

Министерство образования и науки Российской Федерации
Государственное образовательное учреждение высшего
профессионального образования
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ»

**И.И. Осовская, Д.Л. Будилина
Е.Б. Тарабукина, Л.А. Нудьга**

ХИТИН-ГЛЮКАНОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ
(ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ)

Учебное пособие

**Санкт-Петербург
2010**

УДК 678.0 (076)
ББК 35.71я7
О 352

Осовская И.И., Будилина Д.Л., Тарабукина Е.Б., Нудьга Л.А.
Хитин-глюкановые комплексы (Физико – химические свойства и молекулярные характеристики): учебное пособие / под ред. Г.М.Полторацкого; /ГОУВПО СПбГТУРП.- СПб., 2010. - 52 с.

Учебное пособие включает разделы дисциплин « Гидрофильные свойства природных полимеров», «Общая химическая технология полимеров» и др.

В пособии рассматриваются физико – химические свойства хитозана, хитина, существующего в природе в виде хитин-глюкановых комплексов, высокая биологическая активность которых при отсутствии токсичности определяют перспективы их использования в медицине, биотехнологиях, косметической, пищевой, текстильной и многих других отраслях.

Предназначается для студентов ХТФ по специальности 240501 «Химическая технология ВМС», бакалавров и магистрантов по направлению 240100 «Химическая технология и биотехнология».

Рецензенты: д-р техн. наук, профессор. зав. кафедрой технологии бумаги и картона ГОУВПО СПбГТУРП А.С.Смолин;

д-р хим наук., зав лаб. ИВСРАН А.М. Бочек

Рекомендовано к изданию Редакционно-издательским советом университета в качестве учебного пособия.

©ГОУВПО «Санкт-Петербургский
государственный технологический
университет растительных полимеров»,2010
©Осовская И.И.,Будилина Д.Л.
Тарабукина Е.Б.,Нудьга Л.А.,2010

Введение

В настоящее время внимание ученых и технологов привлекают природные полимеры как экологически безопасные вещества, получаемые из возобновляемых источников. Среди них прочное место заняли хитин и его производные. Способность этих полисахаридов к волокну- и пленкообразованию, ионному обмену, высокая биологическая активность при отсутствии токсичности определяют перспективы их использования в медицине, биотехнологиях, косметической, пищевой, текстильной и многих других отраслях. Следует отметить и такие медицинские аспекты, как применение в лечебной практике радиационно-модифицированных гетерополисахаридов, в частности, хитозана. Параллельно с этим при использовании радиационной технологии автоматически решается и проблема обеззараживания материалов, уничтожения патогенной микрофлоры. Хитозан (ХТ) является одним из наиболее эффективным радиопротектором. Важным его отличием являются его биосовместимость (приготавливается из природного хитина) и биоразрушаемость под действием ферментов, что является не всегда желательным фактором. Для обеспечения пролонгированного действия хитозана имеются, как минимум, два возможных пути. Первый путь – это изменение его молекулярной структуры, увеличение плотности упаковки с соответствующим уменьшением доступности звеньев ХТ для ферментов. Второй путь – это перевод ХТ в водонерастворимую форму.

1. ХИТИН

Хитин – природный полисахарид, имеющий химическое строение поли[1 -> 4 β, D-2 – ацетамино – 2 - дезокси-β-D-глюкопираноза] (рис.1)

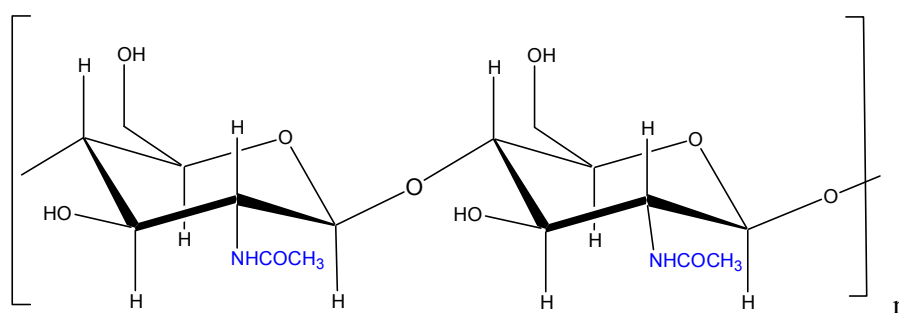


Рис.1 Структурная формула хитина

Хитин чрезвычайно широко распространен в природе, образуя наружный скелет ракообразных, насекомых, содержится в некоторых видах водорослей, в грибах, дрожжах и других микроорганизмах. Присутствуя в организмах, хитин представляет собой комплексы с белками, глюканами.

Эти комплексы часто содержат соли кальция (CaCO₃). Поэтому для выделения хитина в чистом виде необходимо проводить деминерализацию (удаление CaCO₃) и депротеинизацию разбавленными растворами соляной кислоты и едкого натра, соответственно. Комплексы хитина с глюканами практически неразделимы и потому используются при модификации совместно.

Хитин – высококристаллический полимер, в котором существуют внутри- и межмолекулярные связи как между гидроксильными группами, так и между гидроксильными и аминацетильными группами. Это обуславливает

низкую хелатирующую способность хитина по отношению к ионам металлов. Для усиления связывания ионов металлов необходимо разрушить надмолекулярную структуру хитина либо заменить ацетамидную группу на аминную, либо ввести дополнительно хелатирующие группы (аминокислотные, карбоксильные, фосфорнокислые и т.д.).

Несмотря на близкое химическое строение хитина и целлюлозы, их свойства существенно различаются. В отличие от целлюлозы, хитин слабо набухает в растворах щелочей и не растворяется в растворителях, применяемых для целлюлозы: медно-аммиачном комплексе, железо-винно-натриевом комплексе, гидроокиси триэтилбензиламмония, кадмий-этилендиаминовом комплексе. Вероятно, это обусловлено отсутствием в макромолекуле хитина двух рядом стоящих гидроксильных групп, которые ответственны за образование молекулярных соединений в молекулах целлюлозы.

Хитин может быть растворен в концентрированных соляной, серной азотной и фосфорной кислотах. При растворении хитина в кислотах происходит его постепенный гидролиз. В результате глубокого гидролиза образуется соответствующая соль глюкозамина.

Растворы хитина в кислотах неустойчивы, их вязкость меняется во времени. Поэтому невозможно определить истинное значение молекулярной массы хитина по измерениям характеристической вязкости, а также методами осмометрии, светорассеяния или седиментации-диффузии в растворах кислоты. Была сделана попытка оценить молекулярную массу хитина по измерениям его вязкости в 50%-ой азотной кислоте с последующей экстраполяцией измеренных значений на нулевое время растворения. Сопоставление полученных значений с аналогичными величинами вязкости древесной целлюлозы в медно-аммиачном растворе показало, что хитин и древесная целлюлоза имеют близкие молекулярные массы. Однако этот метод весьма приблизителен.

Для оценки степени полимеризации (СП) хитина был применен метод медных чисел (определение содержания концевых амидных групп). Исследуемый образец хитина имел СП 103.

При нагревании хитин растворяется в концентрированных растворах некоторых солей, причем по силе диспергирования соли располагаются в ряд: $\text{LiSCN} > \text{Ca}(\text{SCN})_2 > \text{CaJ}_2 > \text{CaBr}_2 > \text{CaCl}_2$. Частичное растворение хитина наблюдается в смесях диметилформаида с двуокисью азота.

Хитозан

Химические свойства хитозана зависят от химической структуры. Большое количество свободных аминогрупп в молекуле хитозана определяет его свойство связывать ионы водорода и приобретать избыточный положительный заряд, поэтому хитозан является прекрасным катионитом. Кроме того, свободные аминогруппы определяют хелатообразующие и комплексообразующие свойства хитозана. Химическая структура хитозана показана на рис. 2.

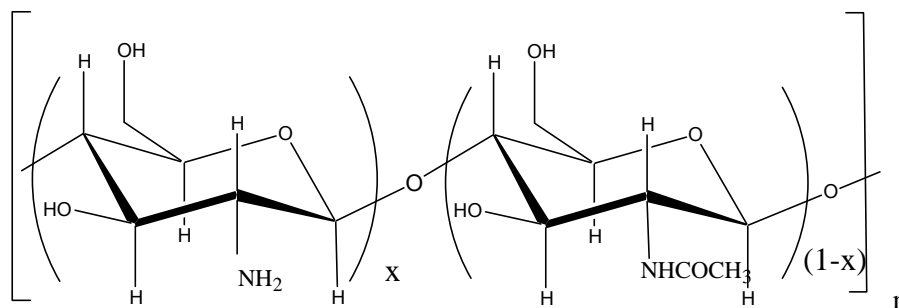


Рис.2. Хитозан (1→4, β,D 2-амино, 2-дезоксиглюкопираноза)

Сказанное объясняет способность хитозана связывать и прочно удерживать ионы металлов (в частности радиоактивных изотопов и токсичных элементов) за счет разнообразных химических и электростатических взаимодействий.

Большое количество водородных связей, которые способен образовывать хитозан, определяют его способность связывать большое

количество органических водорастворимых веществ, в том числе бактериальные токсины, образующиеся в толстом кишечнике в процессе пищеварения.

С другой стороны, обилие водородных связей между молекулами хитозана приводит к его полной растворимости в воде, поскольку связи между молекулами хитозана более прочные, чем между молекулами хитозана и молекулами воды. Вместе с тем, хитозан набухает и растворяется в органических кислотах – уксусной, лимонной, щавелевой, янтарной, причем при набухании он способен прочно удерживать в своей структуре растворитель, а также растворенные и взвешенные в нем вещества.

Хитозан также способен связывать предельные углеводороды, жиры и жирорастворимые соединения за счет гидрофобных взаимодействий и сетчатой структуры, что сближает его по сорбционным механизмам с циклодекстринами.

Расщепление хитина и хитозана до N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкозамина происходит под действием микробных ферментов – хитоназ и хитобиаз, поэтому они полностью биологически разрушаемы и не загрязняют окружающую среду.

Таким образом, хитозан является универсальным сорбентом, способным связывать огромный спектр веществ органической и неорганической природы, что определяет широчайшие возможности его применения в жизни человека.

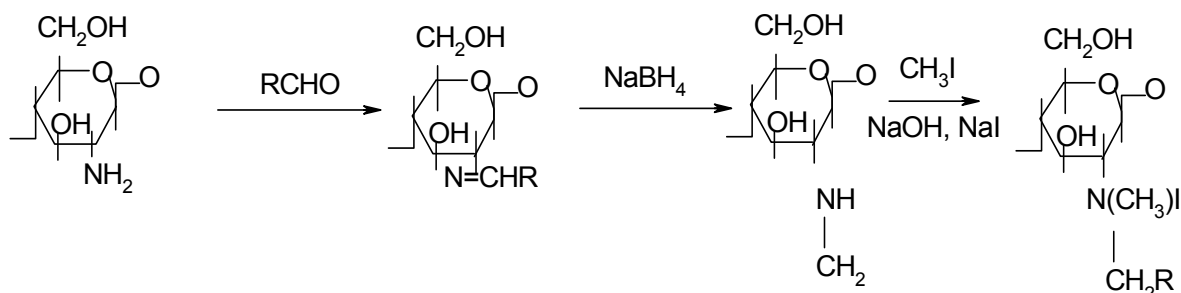
Несмотря на огромную литературу о связи сорбционных свойств хитозана с его химической структурой, нельзя сказать, что исследования в области химии хитина/хитозана близки к завершению. Постоянно открываемые новые свойства этого вещества, в частности, обнаруженная биологическая активность еще не получила должного объяснения с точки зрения химической структуры. Имеющиеся данные, что характер биологической активности хитозана зависит от его молекулярного веса и степени деацетилирования, нуждаются в дальнейшей проверке и изучении.

Этот обзор является более актуальным, так как выяснение связи химического строения и биологической активности позволит создавать вещества, сохраняющие известные свойства хитозана и обладающие новыми полезными качествами.

Производные соединения хитозана, такие как N,N,N-триметил хитозан, N-N-пропил-N,N-диметил хитозан и N-фурфурил-N,N-диметил хитозан были получены при использовании в качестве исходного продукта 96%-й хитозан со степенью деацетилирования 96% и следующими молекулярными массами – $2,14 \cdot 10^5$; $1,9 \cdot 10^4$; $7,8 \cdot 10^3$. Аминогруппы хитозана реагируют с альдегидами в промежуточном соединении – основании Шиффа. Четвертичные соли хитозана были получены при реакции основания Шиффа с йодистым метилом. На степень превращения в четвертичное соединение и водорастворимость, получившегося производного, влияла молекулярная масса исходного образца хитозана.

Хотя хитина в природе много, он имеет ограниченное применение из-за его недостаточной растворимости и реакционной способности. Хитозан растворим в уксусной кислоте и в других органических растворителях. Хитозан обладает некоторым бактерицидным и фунгицидным действием. Однако хитозан показывает свою биологическую активность только в кислой среде, так как он плохо растворяется при pH выше 6,5. Таким образом, водорастворимые производные хитозана, которые растворяются в кислоте, могут иметь хорошие шансы быть внедренными в медицинскую практику как антибактериальные средства. Четвертичные аммониевые соли хитозана были исследованы на предмет увеличения растворимости. Опубликована информация о формировании N-диметил хитозана и получении N-триметил хитозана йодида с формальдегидом и боргидридом натрия. Триметил хитозан йодид аммония был также получен реакцией низкоацетилированного хитозана с йодистым метилом и гидроксидом натрия при контролируемых условиях. N-алкил хитозан был приготовлен введением алкильной группы в аминные группы хитозана через основание Шиффа. Для получения

четвертичной аммониевой соли хитозана, которая растворяется в воде, была произведена реакция производных N-алкил хитозана с йодистым метилом. Антибактериальное действие данного производного хитозана усиливалось с увеличением длины цепи алкильного заместителя.



Было исследовано влияние молекулярной массы на антибактериальную и фунгицидную активность. Противобактериальное действие четвертичного производного хитозана против *Escherichia coli* исследовались расчетом минимальной останавливающей рост бактерий концентрации (МОРБК) и минимальной бактерицидной концентрации (МБК) в воде, 0,25%-й и 0,5%-й среде уксусной кислоты. Результаты показывают, что антибактериальная активность против *Escherichia coli* связана с молекулярной массой. Антибактериальная активность четвертичных аммониевых солей хитозана в среде уксусной кислоты более выражена, чем в воде. Их противобактериальное действие тем более выраженное, чем выше концентрация уксусной кислоты. Найдено, что бактерицидное действие производного сильнее, чем хитозана.

Хитозан с молекулярной массой в пределах от 10000 до 100000 может быть полезен для ограничения роста бактерий. Хитозан кальмара с молекулярной массой 220000 проявляет наибольшую противобактериальную активность. Хитозан со средней молекулярной массой 9300 эффективен для ограничения роста *Escherichia coli*, в то время, как хитозан с молекулярной массой 2200 ускорял рост численности бактерий.

В отечественной литературе есть информация о синтезе четвертичных аммониевых соединений хитозана с применением органических оснований и

исследования, посвященные свойствам полученных соединений. Для синтеза применялись перегнанные сухие метил- и этилиодид. Иодистоводородную кислоту, образующуюся во время реакции, связывали органическими основаниями: пиридином, 2,4-лутидином, 2,4,6-коллидином и триэтиламино. Полученное соединение выделяли из реакционной смеси фильтрованием, отмывали метанолом, сушили.

Было установлено, что pK_a хитозана 6,30. Был сделан вывод, что повышение степени N-алкилирования будет наблюдаться при использовании оснований с $pK_a > 6,30$. Опыты показали, что наиболее глубоко реакция идет в присутствии триэтиламина, pK_a которого гораздо выше, чем у хитозана. Установлено что, N-триметил- и N-триэтилхитозаны являются полиэлектролитами и их основность увеличивается с ростом степени замещения.

Лечение ран с применением N-карбоксибутил хитозана

У больных, перенесших восстановительную хирургию, донорские участки лечились мягкими прокладками N-карбоксибутил хитозана. При сравнении с контрольными донорскими участками была обнаружена лучшая васкуляризация и отсутствие воспалительных клеток на кожном уровне. Применение N-карбоксибутил хитозана приводило к формированию регулярно-органической кожной ткани и уменьшало аномальное заживление.

Одно из преимуществ, полученных при использовании N-карбоксибутил хитозана при заживлении ран,- обеспечение гелеподобного слоя при контакте с раневыми жидкостями. Данный слой обеспечивает превосходную защиту недавно сформированных тканей от механических повреждений. Внешняя поверхность прокладки принимала вид корки и обеспечивала защиту против вторичных инфекций ввиду бактерицидности полимера. В течение периода заживления форма раны сохранялась, хотя ее размер уменьшался быстро и без осложнений, в противоположность контрольным группам. В контрольных группах форма раны была вскоре потеряна после традиционного лечения.

В ранних стадиях восстановления ткани N-карбоксивбутилхитозаном способствует формированию свободной соединительной ткани, а не больших плотных волоконных связок, облегчая тем самым диффузию. Соединительная ткань регулярно и надлежащим образом структурирована без значительных рубцов и обладает хорошей функциональностью, т.е. прочностью при растяжении. При образовании эпителия трехмерная решетка является очень важной составляющей. N-карбоксивбутил обеспечивает такую решетку и возможно модулирует образование эпителия.

Таким образом, N-карбоксивбутил хитозан может классифицироваться как новый тип биологически активных перевязочных средств.

1.1. Пленки и волокна на основе хитина и хитозана

Пленки из дисперсии хитина были впервые получены в 1926 г., а позже была проведена разработка процесса получения пленок. Пленки получали путем нанесения дисперсии ксантогената хитина на стеклянную подложку с последующей регенерацией хитина в коагуляционной ванне. Коагуляционная ванна содержала 40% сульфата аммония и 5% серной кислоты в воде.

Полученные пленки имели прочность на разрыв 9,49 кгш/мм² в сухом и 1,75 кг/мм² во влажном состоянии. Пленки не набухали в воде, разбавленных кислотах и щелочах и органических растворителях. Этот способ был положен в основу получения смешанных хитино-целлюлозных волокон через ксантогенаты хитина и целлюлозы. Волокна, полученные таким образом, обладают повышенной крашиваемостью и по свойствам подобны рами.

Волокна, полученные из частично гидролизованного хитина, имеют ионообменные свойства и могут быть использованы для регенерации и очистки антибиотиков, аминокислот и других органических кислот.

Пленки из хитозана и его солей получают из кислотных или водных растворов. Пленки обладают высокой прочностью, стойкостью по

отношению к щелочам, а также хорошими электротехническими свойствами. При ацетилировании таких пленок под действием уксусной кислоты и дициклогексилкарбодиимида в щелочи или в воде Б, содержащей органическое основание, получают хитиновые пленки с высокой механической прочностью, жесткостью и прозрачностью. Пленки из регенерированного хитина сохраняют свои свойства в течение 30 лет.

1.2. Надмолекулярная структура хитина

Многочисленные исследования структуры хитина позволили сделать вывод о том, что хитин обладает высокоупорядоченной стереорегулярной структурой. Рентгенограммы хитина показывают хорошо очерченную орторомбическую решетку. Цепи макромолекул хитина связаны сильными водородными связями, как по группам NH и CO, так и по оксигруппам. Кристаллическая структура хитина подтверждается также данными ИК-спектроскопии. Анализ ИК-спектров дает возможность сделать заключение о наличии в хитиновых волокнах водородных связей CO ··N-H и отсутствии в кристаллах хитина свободных групп OH, NH и C=O, не включенных в водородные связи.

OH группа при C(6), которая имеет свободное вращение, вероятно, связана внутримолекулярной водородной связью с кислородом мостика и атомом азота соседней глюкозаминной единицы.

Рентгенографические исследования последних лет выявили существование хитина в трех кристаллических формах, α , β и γ , отличающихся размерами кристаллической решетки. Кристаллическая решетка хитина орторомбическая. Элементарная ячейка решетки содержит фрагменты только двух цепей, идущих в противоположных направлениях.

ХИТИН-ГЛЮКАНОВЫЙ КОМПЛЕКС – АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ХИТИНА

Присутствие хитина в грибах было обнаружено в конце XVIII века. Последующие исследования доказали его идентичность с животным хитином. Распространенность грибных организмов в природе и их высокая продуктивность делает этот источник хитина промышленно значимым, особенно при использовании мицелия грибов, применяемых в биотехнологических процессах получения органических кислот, ферментов, антибиотиков. Расположение этих производств в промышленных центрах и крупнотоннажность производств поставили задачу утилизации мицелиальных отходов, а стабильность технологических условий гарантируют стандартность мицелиальных отходов. В этих биотехнологиях используются низшие грибы родов *Allomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Phicomycetes* и др. Наиболее экономически выгодным направлением утилизации мицелиальных отходов является их использование для очистки сточных вод и концентрирования ядерных отходов. Однако хитин-глюкановый комплекс (ХГК), как было показано исследованиями последнего времени, представляет собственную ценность, так как он обладает особыми сорбционными и биоактивными свойствами. Поэтому изучение ХГК, его строения и модификации имеет как научный, так и практический интерес.

Кроме мицелиальных грибов, промышленный интерес представляет большая группа высших грибов *Higher Basidiomycetes*, содержание хитина в которых достигает 50 и даже 65%, так как они могут культивироваться на отходах лесоперерабатывающей, целлюлозно-бумажной и пищевой промышленности. Перспективны и дереворазрушающие грибы *Phanerochaete sanguinea* и *Ganoderma applanatum*, при культивировании которых образуются ферментные комплексы, разлагающие лигнин. Культуральная жидкость может быть использована для бесхлорной отбелилки целлюлозы, а грибные тела - в качестве источника хитина (содержание хитина составляет 10-15%). При использовании этой эффективной и экологически чистой

технологии отбели в целлюлозно-бумажной промышленности, количество отходов (грибных тел) также будет иметь промышленное значение.

2.1. Хитин-глюкановый комплекс как компонент клеточных стенок грибов

Хитин-глюкановый комплекс (ХГК), подобно целлюлозе в растениях и хитину в беспозвоночных, является структурообразующим компонентом и входит в состав клеточных стенок грибов. Кроме этого назначения, хитин несет и другие физиологически важные для организма гриба функции. Рост клеточных стенок регулируется синтезом хитина, который идет через образование уридинфосфата-N-ацетил-D-глюкозамина с участием ферментов фосфоацетилглюкозаминмутазы и УДФ-ацетилглюкозаминпирофосфорилазы и в дальнейшем - хитинсинтазы и хитинсинтазы. Исследования последнего времени показали важную роль хитиназы, которая регулирует образование кристаллического β -хитина, моделирует микрофибриллы хитина в зависимости от типа клеточных стенок, контролирует образование связей хитина с другими компонентами клеточной стенки, а также процессов автолиза и ветвлений.

Содержание хитина значительно колеблется даже у одного и того же рода грибов, а в пределах одного вида зависит от штамма и от условий культивирования гриба.

Единственный вид грибов *Mucorales* способен синтезировать в клеточной стенке хитозан *in vivo*, количество которого составляет до 10% от сухой массы грибов. Именно наличие хитозана сообщает мицелию гриба высокую биоактивность.

В клеточной стенке грибов хитин находится не в свободном состоянии, а связан ионными или водородными связями с полисахаридами, липидами, белками и микроэлементами, причем эти комплексы являются более прочными

и специфичными, чем природные белковые комплексы хитина в кутикуле беспозвоночных.

2.2. Биоактивные свойства ХГК

Хитин грибов находит пока ограниченное практическое использование по сравнению с хитином ракообразных. Однако интенсивные исследования последнего времени выявляют все новые основания для прогнозирования его конкурентоспособности с животным хитином в разных областях хозяйственной деятельности человека, а особенно в качестве биологически активных веществ и вспомогательных материалов.

Открытие противоопухолевой активности биополимеров клеточной стенки японского гриба *Lentinus edodes* вызвало создание на основе этих соединений препарата «Лентинан» (Япония) для лечения онкозаболеваний. Установлено, что и другие высшие грибы (*Neomycota*) содержат в клеточной стенке высокомолекулярные гетерогликаны и полиаминосахариды, обладающие выраженной противоопухолевой активностью.

К настоящему времени установлено наличие ранозаживляющей активности мицелия хитина низших грибов (*Eomycota*), в частности мукоровых грибов. На основе хитина мукорового гриба *Blakeslea trispora* создан препарат «Микоран» (Россия), рекомендованный в качестве ранозаживляющего средства противожогового назначения. Ранозаживляющее действие выявлено и у других низших грибов *Mucorales* – *Phycomyces blakesleeanus*. Ускорение заживления ран под действием мицелия низших грибов объясняют стимулированием активности пролиферации фибробластов кожи человека, которые прикрепляются к микрофибриллам хитина. Активному заживлению ран способствует также свойство хитина грибов генерировать микроколичества перекиси водорода. Предполагается,

что использование мицелия *Mucorales* обеспечит одновременно и защиту от опасного микроорганизма – синегнойной палочки.

На основе ХГК высших грибов (*Basidiomycetes*) создан препарат «Микотон», состоящий из хитина, глюкана и меланина, для лечения ряда заболеваний, вызываемых бактериями и вирусами.

Особый интерес ХГК вызывает как аналог пищевых волокон, которые сорбируют в желудочно-кишечном тракте канцерогенные вещества, ионы тяжелых и радиоактивных металлов, активируют деятельность желудка.

На основе ХГК грибов разработаны препараты для предпосевной обработки семян, что увеличивает урожайность и устойчивость к грибковым заболеваниям сельскохозяйственных культур. Показано, что устойчивость к корневой гнили и головне у ячменя значительно возрастает при применении препарата «Микосан», содержащего глюканы базидиомицетных грибов и хитозан. В Японии разработан стимулятор роста растений, состоящий из хитозана, органических кислот и аминокислот. Хитозан действует на *Fusarium solani*, останавливая рост этих патогенных для растений грибов.

Еще одним направлением в практическом использовании ХГК грибов является получение на его основе сорбентов.

Мицелий мукоровых грибов, содержащий природный хитозан, используется для создания «нетканых» материалов. Эти мицелиальные материалы обладают токсическим действием в отношении ряда патогенных грибов, вызывающих кожные микозы, а также ранозаживляющей активностью. Такие материалы благодаря наличию положительного заряда могут также найти применение в качестве фильтров для очистки жидких и газообразных сред от аэро- и гидрозолей.

Применение ХГК в качестве добавок в хлебо-булочные изделия удлиняет сроки хранения хлеба и препятствует его черствлению. Сорбционные свойства такого хлеба обуславливают его использование для выведения ионов тяжелых металлов из организма, что важно для лечебно-профилактического питания

лиц, занятых в металлургических, гальванических и тому подобных производствах.

Успехи в выявлении биологической активности мицелия и ХГК различных грибов привело к появлению новой области медицины – микологической фармакопеи.

2.3. Состав хитин-глюканового комплекса

Биоактивные свойства ХГК определяются наличием в нем хитина и существенно зависят от его количества. В связи с этим анализ состава ХГК, выделенных из биомассы различных грибов важен для обоснования направления использования того или иного вида гриба.

Присутствие глюкана в ХГК изменяет свойства этого комплекса по сравнению с чистым хитином животного происхождения. Так, например, глюкановая составляющая понижает термостабильность ХГК по сравнению с хитином; прочность пленок, сформованных из ХГК, ниже прочности пленок из хитина или целлюлозы. Возможно, такие особенности физико-механических свойств связаны с большей дефектностью надмолекулярной структуры ХГК, обнаруженной авторами работы.

Количество хитина можно учитывать либо по содержанию глюкозамина в клеточной стенке, либо выделяя его из грибной биомассы. Как выше упоминалось, в работах ученых разных специальностей, в частности биологов и химиков, наблюдается довольно широкий разброс данных по соотношению хитина и глюкана в ХГК. По-видимому, это обусловлено разным подходом как к выделению ХГК из биомассы, так и к определению его компонентов.

Изучали состав ХГК, выделенного из мицелия *Aspergillus niger* – продуцента лимонной кислоты, *Aspergillus terricola* – продуцента фермента террилитина, из дрожжевой массы *Saccharomyces cerevisiae*, из биомасс дереворазрушающих грибов *Fomes fomentarius*, *Phanerochaete sanguinea* и *Ganoderma applanatum*.

Выбор объектов исследования был обусловлен их промышленной значимостью фактической или перспективной.

Для выделения ХГК из биомассы грибов проводили последовательную экстракцию горячей водой, спирто-бензольной смесью, 6%-м раствором NaOH и для образцов с высокой минерализацией 2%-м раствором HCl. Температура экстракции и ее длительность зависела от морфологии образца.

Выделенный ХГК анализировали по элементному составу, а затем подвергали полному гидролизу. В гидролизате спектрофотометрически определяли глюкозу и глюкозамин. Анализ приведенных данных показывает, что из мицелиальных грибов самое высокое содержание ХГК найдено в *Aspergillus niger*, причем оно зависит и от способа культивирования, и от питательной среды.

Таблица 1. Характеристика и состав ХГК из различных источников

N п/п	Источник	Количество ХГК в мицелии, %	Элементный состав ХГК, %				Состав ХГК, %		
			С	Н	N	Зол а	Хитин	Глюка н	Меланин
1	<i>Aspergillus niger</i>	49,8	37,7	5,9	2,7	7,4	81,6	15,1	3,3
2		45,5			2,4		97,4	0,5	2,1
3		41,8	44,1	6,8	2,9	0,9	97,0	2,3	0,7
4	<i>Aspergillus terricola</i>	25,8	44,3	6,7	3,4	0,5	71,0	25,0	4,0
5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11,0	44,9	7,2	1,2	0,4	57,0	43,0	0
6	<i>Fomes fomentarius</i>		41,1	6,4	0,8	2,4	71,8	18,0	10,2
7	<i>Phanerochaete sanguinea, 16-65</i>	16,7	41,5	6,5	2,2	0,7	59,0	41,0	0
8	<i>Ganoderma applanatum 4-94</i>	12,2	42,8	7,0	2,2	0	74,0	26,0	0
9	<i>Ganoderma applanatum 40-90</i>	20,0	42,0	6,6	1,6	0,9	64,0	36,0	0

Примечание. Обр. 1 и 2 – промышленные, выращены на меласной питательной среде, обр.3 – выращен в лаборатории ВНИИПАК на сахарозо-минеральной среде, обр. 1 и 3 выращены глубинным, обр.2 – поверхностным способом культивирования, обр. 7 - 9 выращены в лабораторных условиях поверхностным способом на глюкозо-минеральной среде.

2.4. Гидролиз хитин-глюканового комплекса гриба *Aspergillus niger* фосфорной кислотой

При анализе состава ХГК был использован классический метод химии полисахаридов – полный кислотный гидролиз соляной кислотой до моносахаридов. Более мягким гидролизующим агентом является 85%-я фосфорная кислота. Применение ее для гидролиза хитозана при комнатной температуре дает олигосахариды со степенью полимеризации (СП) 17 с выходом 43% за 4 недели или СП=7 с выходом 12,5% за 6 недель. Гидролиз проводили при 293, 323 и 353К с определением в пробах растворимости, абсолютной вязкости гидролизата, а также количество глюкозы, N-ацетилглюкозамина и глюкозамина. Количественный анализ моносахаридов осуществляли фотокolorиметрически по поглощению хромогенов, образующихся при реакции глюкозы с антроном, глюкозамина с салициловым альдегидом, N-ацетилглюкозамина с N,N-диметил-п-аминобензальдегидом. Время растворения ХГК в 85% H_3PO_4 зависит от температуры гидролиза и составляет 5 суток при 293К и 30 мин при 353 К. Абсолютная вязкость растворов при этом снижается, асимптотически приближаясь к постоянному значению $\cong 10$ сПз (рис.2). Кривые такого типа характерны для гидролиза целлюлозы трифторуксусной кислотой – резкое падение вязкости в начальный период с выходом на плато со значением вязкости, отвечающим предельной степени полимеризации.

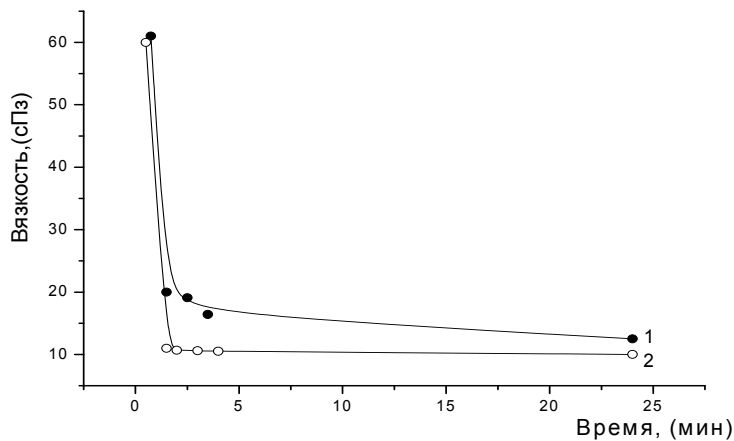


Рис.2. Изменение абсолютной вязкости гидролизатов ХГК во времени при 323К (1) и 353К(2)

В гидролизатах ХГК, полученных при 293К и при 323К, присутствуют глюкоза и N-ацетилглюкозамин, причем количество глюкозы достигает предельного значения, отвечая полному гидролизу глюкана, содержащегося в ХГК, за 4 ч при 293К и за 45 минут при 323К. Количество N-ацетилглюкозамина нарастает медленно, составляя в конце реакции лишь 2,5% и 8% от исходного полимера соответственно, тогда как в ХГК содержится 81,6% хитина. Глюкозамин в пробах не обнаружен (рис.3).

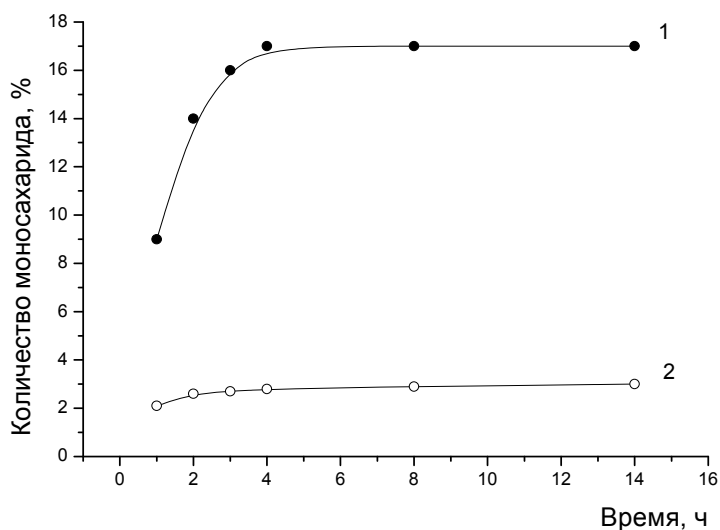


Рис.3. Изменение количества глюкозы (1) и N-ацетилглюкозамина (2) в гидролизате во времени при 293К

Иной характер имеет гидролиз при 353К – количество глюкозы нарастает в течение 1 ч. Накопление N-ацетилглюкозамина наблюдается в течение

первых 30 мин, после чего его количество снижается, одновременно в пробах появляется глюкозамин, количество которого увеличивается до 60% в конце реакции (рис.4). Глюкозамин образуется в результате отщепления N-ацетильной группы от N-ацетилглюкозамина, то есть это вторичный процесс гидролиза, имеющий место только при высокой температуре.

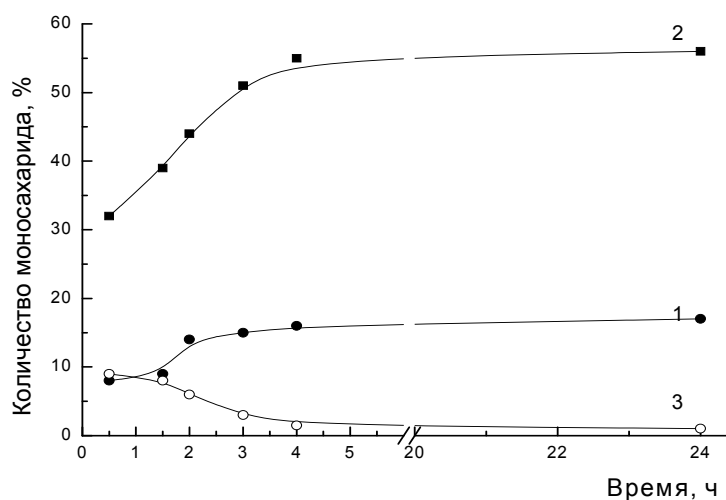


Рис. 4. Изменение количества глюкозы (1), глюкозамина (2) и N-ацетилглюкозамина (3) в гидролизате во времени при 353К

На основании кинетических данных рассчитаны начальные скорости гидролиза, константы гидролиза и E_a гидролиза хитиновой и глюкановой компонент ХГК (табл.2, рис.5).

Таблица 2. Константы и энергия активации гидролиза глюкановой и хитиновой компонент ХГК

Компоненты ХГК	T (K)	$1/T \times 10^3$	$K \times 10^5$	$-\lg K$	E_a КДж/моль
Глюкановая	293	3.413	1.1428	4.942	57.44
	323	3.096	100.0	3.000	
	353	2.833	794.3	3.900	
Хитиновая	293	3.413	0.107	5.9701	89.99
	323	3.096	6.667	4.1760	
	353	2.833	87.50	3.0580	

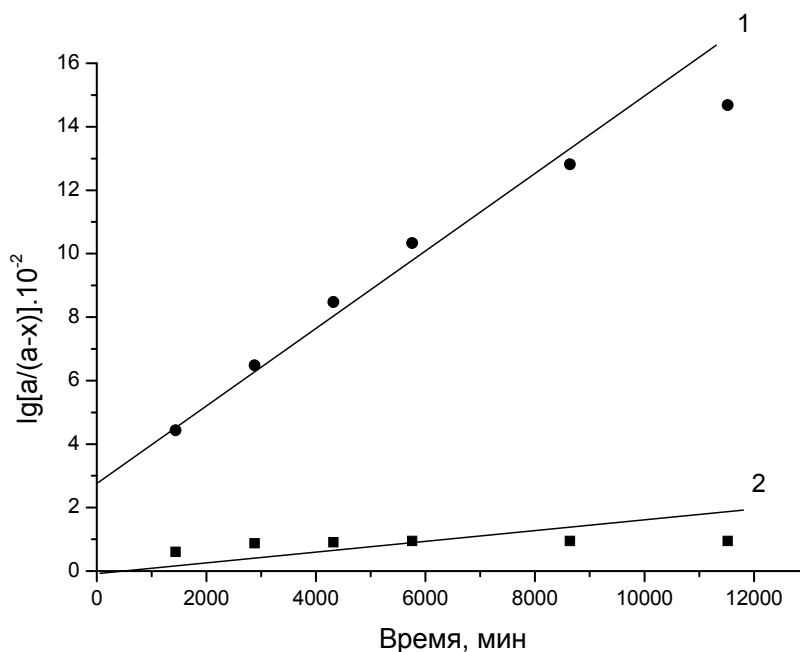


Рис. 5. Определение констант скорости гидролиза глюкоановой (1) и хитиновой (2) составляющих ХГК при 293К

Полученные значения E_a для хитиновой и глюкоановой составляющих ХГК существенно ниже известных литературных данных для хитина $E_a=106,22$ кДж/К.моль и для ламинарина, имеющего строение поли- β -1 \rightarrow 3-глюкопиранозиды, то есть наиболее близкое к строению глюкоановой части ХГК, $E_a= 110.82$ кДж/К.моль. Существует мнение, что энергия активации гидролиза глюкозидной связи почти не зависит от молекулярной массы полисахарида, особенностей состава и строения молекулы полисахарида. Однако влияние надмолекулярной организации на энергетику процесса гидролиза нельзя исключить. В отличие от хитина и ламинарина, имеющих высококристаллическую надмолекулярную организацию, ХГК имеет мезоморфную структуру, в которой система межмолекулярных водородных связей сильно нарушена. Быстрый переход реакции гидролиза из гетерогенных в гомогенные условия снимает влияние диффузионных процессов. Вероятно, именно доступность глюкозидной связи для гидролизующего агента ответственна за низкие значения E_a . Кроме того, не исключено, что разветвленная структура ХГК, где основная скелетная цепь –

хитин, а боковые короткие цепи 1→3 глюкоана, облегчает гидролиз как хитиновой, так и глюкоановой компоненты.

Из приведенных выше данных следует, что состав гидролизатов сильно зависит от температуры и времени гидролиза. В составе конечных гидролизатов при 293К присутствует глюкоза, N-ацетилглюкозамин в суммарном количестве 20% от взятого для гидролиза ХГК, следовательно, 80% приходится на олигосахариды. При 323К гидролизат содержит те же моносахариды в количестве 25% от исходного ХГК и 75% олигосахаридов. При 353К в составе гидролизата находится 78,7% глюкозы, N-ацетилглюкозамина и глюкозамина и 21,3% олигосахаридов. Так как из гидролизатов олигосахариды не осаждаются ацетоном, то можно предположить, что их степень полимеризации не превышает 10.

Анализ олигосахаридного состава конечного гидролизата, полученного при 323К методом гель-хроматографии, показал, что основная часть олигосахаридов имеет СП=5-6 (рис. 6). Именно при таком значении СП хитоолигосахариды имеют наибольшую биологическую активность.

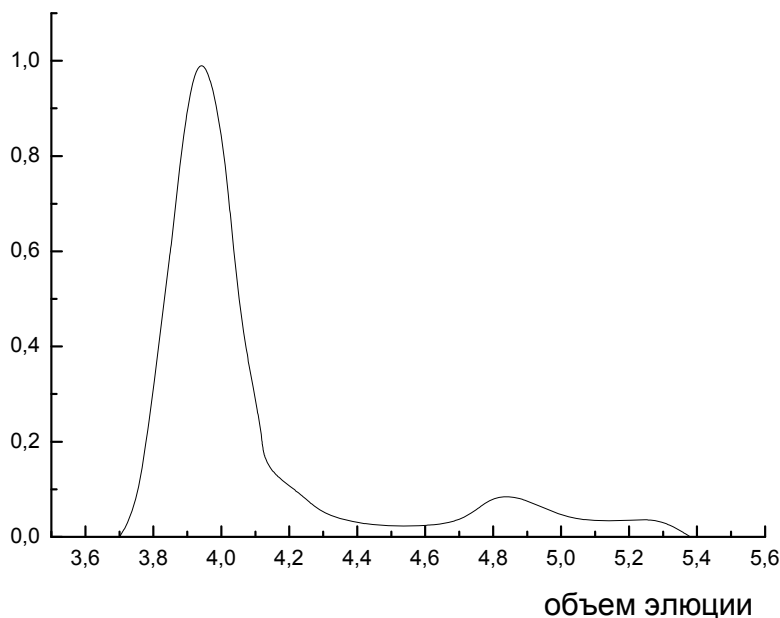


Рис.6. Хроматограмма гидролизата ХГК, полученного при 323К в течение 1 ч

2.5. Химическая структура ХГК *Aspergillus niger*

Структурные компоненты клеточных стенок грибов *Aspergillus niger* содержат полиаминосахарид хитин и глюкан, имеющий β -(1→3) гликозидные связи. Согласно последним данным, между хитином и глюканом существуют ковалентные связи, которые придают устойчивость ХГК и делают невозможным выделение одного из компонентов без разрушения другого. В процессе образования ковалентной связи между хитином и β -(1→3) глюканом принимает участие фермент хитиназа-3.

Молекула хитина первоначально связана с растворимым глюканом – предшественником нерастворимого. Хитиновая цепь растет с восстанавливающего конца и сразу переносится на глюкан. Этот механизм образования выяснен при изучении строения ХГК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* путем введения тритиевой метки в ХГК и сопоставления строения продуктов кислотного и ферментативного гидролиза. Помимо ковалентной связи хитин-глюкан в ХГК, существуют и поперечные ковалентные связи в микрофибриллах, которые образуют хитин и триплексный хеликс β -(1→3) глюкана, что способствует упрочнению клеточной стенки гриба.

Это представление о химическом строении ХГК *Aspergillus niger* еще не устоялось и является предметом изучения ряда исследователей, которые в своих работах доказывают существование ковалентной связи между хитином и глюканом посредством пептидного мостика, то есть существование пептидоглюканов. Между тем, такой тип связи более характерен для моллюсков, насекомых и ряда высших грибов.

Наиболее вероятной, по-видимому, является химическая структура ХГК, изображенная на рис.7, где хитин связан ковалентно связью β -(1→3) с β -(1→3) глюканом. Поперечные связи между макромолекулами на схеме не отражены, но их наличие подтверждается особенностями течения реакций модификации ХГК.

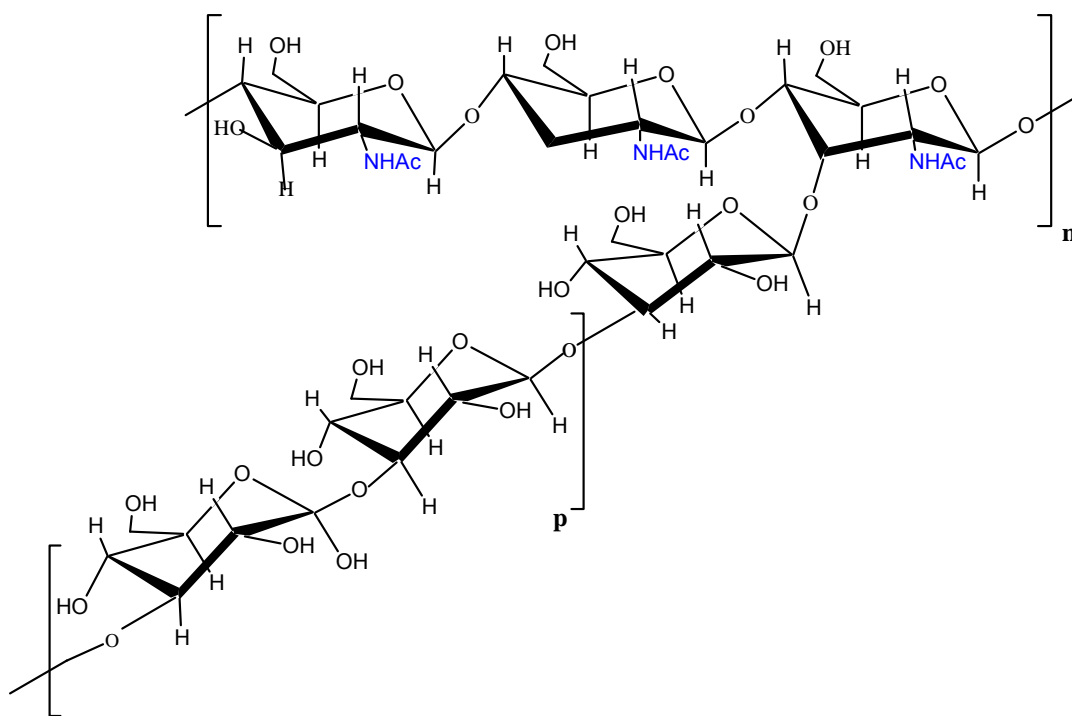


Рис.7. Химическая структура хитин-глюканового комплекса гриба *Aspergillus niger*: n – степень полимеризации хитиновой компоненты ХГК; p – степень полимеризации глюкановой компоненты

2.6. Надмолекулярная организация ХГК

Происхождение ХГК определяет его морфологию. Это может быть коротковолокнистый материал (*Aspergillus niger*, *Fomes fomentarius*) или тонкодисперсный порошок (*Aspergillus terricola*, *Saccharomyces cerevisiae*). Однако надмолекулярная организация ХГК, извлеченных из указанных организмов, примерно одинакова. Рентгенодифрактометрия ХГК, полученных из различных источников (рис. 8), показала, что дифракционные картины всех образцов аналогичны и содержат рефлексы, характерные для хитина животного происхождения ($2\theta=9^{\circ}40'$, 13° и 27°), но в области $2\theta=19-21^{\circ}$, где обычно располагаются самые сильные рефлексы кристаллического хитина ($2\theta=21^{\circ}18'$, $20^{\circ}18'$) присутствует острое аморфное гало. Наиболее аморфизованным из исследованных образцов является ХГК *Saccharomyces cerevisiae*. Надмолекулярная структура ХГК более дефектна, чем хитина жи-

вотного происхождения, и имеет мезоморфный характер. При этом присутствие глюкана не проявляется в возникновении каких-либо новых структур.

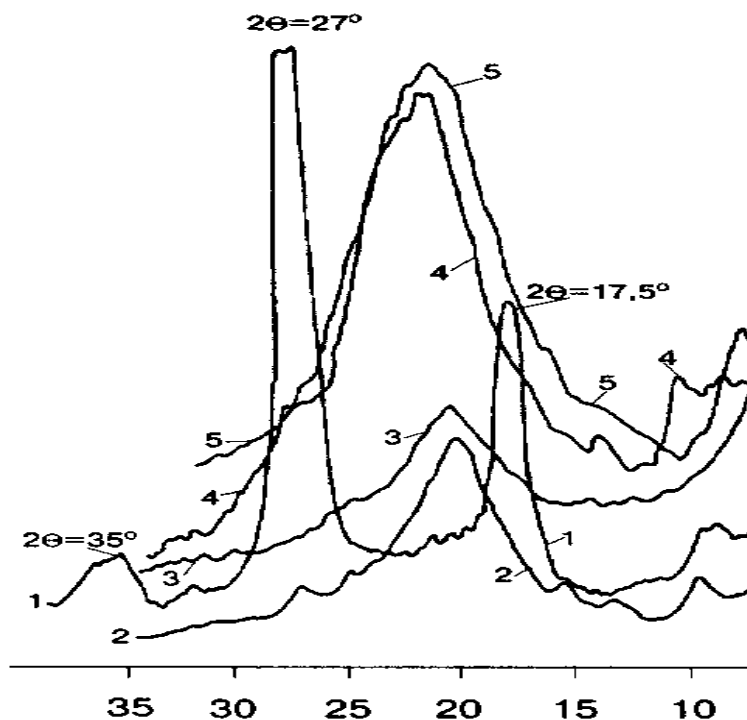


Рис. 8. Рентгенодифрактограммы хитина (1), ХГК: *Aspergillus niger* (2), *Fomes fomentarius* (3), *Saccharomyces cerevisiae* (4), *Aspergillus terricola* (5)

2.7. Физико-химические свойства ХГК

2.7.1. Термические свойства ХГК *Aspergillus niger*

При исследовании термических свойств крабового хитина и хитозана и их термоокислительной деструкции было установлено, что термическое разложение хитина зависит от способа его выделения. При этом на ход кривых термогравиметрического анализа (ТГА) и дифференциального термического анализа (ДТА) влияют гетерогенный характер термического разложения и наличие слабых связей в макромолекулах. Возможно также протекание различных химических реакций (конденсации, полимеризации, сшивания) и физических превращений (гидрофобных взаимодействий, конформационных переходов, разрушения водородных связей).

Кривые динамического ДТА и ТГА крабового хитина и образцов ХГК *Aspergillus niger* (обр.1-3 по табл.1), представленные на рис.9, однотипны. На них можно различить две области от 20⁰С до начала потери массы (T₀) и область термоокислительной деструкции при T > 250⁰С. На кривых ДТА имеется небольшой эндотермический пик при 100-105⁰С, соответствующий удалению адсорбированной воды; потеря массы при этом составляет 4-8%. Десорбция связанной воды происходит в температурном интервале до 150⁰С вследствие затрудненности разрыва водородных связей с полярными группами полисахаридов. После удаления летучих соединений потеря массы начинается в интервале 210-245⁰С. При нагревании выше 300⁰С быстро развивается термоокислительная деструкция, приводящая к потере массы до 40%. На кривых ДТА в этой области наблюдается нарастание экзоэффектов, достигающих максимума для крабового хитина при 350⁰, для образца 1 – при 360⁰С, для двух других образцов (2 и 4) наблюдается два экзотермических пика (при 340 и 360⁰С), характерных для многих образцов целлюлозы. Таким образом, на термограммах проявляется наличие глюкана в ХГК. Нагрев до 400⁰С приводит к дальнейшей потере массы вплоть до образования спексованного остатка, составляющего 33% для хитина и 35-45% для ХГК.

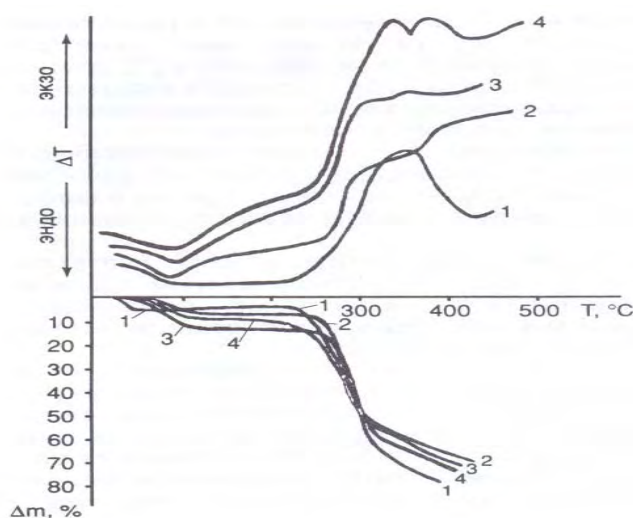


Рис.9. Кривые ДТА (а) и ТГА (б) хитина (1) и ХГК образцы 1, 2 и 3 по табл.1 (кривые 2, 3 и 4 соответственно)

Сравнение кривых ДТА и ТГА крабового хитина и образцов ХГК показывает, что наличие глюкана приводит к более интенсивной десорбции воды на I стадии потери массы, а также к образованию большего количества кокса, что свидетельствует о повышении содержания сшитой части в ХГК вследствие особенности его строения. Известно, что хитин менее стоек к термическому воздействию, чем целлюлоза. Оценка, проведенная по максимальной скорости выделения H_2O , CO и CO_2 во время длительного нагревания при $260^{\circ}C$, показала, что за первые 80 мин нагрева хитин теряет в 2 раза больше H_2O и CO , и в 1,4 раза больше CO_2 , чем целлюлоза. Глюкан, согласно его строению, ещё менее термостоек, чем хитин, но существование его в ХГК в ковалентно связанном с хитином состоянии способствует большей коксуемости.

Расчет кажущейся энергии активации термоокислительной деструкции на начальной стадии по методу Фримена-Кэррола дает значения 115 кДж/моль для крабового хитина и 96 кДж/моль для ХГК (обр.2), что указывает на меньшую термоустойчивость ХГК с высоким содержанием глюкана.

2.7.2. Реология растворов ХГК

Подобно целлюлозе и хитину, ХГК растворяется в комплексном растворителе ДМАА/5% LiCl. Известно, что этот растворитель практически не вызывает деструкции макромолекул полисахаридов, а потому растворы устойчивы во времени и могут быть использованы для формирования плёнок и волокон. Это даёт предпосылки для развития ещё одного направления использования ХГК – получение материалов медицинского назначения, так как оба компонента ХГК хорошо совместимы с организмом и могут быть использованы, например, для шовных хирургических нитей.

Формование волокон и пленок происходит в условиях действия сдвигового поля. В связи с этим необходимо изучение реологии растворов ХГК различной концентрации. Для исследования умеренно

концентрированных растворов был выбран ХГК, выделенный из гриба *Aspergillus niger*, как наиболее крупнотоннажный источник ХГК.

Исследовались 3%-е растворы ХГК в ДМАА/5% LiCl в сопоставлении с эквипроцентрованными растворами хитина и смеси хитин/целлюлоза в соотношении 85/15, равном соотношению хитин/глюкан в ХГК *Aspergillus niger* (обр.1, табл.1).

Кривые течения растворов в логарифмических координатах изображены на рис.10. Они представляют собой обычные неполные кривые течения неньютоновских жидкостей. Однако ход кривых течения растворов ХГК (кривые 1 и 2) отличен от кривых для растворов хитина и смеси хитин/целлюлоза (кривые 3 и 4). Вязкость растворов ХГК медленно снижается в области напряжений сдвига $lgt=2,0\div 3,0$, после чего наблюдается резкое снижение $lg\eta$. В то время как на кривых 3,4 резкое падение $lg\eta$ имеет место в области напряжений сдвига $lgt=1,2\div 2,0$, а затем наблюдается постепенное снижение $lg\eta$. Это означает, что структура раствора ХГК устойчива в области малых напряжений сдвига, но резко изменяется в условиях высоких сдвиговых напряжений. Для растворов хитина и смеси хитин/целлюлоза наблюдается противоположное явление: структура раствора изменяется сразу при приложении тангенциальных напряжений, а затем имеет более устойчивый характер.

Обращает на себя внимание также факт, что вязкость растворов ХГК на два порядка ниже, чем вязкость хитина и смеси хитин/целлюлоза. Эти различия могут быть вызваны как существенным разницей молекулярных масс полисахаридов, так и различной конформацией их в растворе. Методом динамического светорассеяния было найдено, что средняя ММ исследуемого ХГК составляет 50 КД, в то время как ММ образца хитина креветки, взятого для сравнения, в 4 раза больше.

Значения энергии активации вязкого течения, рассчитанные из величин $lg\eta$ при $lgt=2,2$, приведены в табл.4. E_a , найденные для ХГК, ниже E_a хитина, но равны E_a смеси хитин/целлюлоза, что заставляет предположить, что

изменения, вносимые глюконовой составляющей ХГК в структуру раствора аналогичны изменениям, вызванным в структуре раствора хитина при введении 15% целлюлозы.

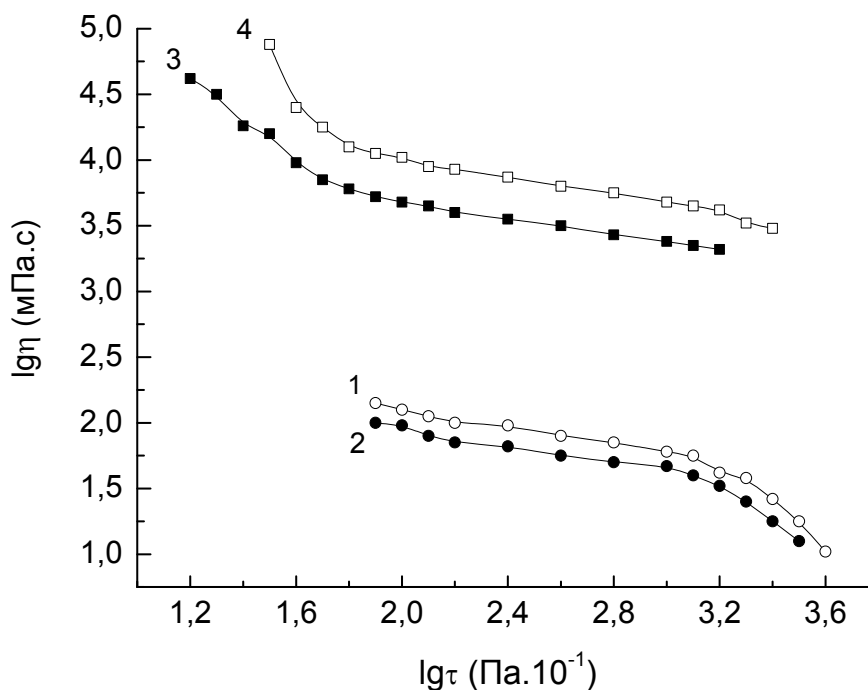


Рис. 10. Кривые течения 3%-х растворов ХГК (1 – 20⁰С, 2 – 35⁰С); хитина (3 - 20⁰С); смеси хитин/целлюлоза 85/15 (4 - 20⁰С)

Таблица 3. Энергии активации вязкого течения 3%-х растворов ХГК, хитина и смеси хитин/целлюлоза.

Состав раствора	E _a , КДж/моль
ХГК <i>Aspergillus niger</i>	38,4
Хитин креветки	46,6
Хитин/целлюлоза	38,4

2.7.3. Характеристика плёнок, сформованных из раствора ХГК

Из раствора ХГК методом мокрого формования были получены плёнки и определены их прочностные характеристики. В таблице 5 приведены полученные данные в сопоставлении с характеристиками плёнок из хитина, целлюлозы и их смеси, сформованных в аналогичных условиях.

Как прочность, так и деформация при разрыве плёнок из ХГК оказались существенно ниже механических характеристик других пленок, что говорит о меньшей упорядоченности структуры плёнки ХГК.

Это подтверждается рентгенодифрактограммами плёнок ХГК и хитина, полученных в одинаковых условиях (рис.11). Хотя обе дифрактограммы отражают сильную аморфизацию структуры плёнок по сравнению со структурой нативного хитина, и положение рефлексов, ответственных за межмолекулярную упаковку $2\theta = 9^{\circ}30'$ и 20° , сохраняется, но профиль рефлексов уширяется при переходе от хитиновой плёнки к плёнке ХГК.

Таблица 4. Деформационно-прочностные характеристики пленок полисахаридов, сформованных из 3%-х растворов в ДМАА/5% LiCl

Состав пленки	σ , МПа	ϵ , %
ХГК <i>Aspergillus niger</i>	3,3	8,9
Хитин/целлюлоза	10,6	10,0
Хитин креветки	9,6	10,8
Целлюлоза	9,1	25,4

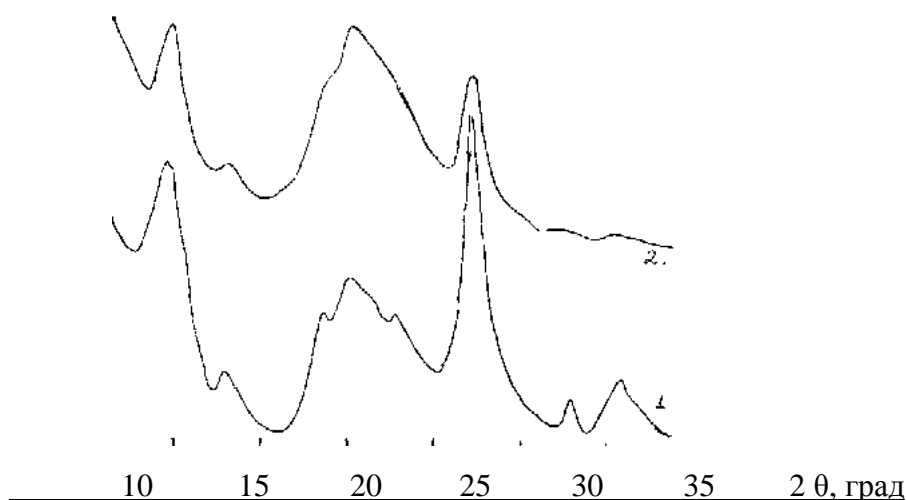


Рис. 11. Рентгенодифрактограммы плёнок, полученных из хитина креветки (1) и из ХГК (2)

3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ХГК

Сведения о молекулярных массах и о поведении макромолекул ХГК в растворе чрезвычайно важны для как для разработки технологических процессов, так и для понимания механизмов биологической активности ХГК. Однако такой информации в литературе крайне недостаточно. Поэтому на изучении молекулярных характеристик ХГК остановимся подробно.

Поскольку физико-химические и другие свойства ХГК и материалов на его основе не в последнюю очередь зависят от его происхождения, для изучения целесообразно выбрать комплексы, полученные из разных источников: например, из грибов *Aspergillus niger* и *Aspergillus terricola* (ХГК-1 и ХГК-4 по табл.1). Растворение ХГК представляет определенную трудность. Для исследования его молекулярных характеристик был использован апротонный диполярный растворитель диметилацетамид, содержащий хлорид лития. Система ДМАА+LiCl, в отличие от кислот и комплексных щелочных растворителей, не разрушает полисахарид, образуя комплекс полимер - соль - растворитель за счет специфических взаимодействий молекул LiCl и ДМАА с гидроксильными группами полимера. При этом разрушаются межмолекулярные водородные связи полимера, что и приводит к его растворению.

Изучали свойства ХГК в ДМАА с содержанием LiCl 9 и 4,5%. Комплексный растворитель ДМАА+9% LiCl готовили из предварительно высушенного и перегнанного ДМАА и обезвоженного хлорида лития. Перед растворением ХГК подвергали предварительной активации путём последовательной инклюзии водой, метанолом и ДМАА. На первом этапе получали растворы ХГК-1 и ХГК-2 концентрации 3 г/дл в ДМАА+9%LiCl. Растворы в ДМАА+4,5%LiCl получали разбавлением исходного раствора чистым ДМАА.

3.1. Методы исследования ХГК в разбавленных растворах

Принимая во внимание сложность структуры изучаемого комплекса, лабильность его конформаций, зависящих от внешних условий (температуры, ионной силы и рН среды), для определения молекулярных масс ХГК следует использовать абсолютные методы, то есть, методы, не требующие молекулярной модели и калибровки. К таким методам можно отнести светорассеяние и седиментационно-диффузионный анализ. Их совокупность, дополненная вискозиметрией, позволяет получить максимум информации о поведении ХГК в разбавленных растворах и сделать заключение о конформационных свойствах ХГК и его надмолекулярной организации в растворах. Как мы увидим в следующем параграфе, растворы ХГК явились чрезвычайно сложными объектами для изучения, и такой комплексный подход позволил интерпретировать на первый взгляд противоречивые данные, полученные разными методами.

Приборы и оборудование, используемые для определения молекулярных масс

Аналитическая ультрацентрифуга MOM 3180. С помощью этого прибора определяли коэффициенты седиментации S растворов ХГК. Седиментационный анализ проводили на при частоте вращения ротора 40000 об./мин в ячейке с искусственным образованием седиментационной границы.

Поляризационный диффузомер Цветкова – Лебедева с высокочувствительной интерферометрической оптической системой регистрации. Коэффициенты поступательной диффузии D рассчитывали по методу площадей и максимальных ординат.

Пикнометр объемом 5 мл использовали для измерения удельного парциального объема полимера v . Гидродинамическую молекулярную массу M_{SD} определяли из седиментационно-диффузионных измерений по формуле Сведберга

$$M_{SD} = \frac{S_0}{D_0} \cdot \frac{RT}{1 - \bar{v} \rho_0}$$

где T - температура, R – универсальная газовая константа, S_0 – константа седиментации, D_0 – константа диффузии, ρ_0 - плотность растворителя и v - удельный парциальный объем.

Фотоэлектрический прибор ФПС-3М использовали для измерений светорассеяния. С помощью прибора светорассеяния измеряли молекулярную массу M_w , второй вириальный коэффициент A_2 , а также по измерениям рассеяния поляризованного света изучали надмолекулярную организацию умеренно концентрированных растворов ХГК.

Регистрация интенсивности рассеянного света производилась в интервале углов 40-140°. Для определения ММ избыточную интенсивность рассеяния света измеряли под углом 90° при длине волны источника света 546 нм. Калибровку осуществляли по бензолу.

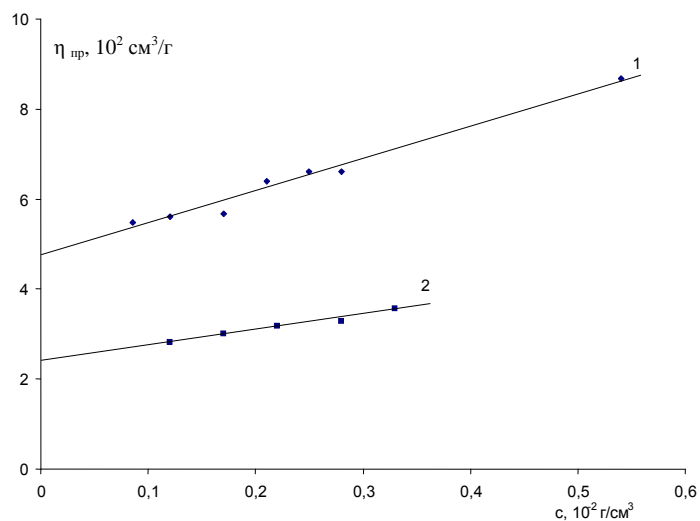
Релеевское отношение для неполяризованного света - $16,4 \cdot 10^{-6} \text{ см}^{-1}$. Предварительно растворы очищали фильтрацией через плотный стеклянный фильтр. Инкремент показателя преломления растворов dn/dc измеряли с помощью рефрактометра ИРФ-23.

Капиллярный вискозиметр использовали для измерения характеристической вязкости. Измерения проводили в при температуре 21,0°C в растворах ДМАА с содержанием хлорида лития 9 и 4,5%. Исследовали разбавленные растворы в диапазоне концентраций полимера 0,03-0,7 г/дл.

3.2. Результаты исследований ХГК в разбавленных растворах

Основные результаты измерений сведены в таблицу 6.

Различие молекулярных свойств образцов ХГК, полученных из разного сырья, проявляется уже в результатах измерения характеристической вязкости.



с, 10⁻² г/см³

Рис.12. Зависимость приведенной вязкости от концентрации растворов ХГК-1 в ДМАА+9%LiCl (1) и ДМАА+4,5%LiCl (2)

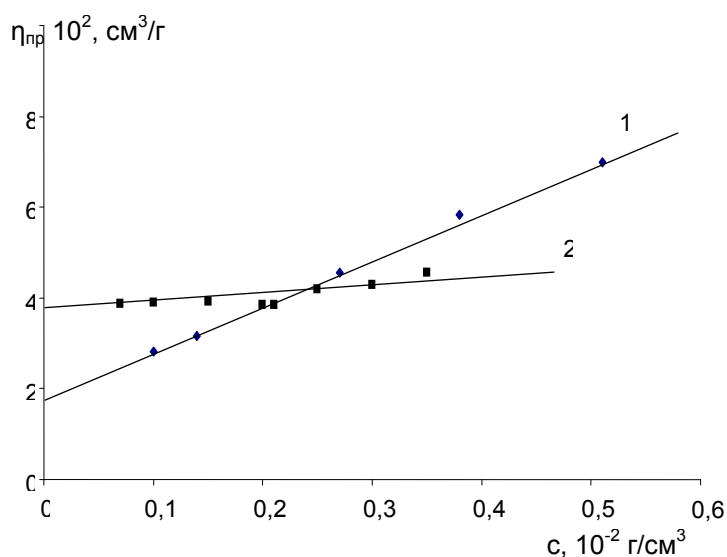


Рис. 13. Зависимость приведенной вязкости от концентрации растворов и ХГК-4 в ДМАА+9%LiCl (1) и ДМАА+4,5%LiCl (2)

Зависимости приведенной вязкости от концентрации для образцов ХГК, представленные на рис. 12 и 13, линейны в исследуемом диапазоне концентраций полимера. Значение характеристической вязкости ХГК-1 снижается в 2 раза при уменьшении концентрации соли с 9 до 4.5 % (табл.6). Аналогичное явление наблюдалось для целлюлозы и ее производных, а также для хитина. Это было объяснено меньшей величиной сольватного слоя молекул растворителя и соли вокруг молекулы полимера.

Значения константы Хаггинса K' растворов ХГК-1 соответствуют величинам K' для полимеров в хороших растворителях.

Раствор ХГК-4 в ДМАА+9%LiCl характеризуется меньшим значением $[\eta]$, чем соответствующее значение для ХГК-1, что отражает меньшую по сравнению с ХГК-1 величину эффективного гидродинамического объема. При этом величина K' растворов ХГК-4 имеет аномально высокое значение 3,2 уже при большем содержании соли LiCl 9%. Это, вероятно, свидетельствует о слабых взаимодействиях полимер - растворитель для образца ХГК-4. С уменьшением содержания соли до 4,5% $[\eta]$ растворов ХГК-4, в отличие от ХГК-1, резко повышается, по-видимому, из-за структурирования растворов. Структурирование растворов может происходить за счет образования межмолекулярных Н-связей вследствие недостаточности сольватного слоя, окружающего макромолекулу.

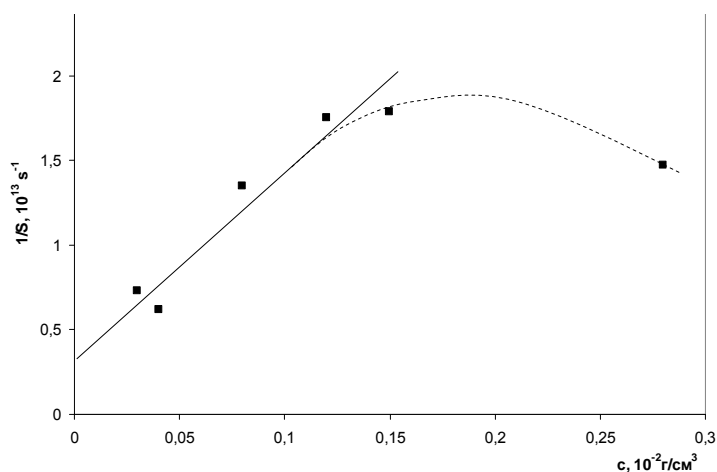


Рис. 14. Зависимость обратного коэффициента седиментации растворов ХГК-1 в ДМАА+4,5%LiCl

Исследование растворов ХГК методом скоростной седиментации подтвердило различие гидродинамических свойств двух изучаемых образцов. Зависимость обратного коэффициента седиментации от концентрации для растворов ХГК-1 (рис.14) в области концентраций $c < 0,15 \cdot 10^{-2}$ г/см³ прямолинейна. По пересечению этой зависимости с осью ординат была определена константа седиментации S_0 – коэффициент седиментации при бесконечном разбавлении раствора. Однако с повышением концентрации наблюдается уменьшение значения $1/S$. Такой экстремальный ход

зависимости $1/S$ характерен для систем, самоассоциирующих с повышением концентрации. Отклонение от линейности обусловлено тем, что при концентрациях раствора выше $0,15 \cdot 10^{-0.2}$ г/см³ в нем присутствуют, наряду с индивидуальными макромолекулами, ассоциативные надмолекулярные образования. Следует отметить, что самоассоциация происходит в пределах концентраций, соответствующих критерию Дебая $c < 1/[\eta]$ ($c < 0,4$ г/дл), и лишь при уменьшении концентрации ниже $0,15 \cdot 10^{-2}$ г/см³ раствор ХГК-1 становится молекулярно дисперсным, и выполняется линейная зависимость $1/S(c)$. Для раствора ХГК-4 в ДМАА+4,5% LiCl наблюдается мультимодальная седиментационная картина. При этом можно выделить три основных пика; их константы седиментации равны 1; 2,6; $6,7 \cdot 10^{-13}$ с, соответственно. Применяя известное соотношение $S_0 \sim M^{0.5}$, справедливое для θ -растворителя, получаем соотношение между молекулярными массами $M_1:M_2:M_3=1:6:45$, то есть массы компонент раствора ХГК-4 могут отличаться более чем на порядок. Можно полагать, что высокомолекулярные пики соответствуют надмолекулярным структурам различного размера, устойчивым к воздействиям гидродинамических полей. Наличие надмолекулярных структур, как мы уже видели, отражается и в результатах вискозиметрических измерений ХГК-4 при концентрации LiCl 4,5%. Таким образом, седиментационный анализ подтверждает предположение о микрогетерогенности растворов ХГК-4 при содержании соли 4,5%, сделанный на основе вискозиметрии.

Эта микрогетерогенность явилась препятствием для измерения коэффициента диффузии макромолекул ХГК-4, и диффузионные опыты проводились только для растворов ХГК-1 в ДМАА+4,5%LiCl. Полученные значения $D=1,21 \cdot 10^{-6}$ см²/с при $c=0,086 \cdot 10^{-2}$ г/см³ и $D=1,0 \cdot 10^{-6}$ см²/с при $c=0,04 \cdot 10^{-2}$ г/см³ были экстраполированы к 0 концентрации, чтобы получить константу диффузии D_0 . Молекулярная масса M_{SD} , рассчитанная для образца ХГК-1, составила 27000 (табл.5).

Таблица 5. Молекулярные, гидродинамические и оптические характеристики растворов ХГК-1 и ХГК-4 в ДМАА с содержанием LiCl 9 и 4,5%

Образец	[LiCl]	$[\eta] \cdot 10^{-2}$, см ³ /г	K'	$S_0 \cdot 10^{13}$, s	$D \cdot 10^6$, см ² /с	dn/dc, см ³ /г	$A_2 \cdot 10^4$, см ³ /г ²	M _{sd}	$M_w \cdot 10^3$
ХГК-1	9%	4,8	0,3	-	-	0,215	23	-	64
ХГК-4		1,8	3,15	-	-	0,195	-	-	40
ХГК-1	4,5%	2,4	0,5	2,7	0,8	0,145	4	23000	270
ХГК-4		3,8	0,16	1,1; 2,6; 6,7	-	-	-	-	-

Молекулярная масса ХГК-1 в растворах ДМАА с содержанием LiCl 9 и 4,5% была определена методом светорассеяния из графиков зависимости величины Hc/R_{90° от концентрации (рис.15), где R_{90° - обратная избыточная интенсивность рассеяния, H - оптическая постоянная. Значения ММ, полученные из экстраполяции величин Hc/R_{90° к нулевой концентрации, а также величины вторых вириальных коэффициентов A_2 , полученных из наклонов рассматриваемых зависимостей, и инкрементов показателей преломления исследуемых растворов, приведены в таблице 6. Молекулярные массы ХГК-1, полученные в ДМАА с содержанием соли 9 и 4,5%, различаются в 4 раза. Вероятно, это различие обусловлено ухудшением растворимости полимера при снижении концентрации LiCl. При этом наблюдается рост интенсивности рассеяния света за счет вклада ассоциативных образований, размеры которых сопоставимы с длиной волны падающего света. С этим фактом согласуется уменьшение значения параметра $A_2=3,8 \cdot 10^{-4}$ см³/г² для растворов в ДМАА+4,5% LiCl по сравнению с $A_2=25 \cdot 10^{-4}$ см³/г² в ДМАА+9%LiCl. Снижение величины второго вириального коэффициента A_2 указывает на ухудшение взаимодействия между полимером и растворителем в растворе с более низким содержанием соли.

Для ХГК-4 в ДМАА+9%LiCl из зависимости $Hc/R_{90^\circ}(c)$, приведенной на рис.16, было получено значение $M_w=40000$. Меньшая по сравнению с ММ ХГК-1 величина ММ ХГК-4 согласуется с меньшим значением характеристической вязкости этого образца.

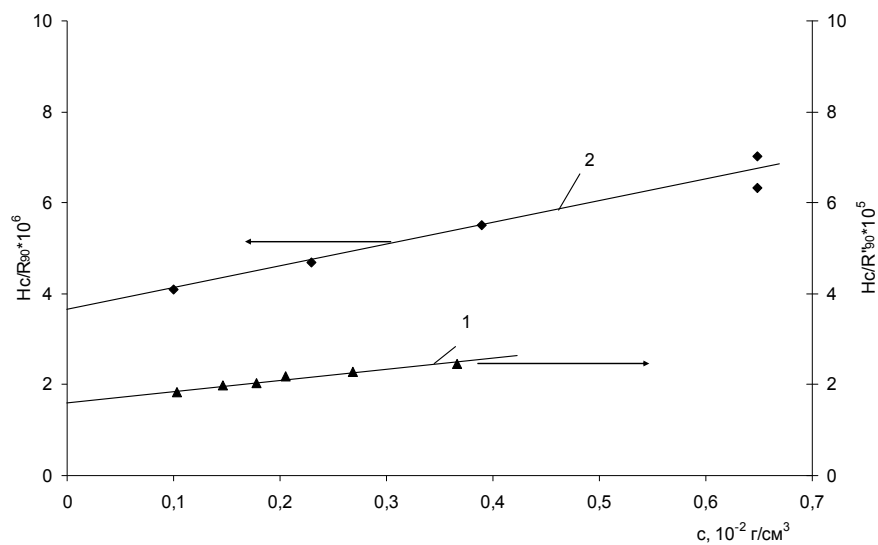


Рис. 15. Зависимости величины H_c/R_{90° от концентрации c для растворов ХГК-1 в ДМАА+9% (1) и ДМАА+4,5%LiCl (2)

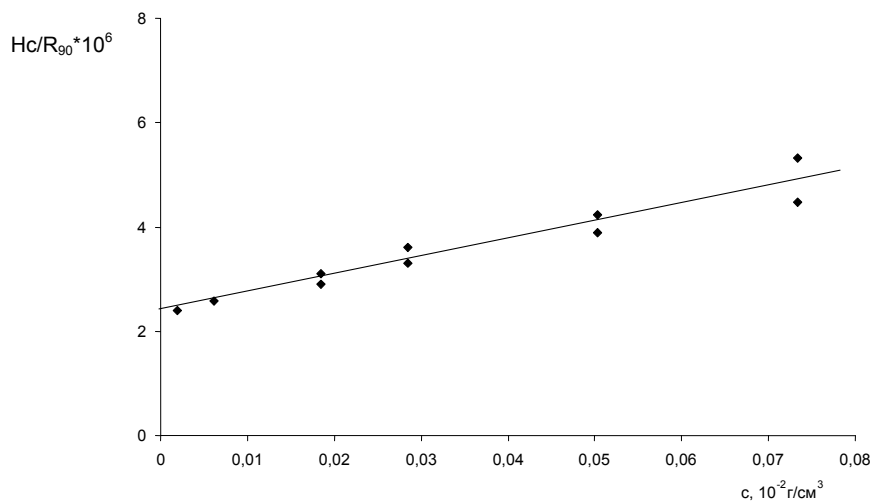


Рис. 16. Зависимости величины H_c/R_{90° от концентрации C для растворов ХГК-4 в ДМАА+9%

Методом рассеяния поляризованного света (РПС) были изучены структурные особенности умеренно концентрированных растворов ХГК в ДМАА/LiCl, включая микроупорядоченность и микрогетерогенность, а также статистические размеры упорядоченности областей и размеры

микронеоднородностей. Для этого угловые зависимости интенсивности вертикальной и горизонтальной составляющих рассеянного света были проанализированы с применением статистической теории Дебая – Штейна. Структурная организация растворов ХГК изучалась на примере ХГК-1, растворенного в ДМАА+9%LiCl, обеспечивающим хорошее термодинамическое сродство полимера и растворителя.

Предварительно исследовали ДМАА с различным содержанием LiCl. Оказалось, что сам растворитель неоднороден по структуре и характеризуется наличием микропорядоченных областей флуктуационной природы. При увеличении концентрации LiCl до 9% интенсивность анизотропного рассеяния возрастает в два раза. Флуктуирующие домены ДМАА-LiCl имеют максимальные размеры около 60-70 нм при концентрации соли 4,5%.

Исследования рассеяния поляризованного света подтвердили флуктуационно неоднородную структурную организацию растворов ХГК в ДМАА, которая в известной степени подготовлена структурированным растворителем. Было обнаружено, что в растворе ХГК присутствуют как изотропные, так и анизотропные флуктуационные надмолекулярные образования. Причиной флуктуационной неоднородности растворов ХГК в ДМАА с содержанием LiCl являются процессы ассоциации в результате межмолекулярных взаимодействий. При уменьшении концентрации соли до 4,5% и, как следствие, ослаблении сольватации, флуктуационные ассоциаты, зафиксированные методом РПС, при малых концентрациях разрушаются в слабых гидродинамических полях, что показано методом скоростной седиментации. В случае ХГК-4 процессы самоассоциации и упорядочения происходят сильнее, образуя стабильные структуры, не разрушающиеся в гидродинамических полях.

Таким образом, растворимость ХГК зависит от его происхождения. Если растворы ХГК-1 в ДМАА+4,5% LiCl еще практически гомогенны, то взаимодействия между молекулами в ХГК-4 настолько сильны, что раствор

ХГК-4 в большей степени состоит из ассоциированных надмолекулярных структур. Структурные элементы различны по массе и характеру межмолекулярного взаимодействия и, как следствие, самоорганизуются в сложную систему. Поэтому крайне затруднено определение ММ этого образца гидродинамическими методами. Образец ХГК-1 удалось охарактеризовать достаточно полно.

Величины ММ, полученные гидродинамическим ($M_{SD}=23000$) и статическим ($M_w=64000$) методами, довольно сильно отличаются. Однако, как было установлено, в разбавленных растворах ХГК-1 содержится некоторое количество ассоциативных надмолекулярных образований флуктуационной природы, статистические размеры которых определяются из асимметрии светорассеяния, порядка 60-70 нм, и присутствие даже небольшого их количества должно заметно сместить интегральное значение M_w в сторону больших масс. Поэтому полученное соотношение между M_{sd} и M_w можно считать удовлетворительным.

Большая величина $[\eta]$ при малых значениях ММ, несомненно, свидетельствуют о том, что ХГК - полимер с достаточно высокой жесткостью молекул, как и целлюлоза и хитин. Действительно, система проявляет свойства высокой упорядоченности, что характерно для жесткоцепных полимеров. О высокой упорядоченности свидетельствуют высокая интенсивность анизотропного рассеяния растворов и ее асимметрия. Статистические размеры упорядоченных областей составляют 50 нм, а оптически наиболее плотных областей - 60 нм. Это дает возможность предполагать существование внутриассоциативных образований системы ХГК-1 – ДМАА+9%LiCl упорядоченности за счет укладки жестких участков макромолекул.

Таким образом, согласно данным светорассеяния, седиментационно-диффузионного анализа и вискозиметрии, ХГК различного происхождения *Aspergillus niger* и *Aspergillus terricola*, несмотря на близкий химический состав, отличаются по молекулярным свойствам. Образец ХГК-1, содержащий меньшее количество глюкана, имеет большую ММ и лучшую растворимость в ДМАА+LiCl по сравнению с образцом ХГК-4.

3.3. Исследование конформации макромолекул ХГК *Aspergillus niger* методом малоуглового рассеяния нейтронов

Исследование конформации макромолекул ХГК-1 в твёрдой фазе (плёнках) было проведено методом малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН). Метод основан на дейтериевом контрастировании образцов, обусловленном большой разницей амплитуд когерентного ядерного рассеяния для протонов и дейтронов. Дейтериевая метка была введена в макромолекулы ХГК *Aspergillus niger* в процессе выращивания гриба в питательной среде на D₂O. Дейтерированный ХГК был введен в раствор обычного ХГК в количестве 3%. Из раствора методом мокрого формования была получена пленка. Согласно данным по широкоуголовому рассеянию рентгеновских лучей, пленка имела аморфизованную структуру.

В результате обработки данных МУРН была получена функция распределения по размерам $N(R)$ частиц ХГК (рис.17). Кривая носит негауссовский характер. Распределение $N(R)$ затянута в область больших размеров. Массовая доля крупных частиц сопоставима с долей мелких частиц, но число последних составляет 96,4% от общего числа частиц. Данные динамического светорассеяния по определению молекулярных масс (точки на кривой распределения) также показали наличие небольшого числа макромолекул с высокой ММ. Эта небольшая фракция макромолекул, по-видимому, соответствует нативным макромолекулам, большая часть которых деградирует во время выделения ХГК. Абсолютное значение средней ММ по данным светорассеяния составляет 50000 Д.

Полученные данные позволяют сделать заключение, что конформация макромолекул ХГК в пленке более компактна по сравнению с конформацией гауссового клубка. Кажущееся противоречие данных, полученных с помощью МУРН, с данными РПС легко объясняются условиями формования плёнки, в процессе которого происходит не только разрушение сольватной

оболочки макромолекул ХГК, но и полное удаление соли из плёнки.

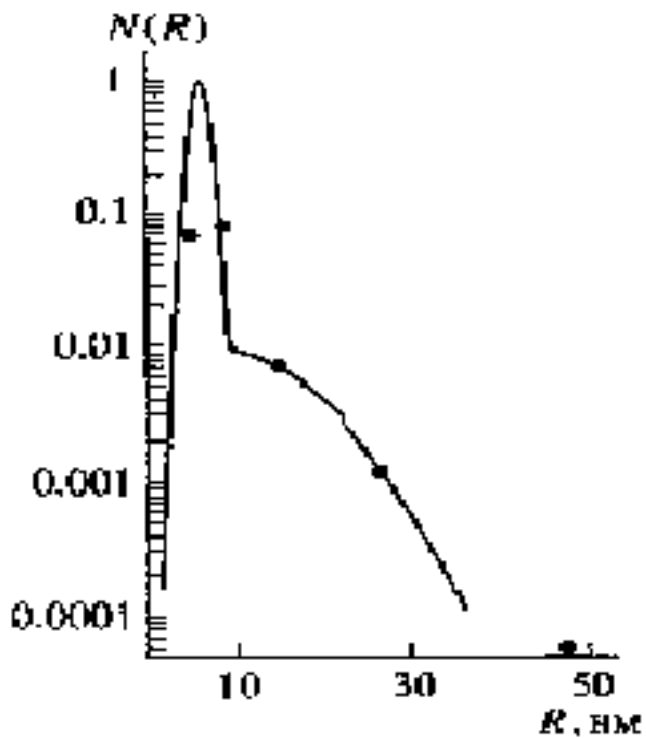


Рис. 17. Функция распределения $N(R)$ рассеивающих частиц по размерам, полученная по данным МУРН. Точки на кривой – по данным динамического светорассеяния

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Большой интерес науки и промышленности к поиску и использованию полимеров природного происхождения, таких как хитин и хитозан является вполне закономерным. Эти полимеры обладают рядом интереснейших свойств, высокой биологической активностью и совместимостью с тканями человека, животных и растений, не загрязняют окружающую среду, поскольку полностью разрушаются ферментами микроорганизмов, могут широко применяться в проведении природоохранных мероприятий.

Хитин, как и целлюлоза, могут быть получены из возобновляемых природных ресурсов. Запасы хитина огромны, среди природных полимеров он занимает второе место после целлюлозы по биомассе. Особенно перспективным является использование грибного хитина, выделяемого из мицелия низших грибов. Исследования последних лет выявляют все новые его полезные свойства и соответственно, новые области применения. По физико-химическим и молекулярным свойствам грибной хитин, существующий в природе в виде хитин-глюкановых комплексов, может отличаться в зависимости от источника его получения. Исследование ХГК различного происхождения имеет важное значение для понимания механизмов его биологической активности и развития технологичных методов его переработки.

Лабораторная работа №1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОГО ГИСТЕРЕЗИСА ИЗОТЕРМ СОРБЦИИ И ДЕСОРБЦИИ ПАРОВ ВОДЫ ХИТИНОМ (ХИТОЗАНОМ)

Изучение сорбционных свойств дает возможность характеризовать капиллярно-пористую структуру хитина (хитозана) и позволяет выяснить влияние сорбата (в частности, воды) на химические свойства и их изменения в процессе их переработки. Современное развитие представлений о донорно-акцепторных взаимодействиях молекул, о водородных связях дает возможность с достаточной убежденностью утверждать, что наиболее существенную роль в процессах адсорбции (десорбции) воды играет водородная связь. При адсорбции воды происходит уменьшение свободной поверхностной энергии и, конечно, система не стремится нарушить это состояние.

В данной лабораторной работе объектом исследования служат образцы хитина (хитозана).

Задание: получить изотермы сорбции-десорбции паров воды хитином (хитозаном).

Приборы:

1. Установка для снятия изотерм сорбции-десорбции паров воды;
2. Аналитические весы;
3. Сушильный шкаф.

Реактивы:

1. Образцы хитина или хитозана;
2. Насыщенные растворы солей.

Ход работы

Навески хитина (хитозана), высушенные до постоянной массы загружают в сетчатые карманы, ставят в герметически закрытые эксикаторы с насыщенными растворами солей. В установке предусмотрена постоянная обдувка образцов воздухом. В течение всего опыта проводят систематическое взвешивание образцов. После установления равновесной сорбции полимер извлекают из эксикатора, взвешивают и сушат до абсолютно сухого состояния.

Сорбцию паров воды вычисляют по формуле:

$$A = (m_{\text{вл}} - m_{\text{абс. сух.}})m_{\text{абс. сух.}},$$

где A – сорбция паров воды;

$m_{\text{вл}}$ - масса навески при данной относительной влажности;

$m_{\text{абс. сух.}}$ - масса навески абсолютно сухой целлюлозы.

Полученные результаты при разных относительных давлениях паров воды заносят в таблицу и строят изотермы сорбции.

Таким же образом снимают изотермы десорбции.

По изотермам сорбции – десорбции находят относительный гистерезис.

$$\varphi = (A_2 - A_1) / 100/A_3,$$

где A_1 - величина адсорбции паров воды при определенном P/P_0 ;

A_2 - величина десорбции паров воды при том же P/P_0

A_3 - величина сорбции паров воды при $P/P_0 = 0,65$.

Лабораторная работа №2

ВИСКОЗИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЯЗКОСТИ ХИТОЗАНА

Задание:

Определить относительную вязкость хитозана при 25°C. В качестве растворителя взять лимонную кислоту.

Аппаратура и посуда:

1. Вискозиметр Убеллоде (ВПЖ-3);
2. Водяной термостат, обеспечивающий точность термостатирования $\pm 0,02^\circ\text{C}$;
3. Аналитические весы;
4. Стаканы стеклянные емкостью 100 мл;
5. Цилиндры мерные.

Реактивы:

1. Хитозан марки «ХЧ»;
2. Лимонная кислота;
3. Дистиллированная вода.

Ход работы

Приготовить весовым методом растворы хитозана заданных концентраций. Определить время истечения чистого растворителя. Предварительно вискозиметр промывают хромовой смесью,

дистиллированной водой, сушат в сушильном шкафу, охлаждают до температуры опыта. В вискозиметр наливают 20 мл чистого растворителя/раствора, помещают в термостат, измеряют время истечения чистого растворителя/раствора через капилляр вискозиметра. Опыт повторяют 3-5 раз, среднее значение используют для расчетов относительной вязкости ($\eta_{\text{отн}}$) по формуле

$$\eta_{\text{отн.}} = t / t_0 \quad ,$$

где t – время истечения раствора, с;

t_0 - время истечения растворителя, с.

Удельная вязкость ($\eta_{\text{уд.}}$) рассчитывается по формуле

$$\eta_{\text{уд}} = \eta_{\text{отн}} - 1.$$

Приведенная вязкость ($\eta_{\text{прив.}}$) рассчитывается по формуле

$$\eta_{\text{прив}} = \eta_{\text{уд}} / c \quad ,$$

где c – концентрация раствора.

По результатам эксперимента строят график зависимости $\eta_{\text{уд}} / c = f(c)$, по графику определяют характеристическую вязкость $[\eta] = \lim (\eta_{\text{уд}} / c)$ экстраполяцией на нулевое разбавление.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Hachett C. Experiments and Observation on Shell and Bone // *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, 1799.-P. 315-334.

Феофилова Е.П. Хитин грибов: распространение, биосинтез, физико - химические свойства и перспективы использования.

В кн.: Хитин и хитозан.- М.: Наука 2002.- 365 с.

Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С.,и др. Новая отрасль биотехнологии. Ранозаживляющие препараты на основе полиаминосахаридов // *Микробиология*. 1999. Т.68. N 6.- С 834-837.

Нудьга Л.А., Петрова В.А., Ганичева С.И.и др. Физико-химические характеристики хитин-глюкановых комплексов различного происхождения // *Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана: материалы V конференции, Москва-Щелково / Изд. ВНИРО.- М., 1999.- С.242-245.*

Сазанов Ю.Н., Федорова Г.Н., Плиско Е.А., Нудьга Л.А. Изучение термостабильности хитина, хитозана и некоторых его производных методом ДТА и ТГ // *Журн. прикл. химии*, 1980. Т.53. № 9. –С.2143-2146.

Целлюлоза и ее производные / под ред. Н. Байклза и Л. Сегала.- М. Мир,1974.-Т.2.-540 с.

Цветков В.Н., Эскин В.Е., Френкель С.Я. Структура макромолекул в растворах. –М.:Наука,1964.

Евмененко Г.А., Алексеев В.Л., Нудьга Л.А., Петрова В.А. Конформация цепей хитин-глюканового комплекса по данным малоуглового нейтронного рассеяния // *ВМС. Сер.Б.1998.Т.40. №8.*
-С. 1398-1402.

Нудьга Л.А., Петрова В.А., Ганичева С.И., Баклагина Ю.Г., Карбоксиметилирование хитин-глюкановых комплексов грибного происхождения и сорбционные свойства продуктов // *Журн. прикл. химии*, 2000.Т. 73. № 2.-С.297-301.

Молекулярные характеристики и особенности надмолекулярной организации растворов хитин-глюкановых комплексов/ Е.Б. Тарабукина., Н.А Калинина., А.В Адамов., В.А Петрова., Л.А Нудьга., С.И. Кленин // ВМС.сер. А.2005. Т.47. №5.-С.778-786.

Осовская И.И., Полторацкий Г.М. Гидрофильные свойства целлюлозы, обработанной насыщенным паром // Журн. прикл. химии 2005. Т. 78. Вып. 7.- С.1203-1205.

Содержание

Введение.....	3
1. Хитин.....	4
1.1. Пленки и волокна на основе хитина и хитозана.....	11
1.2. Надмолекулярная структура хитина.....	12
2. Хитин-глюкановый комплекс – альтернативный источник хитина.....	12
2.1. Хитин-глюкановый комплекс как компонент клеточных стенок грибов.....	14
2.2. Биоактивные свойства ХГК.....	15
2.3. Состав хитин-глюканового комплекса.....	17
2.4. Гидролиз хитин-глюканового комплекса гриба <i>Aspergillus niger</i> фосфорной кислотой.....	19
2.5. Химическая структура ХГК <i>Aspergillus niger</i>	24
2.6. Надмолекулярная организация ХГК.....	25
2.7. Физико-химические свойства ХГК.....	26
3. Молекулярные и гидродинамические характеристики ХГК.....	32
3.1. Методы исследования ХГК в разбавленных растворах.....	33
3.2. Результаты исследований ХГК в разбавленных растворах.....	34
3.3. Исследование конформации макромолекул ХГК <i>Aspergillus niger</i> методом малоуглового рассеяния нейтронов.....	42
Заключение.....	44
Лабораторная работа №1.....	45
Лабораторная работа №2.....	47
Библиографический список.....	49

Учебное издание

Ираида Ивановна Осовская
Дарья Леонидовна Будилина
Елена Борисовна Тарабукина
Людмила Александровна Нудьга

Хитин-глюкановые комплексы

**(Физико – химические свойства и молекулярные
характеристики)**

Учебное пособие

Редактор и техн. редактор Л.Я. Титова

Темплан 2010, поз.8

Подп. к печати 15.01.10. Формат 60×84/16. Бумага тип № 1. Печать офсетная. 3,25 уч.-изд. л.;
3,25 печ. л. Тираж 25 экз. Изд. № 8. Цена «С». Заказ

Ризограф ГОУВПО Санкт-Петербургского государственного технологического университета
растительных полимеров, 198095, ул. Ивана Черных, 4.

**И.И. Осовская, Д.Л. Будилина
Е.Б. Тарабукина, Л.А. Нудьга**

**ХИТИН-ГЛЮКАНОВЫЕ
КОМПЛЕКСЫ
(ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ)**

Учебное пособие

**Санкт-Петербург
2010**

