

ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЕВОЙ БАЗЫ АЛТАЙСКОГО КРАЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ХИТОЗАНА

Е.С. Баташов, А.Л. Верещагин

Были исследованы физико-химические показатели качества хитозана, выделенного из хитинового сырья Алтайского края: *Gammarus (Rivulogammarus) lacustris* Sars, *Artemia* sp., *Apis mellifera*, и *Pleoroutus ostreutus* и сравнены с аналогичными показателями качества крабового хитозана производства «Восток – бор».

ВВЕДЕНИЕ

Метод индуцирования устойчивости является одним из наиболее перспективных способов защиты растений, который основывается на усилении собственных защитных механизмов растений при помощи природных биологически активных веществ – элиситоров [1]. Среди таких биологически активных веществ большое внимание уделяется хитину и его производному – хитозану. Результаты использования хитина и хитозана свидетельствуют о значительном положительном эффекте применения этих биополимеров с целью иммунизации растений к грибковым и бактериальным инфекциям [2]. Существующие препараты на основе хитозана, полученные из панцирей морских ракообразных, имеют достаточно высокую стоимость, и поэтому необходим поиск новых альтернативных источников хитозана.

ЦЕЛЬ

Целью данной работы стало изучение сырьевой базы хитинового сырья Алтайского края, получение из выбранного сырья хитозана и сравнение его физико-химических свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве сырья были изучены:

- рачок - бокоплав *Gammarus (Rivulogammarus) lacustris* Sars, и цисты рачка *Artemia* sp. обитающих в соленых озерах Алтайского края и добывающихся в промышленных масштабах на соленых озерах Славгородского района предприятием СП «Ар-сал». Запасы цист только в озере Большом Яровом составляют 1000 тонн [3];

- подмор пчел *Apis mellifera*, который может составлять 10 – 20 тонн в год в Алтайском крае [4];

- гриб вешенка *Pleoroutus ostreutus*, производство которого составляет 50 – 100 тонн в год.

Все хитиновое сырье обрабатывалось по стандартной методике [5]. Для сравнения был взят крабовый хитозан производства «Восток – бор».

Характеристическую вязкость полученных образцов хитозана определялась в смешанном растворителе 0,2 М CH_3COONa + 0,3 М CH_3COOH при температуре 25°C в вискозиметре Уббелоде; при исходной массовой доле образца хитозана 0,5 г/дл. Молекулярная масса рассчитывалась по формуле: $[\eta] = 1,38 \cdot 10^{-4} M^{0,85}$ [6]. Степень дезацетилирования образцов определялась методом потенциометрического титрования на универсальном иономере ЭВ-74 с использованием комбинированного электрода [7]. Степень дезацетилирования определялась по данным ИК-спектров [8] на приборе FTIR - 8300 фирмы Shimadzu. Морфология образцов исследовалась по данным сканирующей электронной микроскопии (электронный микроскоп JSM-840M фирмы Jeol). Термостабильность образцов определялась методом дифференциальной сканирующей калориметрии (термоанализатор Shimadzu-DSC 60). Экспериментальные данные статистически обрабатывались с помощью дисперсионного анализа с использованием программы STATISTICA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе был проведен анализ литературных данных касающийся возможных сырьевых источников хитина и хитозана [8-11]. Результаты представлены в таблице 1

Вторым этапом стало получение из выбранного сырья хитозана, по выше приведенной методике. Характеристики полученных образцов хитозана из различного сырья представлены в таблице 2.

Таблица 1

Химический состав хитинсодержащего сырья

Вид хитинсодержащего сырья	Содержание влаги, %	Содержание, % на сухое вещество				
		Липиды	Белки	Минеральные вещества	Хитин	Меланины
Краб <i>Paralithodes camtschaticus</i>	12-14	1-2	25-30	34,5	30-31,5	--
<i>Gammarus lacustris</i> сушеный	10-11	7,7-13	55-56	23-26	7,0	--
Подмор пчел <i>Apis mellifera</i> сухой	8-10	--	50-80	2,17-3,33	10,9-13,3	21,7-33,3
Цисты <i>Artemia sp</i> сухие	8-10	6,5-19,2	56,5-58,0	6,1-12,6	2,5-10,5	--
гриб вешенка <i>Pleoroutus ostreutus</i> сухой	7-9	5,6-7,0	13-23,6	4,8-6,3	2-5	--

Таблица 2

Качественные характеристики хитозана полученного из различного сырья

Образец хитозана из различного сырья	Содержание влаги, %	Содержание золы, %	Выход хитозана, %	Морфология образцов
Краб <i>Paralithodes camtschaticus</i>	7,5±2,1	0,3±0,1	--	Желтые чешуйки
<i>Gammarus lacustris</i>	4,9±0,6	3,8±0,2	8,1±1,2	Серый порошок
Подмор пчел <i>Apis mellifera</i>	4,5±0,1	1,9±0,1	5,0±0,3	Темно-коричневые пластинки
Цисты <i>Artemia sp.</i>	5,7±0,8	1,8±0,4	2,6±0,7	Порошок темно-зеленого цвета
Грибы <i>Pleoroutus ostreutus</i>	10,6±1,6	0,6±1,4	2,7±0,7	Коричневый порошок

Таблица 3

Результаты термического анализа хитозана полученного из различного сырья

Исходное сырье	t ₁ , °C	ΔH ₁ , Дж/г	t ₂ , °C	ΔH ₂ , Дж/г
Краб <i>Paralithodes camtschaticus</i>	75,2	120,5	304,5	-225,4
МКХ Краб <i>Paralithodes camtschaticus</i>	148,5	126,9	291,6	-133,0
<i>Gammarus lacustris</i>	70,6	73,0	323,1	-26,4
МКХ <i>Gammarus lacustris</i>	100,6	322,6	302,7	-184,1
Цисты <i>Artemia sp.</i>	83,7	108,5	298,0	-69,8
МКХ цист <i>Artemia sp.</i>	88,2	93,8	285,1	-102,8
Подмор пчел <i>Apis mellifera</i>	118,6	18,9	--	--
МКХ из подмора пчел <i>Apis mellifera</i>	128,1	54,2	--	--
Гриб <i>Pleoroutus ostreutus</i>	86,4	138,9	313,1	-133,9

Из полученных образцов переосаждением был получен микрокристаллический хитозан по методике [13]. Выход микрокристаллического хитозана (МКХ) составил для *Gammarus lacustris* – 42,4 %, для цист *Artemia sp* 17,0 %, для подмора пчел *Apis mellifera* 15,3 %, для краба *Paralithodes camtschaticus* 54,1 % (для гриба вешенка *Pleoroutus ostreutus* выход микрокристаллического хитозана был ме-

нее 1% – при подщелачивании наблюдалось только помутнение раствора).

На следующем этапе был проведен термический анализ образцов хитозанов и микрокристаллических хитозанов полученных из различного сырья. Термический анализ образцов представлен в таблице 3.

Пример ДСК анализа хитозана представлен на рис. 1

ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЕВОЙ БАЗЫ АЛТАЙСКОГО КРАЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ХИТОЗАНА

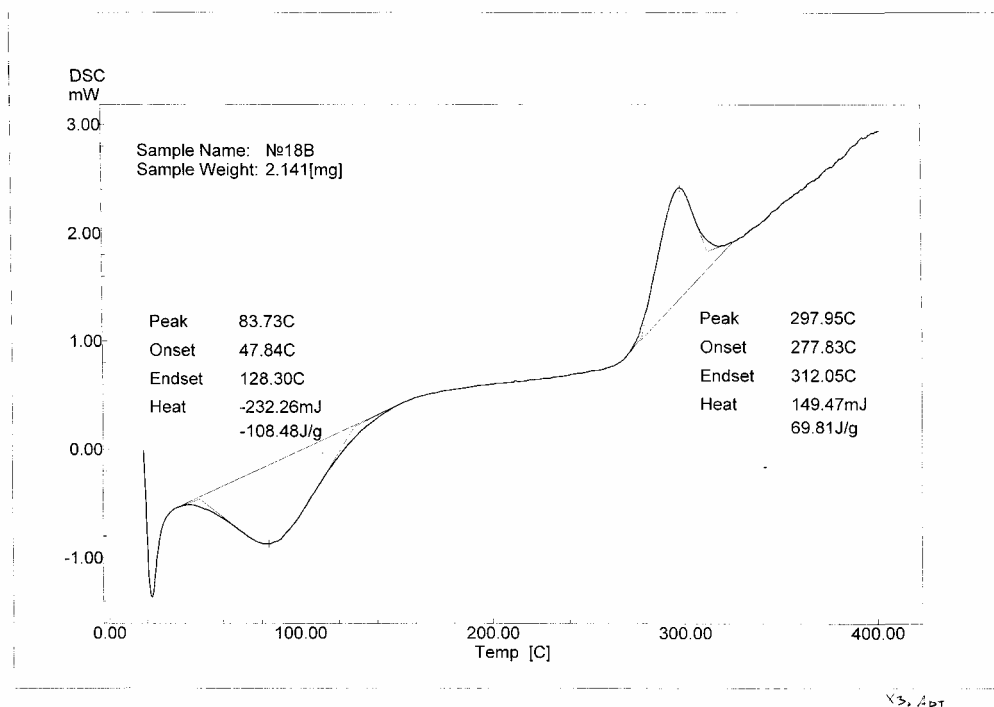


Рис. 1. ДСК диаграммы образца хитозана полученного из цисты *Artemia sp.*

Как видно из таблицы 3, для всех образцов хитозана характерно присутствие двух пиков: эндотермического (70,6-148,5°C) соответствующего потере адсорбционной воды, и экзотермического (285,1-313,1°C), который можно отнести к расстеклованию хитозана. Исключением является хитозан и МКХ из подмора пчел, у которого присутствует только эндотермический пик, что связано со структурой и составом молекулы полимера.

Далее были определены физико-химических свойств исследуемых образцов природных полимеров представлены в таблице 4.

Анализируя полученные данные можно предположить, что различия в определении

степени дезацетилирования, полученных потенциометрически и ИК-спектрофотометрически возможно связаны с различиями в структуре полимера. Для хитозана из грибов вешенки *Pleoroutus ostreutus* это различие обусловлено выделением хитозан-глюканового комплекса, что приводит к возрастанию интенсивности полос поглощения валентных колебаний ОН-групп при 3450 см⁻¹. В случае образца хитозана из подмора пчел *Apis mellifera* различие возможно связано с выделением комплекса хитозана с меланинами (продуктами полимеризации аминокислот).

Таблица 4
Сравнительная характеристика физико-химических свойств исследуемых образцов хитозан

Исходное сырье	Характеристическая вязкость [η], дл/г	Молекулярная масса, кДа	Степень дезацетилирования (потенциометрически), %	Степень дезацетилирования (ИК метод), %
Краб <i>Paralithodes camtschaticus</i>	4,2	188,2	76,8±2,6	87,8±0,7
<i>Gammarus lacustris</i>	0,62	19,8	60,4±3,6	78,0±5,8
Подмор пчел <i>Apis mellifera</i>	0,24	6,5	38,9±5,1	80,1±2,7
Цисты <i>Artemia sp.</i>	0,74	24,4	75,0±11,4	78,4±5,8
Грибы <i>Pleoroutus ostreutus</i>	0,15	3,7	63,4±4,4	87,3±2,9

Результаты микроскопического исследования представлены на рис. 2. Из приведенных данных по исследованию морфологии образцов, можно предположить, что наиболее близким по строению к крабовому хитозану является хитозан полученный из цист

Artemia sp.

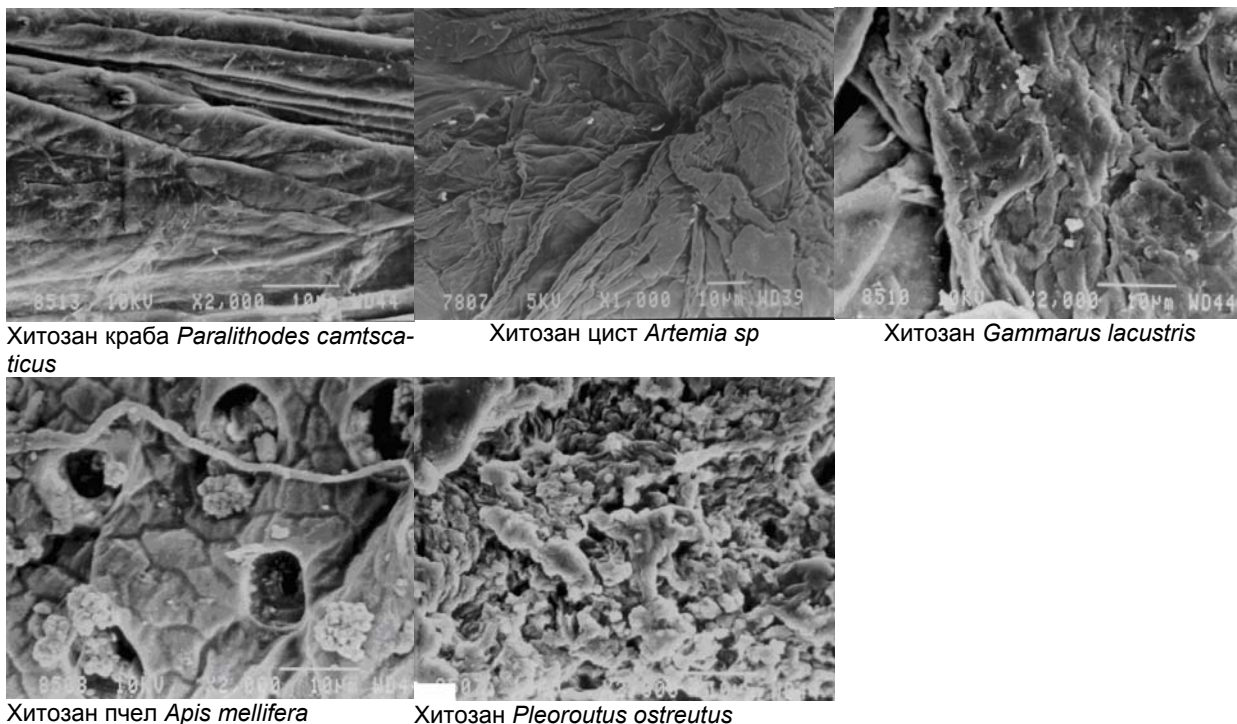


Рис. 2. Фотографии образцов хитозана из различного сырья

ВЫВОДЫ

1. На основании проведенных анализов, и сравнения физико-химических свойств образцов хитозана установлено, что наиболее близким к хитозану, полученному из панциря краба можно считать хитозан полученный из цист *Artemia sp.*

2. Оптимальным источником хитинового сырья в Алтайском крае для применения в сельском хозяйстве можно считать цисты *Artemia sp.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Бегунов И.И. Эффективность композиций на основе хитозана против формопсиса подсолнечника / Бегунов И.И. Надыкта В.Д., Терехов В.И. // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: Материалы седьмой междунар. конф. М.: Изд-во ВНИРО, 2003. – С. 67-69.
2. Васюкова Н.И. Модулирование болезнеустойчивости растений с помощью водорастворимого хитозана / Васюкова Н.И., Зиновьев С.В., Ильинская Л.И. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т. 37. – С. 115-122.

3. www.regioninfo.ru/kp/2000/08_09_2000_6.shtml

4. Иванов А.В. Получение хитозана из пчел / Иванов А.В., Смирнов И.В., Раевский В.М. // Новые достижения в исследовании хитина и хитозана: Материалы шестой междунар. конф. М.: Изд-во ВНИРО, 2001. – С.97-103.
5. Галицин В.П. Способ получения хитозана / Галицин В.П., Цветков В.Г., Иванов А.В., Гартман О.Р. // Патент РФ № 2065447. Заявл. 30.11.1992 г., опубл. 20.08.1996 г.
6. Гамзазаде А.И. Исследование гидродинамических свойств растворов хитозана / Гамзазаде А.И., Шлимак В.М., Склад А.М., Штыкова Э.В., Павлова С.А., Рогожин С.В. // Acta Polymerica. - 1985. – Т. 36. – № 8. – С. 420-424.
7. Нудьга, Л.А. Свойства хитина / Нудьга Л.А., Плиско Е.А., Данилов С.Н. // Журнал общей химии. – 1973. – Т.43. - №12. – С. 2752-2756.
8. Sabnis Sh., Block L.H. Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N-deacetylation of chitosan // Polymer Bulletin. – 1997. – V. 39 – p. 67-71.
9. Грезе И.И. О количестве хитина и кальцита в панцирях бокоплавов (Amphipoda, Gammaridea). Зоологический журнал – 1967. – Т. 46. – Вып. 11. – С.1655-1658.

ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЕВОЙ БАЗЫ АЛТАЙСКОГО КРАЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ХИТОЗАНА

10. Немцев С.В. Пчела как потенциальный источник хитозана / Немцев С.В., Зуева О.Ю. Зуева, Хисматуллин М.Р. // Новые достижения в исследовании хитина и хитозана: Материалы шестой международной конференции. М.: Изд-во ВНИРО, 2001. – 398 с.

11. Frank M. Greco, Marianne P. Fitzpatrick, Wendy S. Graffam, Ph. D., Dennis A. Thoney, Ph. D. Preliminary Evaluation of Selected Nutrient Composition of Two Life Stage of *Artemia salina* Before and After Feeding an Enriched *Torula* Yeast Product //www.brineshrimpdirect.com.

12. Цапалова И.Э. Экспертиза грибов / Цапалова И.Э., Позняковский В.М. Новосибирск: Сиб.унив. изд-во, 2002. – 382 с.

13. Струшчук К. Способ получения микрокристаллического хитозана / Струшчук Х., Некрашевич А., Вжешневска-Тощик К. // – Патент РФ № 2046800. Заявл. 02.07.1990 г., опубл. 27.10.1995 г.