

ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ ХИТИНСОДЕРЖАЩИХ БИОПОЛИМЕРОВ

Е.Г. КУБЕНКО, Г.И. КАСЬЯНОВ

*Кубанский государственный технологический университет,
350072, Российская Федерация, г. Краснодар, ул. Московская, 2;
электронная почта: kubenko-egor@mail.ru, kasyanov@kubstu.ru*

Задачей исследования явилась разработка технология переработки хитинсодержащих панцирей азовского рачка гаммаруса, с целью получения пищевого биополимера хитозана. Проанализированы запасы и особенности химического состава азовского гаммаруса. Разработана технология переработки хитинсодержащих биополимеров азовского гаммаруса, которая является модифицированным вариантом химико-экстракционного способа получения хитин/хитозана. Новым элементом разработанной технологии является щелочной гидролиз с использованием аммиака под давлением, разделение хитино-белковой часть при помощи протеолитических ферментов и использование горизонтального шнекового декантера. Предложенные технические решения позволили поднять технологию на новый уровень, сделать ее практически безотходной, полноценно использовать белковую составляющую сырья, упростить процесс получения хитозана и повысить его экологичность.

Ключевые слова: гаммарус, хитин, хитозан, технология, аммиак.

В последние годы значительно возрос интерес ученых и специалистов-практиков к получению и применению пищевого биополимера – хитозана. Более детальное изучение свойств биосовместимости, биodeградируемости, радиационной устойчивости и нетоксичности хитина и хитозана позволило расширить сферу их практического использования. К основным направлениям использования хитозана сегодня относится медицина, сельское хозяйство, косметология и пищевая промышленность.

Традиционным методом получения хитозана из панцирьсодержащего сырья является химическая деструкция сырья с последующим удалением продуктов нехитиновой природы экстракцией. В зависимости от технологии применяют одно-, дву- или многостадийную (последнюю - реже) обработку панцирьсодержащего сырья соответствующими агрессивными средами (преимущественно щелочами и кислотами). Очевидным недостатком традиционного способа получения биополимера является жесткая обработка сырья, включающая длительное воздействие на него агрессивных растворов при высоких температурах. Это приводит к деструкции и частичному

деацетиливанию хитина, что отражается на качестве хитозана, ведет к снижению его молекулярной массы, вязкости растворов, сужает спектр функциональных возможностей.

Существенным недостатком традиционной технологии являются также значительные изменения в белковой части панцирьсодержащего сырья, что делает данное сырье непригодным для комплексного безотходного применения. Остается недоиспользуемой ценная белково-углеводная составляющая сырья, которая в связи с переводом в разрушенные солевые формы лишается своей биологической ценности. С учетом сказанного ясно, что при обработке гаммаруса по известной схеме невозможно в дальнейшем из него получить даже кормовые продукты. Актуальной проблемой остается также высокий расход щелочей и кислот, определяющий их сбор, регенерацию, очистку.

В связи с биолого-экологическими преимуществами разработанного с нашим участием газожидкостного способа получения полиаминосахаров, предусматривающим использование аммиака и протеолитических ферментов, данный способ является актуальным.

Наиболее рациональным направлением данного метода представляется использование собственного ферментного комплекса гаммаруса, что достигается введением в технологию операции предварительного автоэнзимолиза сырья. При отработке параметров данного режима ориентировались на данные, полученные при комплексной переработке криля. Последние свидетельствуют о том, что степень перехода белка в жидкую фазу при автоэнзимолизе данного рачка может достигать 68%. При последующей выработке из данного полуфабриката хитина получают целевой продукт, содержащий 34 % минеральных веществ и 12 % белка, что выше допустимых норм данных примесей.

Таким образом, способ автоэнзимолиза ракообразных потенциально не обеспечивает полного депротеинирования хитина и практически не удаляет минеральные вещества, что обуславливает необходимость введения в технологию дополнительных операций по извлечению остаточного белка и

минерализованного остатка. Данное решение возможно либо при внесении в систему более активных протеиназ, либо протеолитических ферментов.

С целью подтверждения этой гипотезы нами были проведены предварительные исследования по определению активности собственного ферментного комплекса рачка высушенного гаммаруса, осуществленные методом формольного титрования.

Полученное значение протеолитической активности комплекса собственных ферментов сушеного гаммаруса, который включает не только протеолитические, но и липолитические ферменты, а также другие энзимы, составил 1,4 ед/г, что свидетельствует о высокой ферментативной активности данного сырья. Это потенциально позволяет переводить в растворимую форму значительную часть его протеинов. Измельчение сырья до размера частиц панциря 0,5- 2 мм интенсифицирует данный процесс.

При обосновании рациональности предварительного автоэнзимолиза гаммаруса был проведен специальный сравнительно-показательный эксперимент, в котором были изготовлены соответствующие партии хитина/хитозана по традиционной и разработанной технологии. Первая (экспериментальная) технология включала автоэнзимолиз и предварительную обработку гаммаруса промышленными протеолитическими ферментами при последующем воздействии аммиака. Одновременно получение хитина из гаммаруса вели традиционным (кислотно- щелочным способом), изготавливая так называемую контрольную партию продукта.

В таблице 1 приведены сведения о выходе хитозана из хитина, обработанного по новой технологии

Таблица 1 – Выход хитозана по разработанной технологии

Операции	Масса, г	Потери массы, %	Выход сырья, %
Измельчение гаммаруса	100	-	-
Обработка протеолитическими ферментами	100	-	-

Отделение хитиновой части	22	78	22
Обработка хитиновой части до получения хитозана	9	55	45
Удаление воды, сушка	1,5	12	88
Хитозан	7,5	-	-

В таблице 2 приведены сведения о выходе хитозана по традиционной технологии.

Таблица 2 – Выход хитозана по традиционной технологии

Операции	Масса, г	Потери массы, %	Выход сырья, %
Измельчение гаммаруса	100	-	-
Депротеинизация (1 стадия), фильтрование, промывка водой	80	20	80
Деминерализация (1 стадия), фильтрование, промывка водой	65	15	85
Депротеинизация (2 стадия), фильтрование, промывка водой	50	12	88
Деминерализация (2 стадия), фильтрование, промывка водой	25	50	50
Хитин	25	-	-
Обработка щелочами и кислотами	5	80	20
Удаление воды	2	55	35
Хитозан	2	-	-

Измерение количества отходов и потерь по операциям, позволило получить следующую количественную схему движения сырья по операциям при изготовлении хитозана из гаммаруса по традиционной технологии.

Согласно данным таблицы 2 выход хитозана по традиционной технологии составил 2 % от массы сырья.

Хитозан, полученный по традиционной технологии, был без запаха, имел цвет - кремовый с сероватым оттенком, по внешнему виду напоминал мелкие чешуйки. По физико-химическим показателям хитин содержал 3,5 % минеральных веществ, массовая доля воды составила 8,5%, кинематическая вязкость кислотного раствора хитозана - 12 сПз.

Из полученных данных видно, что хитозан стандартной технологии не является высокоочищенным, он включает более 3% минеральных веществ, что сказывается на его относительно невысокой кинематической вязкости (12 сПз), что, очевидно, обусловлено повышенной деструкцией молекул.

Последнее объясняется достаточно жесткой обработкой сырья, включающей длительное воздействие растворами горячей щелочи (при температуре 70 - 95°C) и соляной кислоты (температура - 22°C).

Способ, основанный на применении протеолитических ферментов (разработанная технология), позволяет достичь более мягких условий обработки хитинсодержащего сырья за счет деструкции и перевода белков в растворимое состояние под действием ферментного препарата и, таким образом, частичного естественного удаления протеинов. В итоге сокращается продолжительность последующей химической депротеинизации, и, как следствие, всего технологического цикла.

Получение хитина/хитозана по данному методу проводили при использовании промышленного ферментного препарата протосубтилина Г20Х (с массовой концентрацией 0,2%), предварительно вводя его в водную часть гидромодуля (1:2,5).

Протеолитическую активность ферментного препарата определяли по методу Ансона на казеиновом субстрате. Показания ФЭК по оптической

плотности окрашенного раствора составили в двух параллельных измерениях 0,24 и 0,25, что соответствовало активности фермента 55 и 57 мкг тирозина. При этом контрольная проба включала 5 мкг тирозина. Количество единиц фермента рассчитывали следующим образом по формуле:

$$E = a \times 8/181 \times 60 = a \times 0,00074 \text{ мкг - экв. тирозина/ мл. * мин.}$$

где: $a = D_{\text{раб}} - D_{\text{контр}}$; $D_{\text{раб}}$ - рабочий образец; $D_{\text{контр}}$ - контрольный образец.

Протеолитическая активность препарата Г20Х составила:

$$\text{ПА} = (55 - 5) \times 0,00074 / 0,001 = 37,00 \text{ ед/г*мин,}$$

$$\text{ПА} = (57 - 5) \times 0,00074 / 0,001 = 38,48 \text{ ед/г*мин}$$

$$\text{ПА ср.} = 37,8 \text{ ед/г*мин}$$

Сравнительная характеристика различных режимов депротеинизации, определенная по содержанию депротеинизированного панциря гаммаруса, приведена в табл. 3.

Таблица 3- Режим депротеинизации

Режим депротеинизации	1-я стадия депротеинизации	2-я стадия депротеинизации
По традиционной технологии	51,8	61,8
По разработанной технологии	64,5	79,2

Данные табл. 3 свидетельствуют, что при получении хитозана с применением протеолитических ферментов (препарат Г20Х) 0,2% массы сырья выход хитозана составил 7.5 %. Полученный продукт, имел светло—кремовый цвет с сероватым оттенком, был без запаха, имел вид мелких чешуек.

Полученные результаты свидетельствуют о высокоэффективности процесса депротеинизации по разработанной технологии. Количество депротеинизированного панциря после первой протеинизации достигает 64,5% в то время как при использовании традиционной технологии препарата

количество депротеинизированного панциря после первой стадии депротеинизации не превышало 51,8 %.

Полученные данные, обусловлены, мультиэнзимностью комплекса собственных ферментов гаммаруса (его многофункциональностью), а также высоким уровнем биосродства (специфичности) с объектом обработки. Это качество положительно влияет на эффективное разделение хитиново-белковой части при добавлении протеолитических ферментов, направленно воздействующих только на белковые молекулы и не расщепляющих другие продукты гаммаруса (белково-липидные, углеводные и т.д.).

Разработка режима обработки гаммаруса для получения хитозана газожидкостным способом

Проведенные исследования позволили обосновать технологию получения хитина/хитозана при комплексной переработке азовского гаммаруса, сущность которой заключается в использовании собственных ферментов рачка и дополнительном внесении протеолитических ферментов для разделения хитино-белковой части с последующим удалением оставшихся минеральных и азотистых веществ. Продолжение процесса получения хитозана предусматривает обработку хитина аммиаком и творожной сывороткой.

Обобщая полученные данные, учитывая важность безотходной переработки биопотенциала гаммаруса, принимая во внимание экономико-экологические аспекты производства, была предложена технологическая схема комплексной переработки сушеного рачка, позволяющая получать ценные целевые продукты. Отличительной особенностью нового способа является использование аммиака и инертного газа, который после завершения цикла и снижения давления в аппарате до атмосферного, улетучивается из продукта.

Векторная схема получения хитозана представлена на рисунке 1.

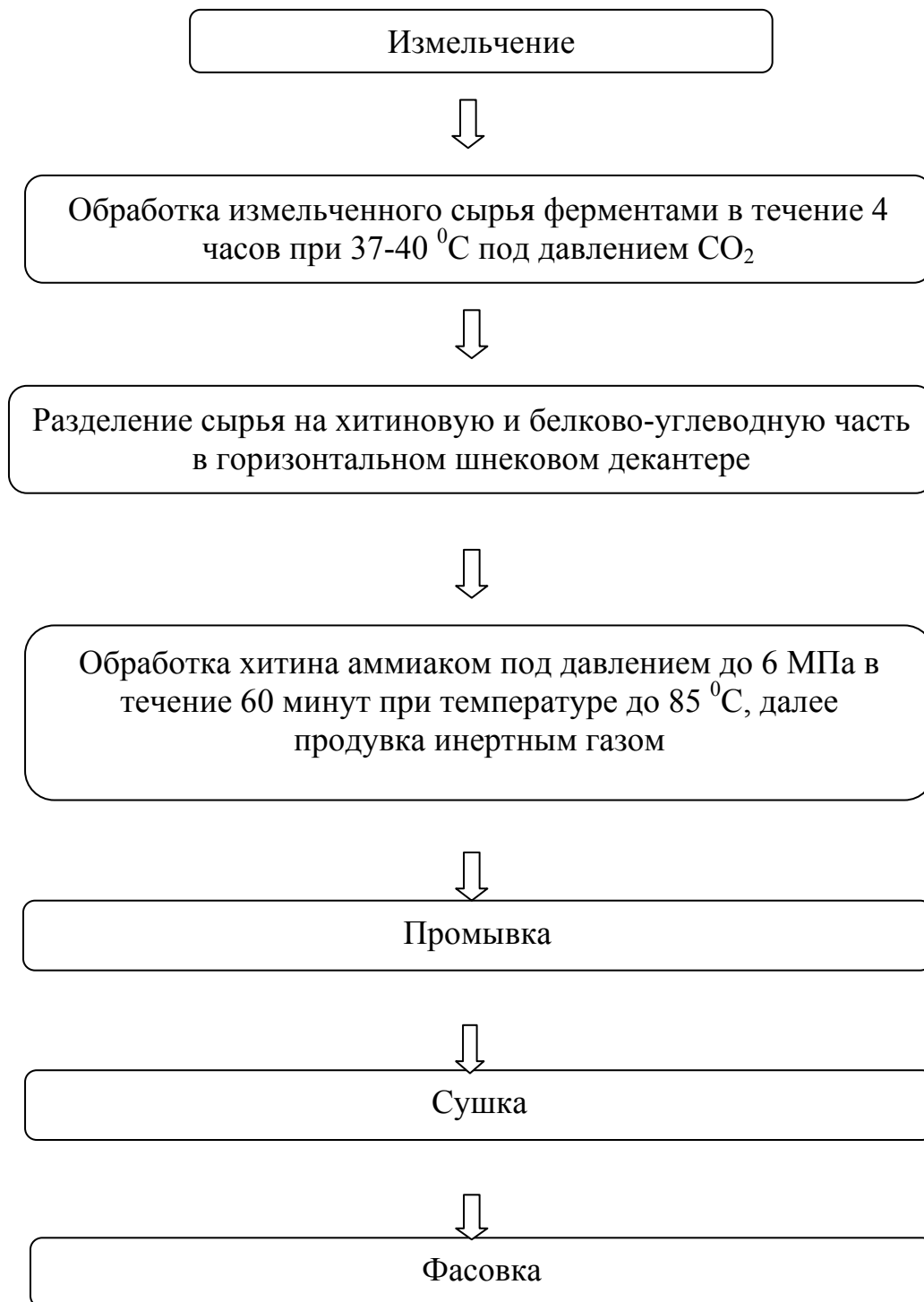


Рисунок 1- Векторная схема получения хитозана.

На рисунке 2 представлена аппаратно-технологическая линия производства хитозана, которая работает следующим образом.

Измельченное сырье поступает в бункер для сырья (1), по транспортеру (2) сырье попадает в ферментер (3), где под действием протеолитических

ферментов (пепсин и трипсин) сырье размягчается, далее размягченное сырье попадает в декантер (4), где разделяется на хитин и белково–углеводную часть.

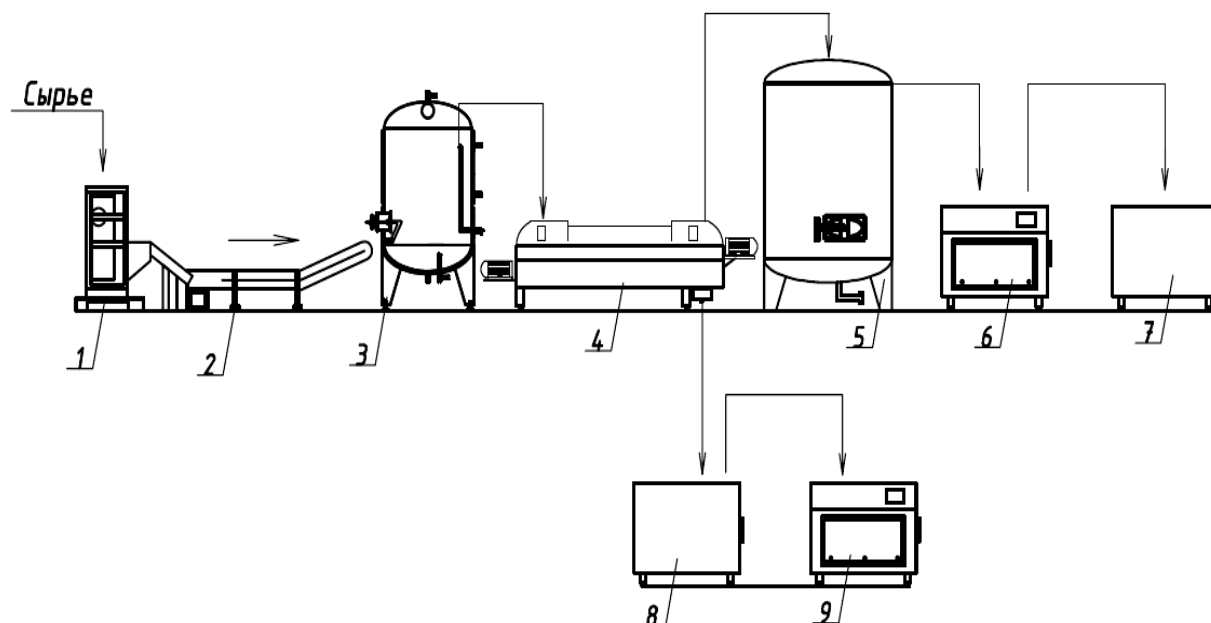


Рисунок 2 – Аппаратурно-технологическая линия производства хитозана из гаммаруса азовского

Белково–углеводная часть поступает в резервуар (8) откуда в сушильную установку (9), затем фасуется и направляется на склад готовой продукции. Полученная белково–углеводная часть включается в состав комбикормов.

Хитин направляется в реактор (5), где на первой стадии процесса подготовленное хитиновое сырье подвергается обработке аммиаком под давлением и температурой, при этом образуется основание NH_4OH , которое под давлением приобретает высокие щелочные свойства (при рН среды 12-14 ед.).

При снижении давления до атмосферного, остаточное количество паров аммиака из продукта отгоняется с помощью инертного газа. Полученный хитозан промывается и направляется в сушилку (6), а после сушки готовая продукция поступает в сборную емкость (7).

Моделирование и оптимизации режима газожидкостной обработки гаммаруса для получения хитозана из гаммаруса азовского

Приведенный аналитико- экспериментальный анализ показал, что получение хитозана рационально вести газожидкостным способом.

В предварительных экспериментах было выявлено, что легкая диспергируемость панциря гаммаруса, обуславливающая его успешное тонкое измельчение (0,5 - 2,0 мм), а также удаление части минеральных веществ позволяет получать хитозан за один цикл, при этом важным является установление рациональных условий гидролиза.

Определение оптимальных параметров процесса получения хитозана после разделения хитино-белковой части осуществляли с применением метода математического планирования эксперимента на основании ортогонального центрального композиционного плана второго порядка (ОЦКП) для двух факторов.

Согласно плану эксперимента, был проведен специальный ряд опытов в которых варьировали основные изменяемые факторы, установленные априори, количество аммиака (x_1) и продолжительность обработки (x_2). При этом ряд факторов был зафиксирован на одном уровне, что необходимо для чистоты и репрезентативности математического эксперимента: гидромодуль - 1:8; температура - 85°C, степень измельчения продукта до размера частиц 0,5 - 2,0 мм; биоконсервант - творожная сыворотка.

В получаемом хитозане, после обработки, измеряли следующие частные параметры оптимизации - содержание минеральных веществ (y_1) и потери массы (y_2), иллюстрирующие эффективность удаления минеральных веществ.

Полученные значения y_1 , а также рассчитанный в каждом эксперименте безразмерный обобщенный параметр оптимизации, свидетельствовали о наиболее рациональных условиях опыта.

В результате вычисления коэффициентов математической регрессии в процессе аппроксимации функции отклика полиномом второй степени, а также проверки значимости полученных значений коэффициентов путем сравнения их значений с соответствующими доверительными интервалами была получена

так называемая кодированная математическая модель процесса получения хитозана:

$$y = 1,471 - 0,823x_1 - 0,183x_2 + 0,098x_1x_2 + 0,445x_1^2 + 0,089x_2^2$$

где: x_1 – количество аммиака, %;

x_2 – продолжительность обработки, ч.

Математическая модель в кодированном виде наглядно показывает уровень влияния каждого их факторов на качество готового продукта в части эффективности удаления минерализованных примесей. Например, из нее видно, что значение первого фактора x_1 (количество аммиака) в несколько раз превышает таковое по второму фактору x_2 (влияние продолжительности обработки). Это свидетельствует о реальности и рациональности управления данным процессом через варьирование количества аммиака при заданной продолжительности процесса. :

Переход к математической модели с натуральными значениями факторов дает возможность в некоторой степени прогнозировать качество полученного хитозана в зависимости от задаваемых параметров:

$$y = 4,307 - 0,370x_1 - 0,164x_2 + 0,016x_1x_2 + 0,028x_1^2 + 0,040x_2^2$$

Уравнение также дает возможность рассчитать оптимальные условия процесса получения хитозана (путем его дифференцирования), а именно:

$$dy/dx_1 = 0 \quad dy/dx_1 = - 0,370 + 0,016x_2 + 0,056x_1 = 0$$

$$dy/dx_2 = 0 \quad dy/dx_2 = - 0,164 + 0,016x_1 + 0,080x_2 = 0$$

Расчетные оптимальные значения изменяемых факторов деминерализации:

- количество аммиака, % $x_1 = 6$
- продолжительность обработки, ч $x_2 = 1$

Геометрическая интерпретация процесса получения хитозана (модель процесса оптимизации в координатах) представлена на рисунке 3.

Графическая интерпретация процесса получения хитозана иллюстрирует степень влияния каждого из изменяемых факторов на совокупную качественную характеристику целевого продукта, а также позволяет

подтвердить правильность рассчитанных дифференцированием значений координат области локализации его оптимальных значений (координаты «вершины»).

Проверку расчётных значений оптимизации процесса получения хитозана проводили путем постановки специального эксперимента, в котором изготовление хитозана осуществляли по расчетным оптимальным значениям: факторов, а далее из него получали хитозан по традиционным параметрам. При этом в качестве биоконсерванта использовали как творожную сыворотку, так и раствор компонентов алоэ.

Анализ полученных данных показал, что результаты проверочного эксперимента по оптимизации процесса получения с применением раствора компонентов алоэ были близкими, хотя и несколько отличными, чем при проведении процесса с биоконсервированием творожной сывороткой, что объясняется как привнесением в систему дополнительных микроэлементов (особенно из сыворотки), так и влиянием неучтенных при «чистом» эксперименте факторов.

Знание практических факторов (вида биоконсерванта, типа оборудования и др.), а также обобщение всех результатов испытаний позволило рекомендовать следующие рациональные значения процесса получения хитозана после разрушения хитино-белковой части:

- количество аммиака - от 5,5 до 7,5 %,
- продолжительность обработки - от 1 до 1,5 ч.

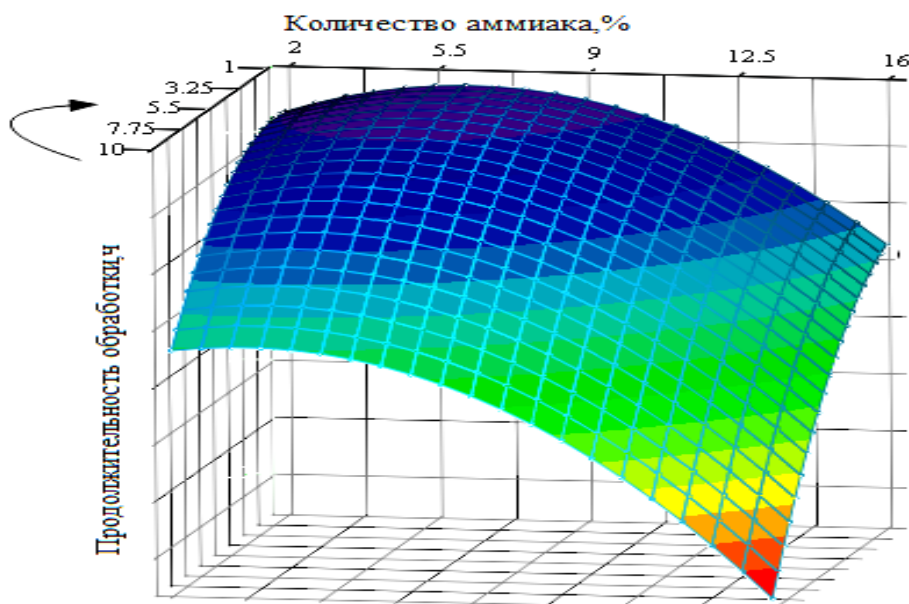


Рисунок 3 - Геометрическая интерпретация процесса получения хитозана

Трехмерное изображение процесса получения хитозана газожидкостным способом наглядно подтверждает зависимость продолжительности обработки от количества аммиака в реакторе с оптимумом 5,5 % и давлении до 6 МПа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная авторами технология переработки хитинсодержащих биополимеров азовского гаммаруса по существу является модифицированным вариантом химико-экстракционного способа получения хитин/хитозана, новым элементом которой является щелочной гидролиз с использованием аммиака под давлением, разделение хитино-белковой часть при помощи протеолитических ферментов и использования горизонтального шнекового декантера, а также применение биоконсерванта – творожной сыворотки при обоснованных условиях. Эти нововведения, несложные в практической реализации, позволяют поднять технологию на новый уровень, сделать ее практически безотходной, полноценно использовать белковую составляющую сырья, упростить процесс получения хитозана и повысить его экологичность.

ЛИТЕРАТУРА

1 Абдуллин, В. Ф. Технология и свойства биополимера хитозана из панциря речного рака. Автореф. дис. канд. техн. наук. Специальность 05.17.06. Саратов, 2006. – 24 с.

2 Кубенко Е.Г. Разработка технологии получения хитозана из гаммаруса азовского и его использование при производстве растительно-рыбных пищевых продуктов. Автореф. дис. канд. техн. наук. Специальности 05.18.01 и 05.18.04. Краснодар, 2014. –23 с.

3 Куприна, Е.Э. Научные основы технологии переработки белок- и хитинсодержащего сырья электрохимическим способом. Автореф. дис. докт техн. наук. Специальность 03.00.23. СПб, 2007. –49 с.

4 Куприна, Е. Э. Опытнo-промышленная установка для получения хитин-минерального комплекса «Хизитэл» электрохимическим способом / Е.Э. Куприна, К. Г. Тимофеева, В. Е. Красавцев, Ю. А. Бойков // Материалы Восьмой Междунар. конф. «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана», Казань, 12 - 17 июня 2006 г. - М.: ВНИРО, 2006. - С. 34-37.

5 Тимофеева, К.Г. Технология получения биологически активных хитин-минеральных препаратов из ракообразных электрохимическим способом. Автореф. дис. канд. техн. наук. Специальность 03.01.06 – биотехнология. Щёлково-2011. – 24 с.

REFERENCES

1 Abdullin, V. F. Tekhnologiya i svoystva biopolimera khitozana iz pantsirya rechnogo raka. Avtoref. dis. kand. tekhn. nauk. Spetsialnost 05.17.06. Saratov, 2006. – 24 p.

2 Kubenko E.G. Razrabotka tekhnologii polucheniya khitozana iz gammarusa azovskogo i ego ispolzovanie pri proizvodstve rastitelno-rybnykh pishchevykh produktov. Avtoref. dis. kand. tekhn. nauk. Spetsialnosti 05.18.01 i 05.18.04. Krasnodar, 2014. –23 p.

3 Kuprina, E.E. Nauchnye osnovy tekhnologii pererabotki belok- i khitinsoderzhashchego syrya elektrokhimicheskim sposobom. Avtoref. dis. dokt tekhn. nauk. Spetsialnost 03.00.23. SPb, 2007. –49 p.

4 Kuprina, E. E. Opytno-promyshlennaya ustanovka dlya polucheniya khitin-mineralnogo kompleksa «Khizitel» elektrokhimicheskim sposobom / E.E. Kuprina, K. G. Timofeeva, V. E. Krasavtsev, Yu. A. Boykov // Materialy Vosmoy Mezhdunar.

konf. «Sovremennye perspektivy v issledovanii khitina i khitozana», Kazan, 12 - 17 iyunya 2006 g. - M.: VNIRO, 2006. - P. 34-37.

5 Timofeeva, K.G. Tekhnologiya polucheniya biologicheskii aktivnykh khitin-mineralnykh preparatov iz rakoobraznykh elektrokhimicheskim sposobom. Avtoref. dis. kand. tekhn. nauk. Spetsialnost 03.01.06 – biotekhnologiya. Shchelkovo-2011. – 24 p.

PROCESSING TECHNOLOGY CHITINCONTAINING BIOPOLYMERS

E.G. KUBENKO, G.I. KASYANOV

*Kuban State Technological University,
2, Moskovskaya str., Krasnodar, Russian Federation, 350072;
e-mail: kubenko-egor@mail.ru, kasyanov@kubstu.ru*

The aim of the study was to develop a technology of chitin-containing shells of Azov crustacean Gammarus, in order to obtain food biopolymer chitosan. Stocks and analyzed the chemical composition of the Azov gammarus. The technology of processing of chitin-containing biopolymers Azov Gammarus, which is a modified version of Chemical extraction method for producing chitin / chitosan. A new element of the technology is alkaline hydrolysis with ammonia under pressure, the separation of chitin-protein portion using proteolytic enzymes and the use of a horizontal screw decanter. The proposed technical solutions allowed to raise technology to a new level, making it virtually waste-free, fully utilize the protein component of the raw material, to simplify the process of obtaining chitosan and improve its environmental friendliness.

Key words: gammarus, chitin, chitosan, technology ammonia.