменты размером 0,5 × 0,5 см и отмывали дистиллированной водой до нейтрального рН промывных вод. Промытый гель сушили при 50–60 °С. Неоднородные ЩРХ, содержащие большое количество набухшего нерастворившегося хитина, подвергали термообработке при 85–90 °С и перемешиванию.

Высушенный хитозан, названный нами криохитозаном, измельчали до порошкообразного состояния и определяли его качественные характеристики. В отличие от хитозана, полученного традиционными способами, криохитозан практически не электризуется при измельчении. Это можно объяснить тем, что традиционный хитозан сохраняет волокнистую структуру хитина и прочное строение хитинового скелета панциря. При разрушении этих структур в процессе измельчения выделяется энергия, проявляющаяся в электризуемости порошка хитозана. При получении криохитозана в процессе растворения хитина в щелочи ука-

занные структуры разрушаются, и криохитозан имеет аморфное строение, молекулы слабо связаны между собой. Хитозаны, полученные традиционным способом, сильнее деструктурированы в результате воздействия жестких режимов обработки, чем и объясняются их сравнительно более низкие молекулярные массы при одинаковых с криохитозанами СДА. Качественные характеристики криохитозанов в сравнении с традиционными хитозанами показаны в табл. 3.

Таблица 2. СДА хитозанов, полученных с применением активации хитина перед криообработкой ЩРХ

Способ получения хитина	Состояние хитина	Способ активации хитина	СДА хитозана, %
Кислотно-щелочной, хитин криля	Сухой	Неизмельченный без набухания	78
То же	То же	Измельченный без набухания	82
>>	>>	Измельченный с набуханием 2 ч	87
>>	>>	Мокрый размол	94
Ферментативный, хитин криля, протосубтилин	>>	Неизмельченный без набухания	80
То же	>>	Измельченный без набухания	83
>>	>>	Измельченный с набуханием 2 ч	90
>>	>>	Мокрый размол	95
Кислотно-щелочной хитин креветки	>>	Измельченный без набухания	75
То же	>>	Измельченный с набуханием 2 ч	79
>>	>>	Мокрый размол	86
Кислотно-щелочной, хитин краба	Влажный	Неизмельченный без набухания	78
>>	>>	Измельченный с набуханием	86

Таблица 3. Характеристики хитозана, полученного разными способами

Способ получения хитина	Способ получения хитозана	СДА, %	Молекулярная масса, кДа
Кислотно-щелочной, в мягких условиях	Криоактивация	85	480
	Традиционный	85	320
Кислотно-щелочной, в жестких условиях	Криоактивация	86	360
	Традиционный	80	250
Ферментативный, протосубтилин	Криоактивация	74	220
	Традиционный	85	170
Ферментативный, панкреатин	Криоактивация	96	180
	Традиционный	95	120

Таким образом, деацетилирование хитина в гомогенных условиях открывает возможность регулировать процесс температурным и временным факторами, что дает возможность сохранить высокую молекулярную массу исходного полимера. Полученные при этом полимеры с заданным значением СДА могут сохранять структуру и высокую молекулярную массу.

Литература

- Лозинский В.И., Гамзаде А.И., Рогожин С.В., Даванков В.А., Цюрупа М.П.* 1981. А. с. СССР № 827492. Б.И. 1981.- № 17.- С. 90.
- Рогожин С.В., Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Кулакова В.К., Гамзаде А.И., Быкова В.М., Немцев С.В., Лобова Е.И.* 1986. А.с. СССР № 1363831.- Б.И. 1986.- № 48.- С. 282 .
- Muzzarelli R.A.A.* 1977. Chitin.: Pergamon Press, Oxford. P. 96-98.
- Saman T., Kurita K., Iwakura Y.* 1976. Die Makromolekular Chemie.- N. 177.- P. 3589-3600.