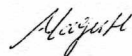


АЛАА ЭЛЬДИН МУХАМЕД МУХАМЕД ЮНЕС

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ХИТОЗАНА С ЗАДАННЫМИ
СВОЙСТВАМИ ИЗ ПАНЦИРЯ РАКООБРАЗНЫХ**

Специальности 05.18.04 – Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и
холодильных производств

Автореферат диссертации на соискание учёной степени
кандидата технических наук



Москва — 2010

Работа выполнена в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Астраханский государственный технический университет» (ФГОУ ВПО «АГТУ»).

**Научный
руководитель:**

доктор технических наук,
профессор

Мукатова
Марфуга Дюсембаевна

**Официальные
оппоненты:**

доктор технических наук,
профессор

Подкорытова
Антонина Владимировна

кандидат химических наук

Новиков
Виталий Юрьевич

Ведущая организация: Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Калининградский государственный технический университет» (ФГОУ ВПО «КГТУ»)

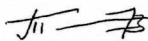
Защита диссертации состоится «25» ноября 2010 года в 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д 307.004.03 при ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» Федерального агентства по рыболовству по адресу 107140, г. Москва, ул. Верхняя Красносельская, д.17 ФГУП ВНИРО.

Факс: (495) 264-91-87

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке.

Автореферат разослан «25» октября 2010 года.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат технических наук



В.А.Татарников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. За последние три десятилетия на рубеже веков одним из перспективных направлений мирового научно-технического прогресса в области изыскания новых материалов биогенного происхождения является изучение способов получения, свойств и применения хитина и его производных.

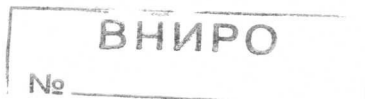
Источниками хитина являются биологические панцирьсодержащие объекты, в том числе промысловые ракообразные (крабы, креветки и раки). Широкое распространение хитинсодержащего сырья (ХСС) в природе делает его доступным для промышленной переработки и последующего применения.

Самое простое и распространенное производное хитина – частично или полностью деацетилированный хитозан. Чем больше учёные узнают о свойствах хитина и хитозана, тем шире сфера практического применения этих биополимеров. К числу основных направлений их применения можно отнести: медицину, косметологию, сельское хозяйство и пищевую промышленность. Хитин и хитозан обладают рядом уникальных свойств, в том числе адсорбционными свойствами по отношению к ионам тяжелых металлов.

Согласно литературным данным низкомолекулярные хитозаны обладают более высокой биологической способностью, по сравнению с высокомолекулярными, без указания конкретных величин степени деацетилирования и молекулярной массы в соответствии с областью применения.

Например, адсорбционные свойства хитозана, по сравнению с хитином, выражены сильнее благодаря наличию первичных аминогрупп. Способность хитозана сорбировать ионы тяжелых металлов во многом зависит не только от степени деацетилирования (СД) исходного материала, но также от природы сырья, специфики подготовки сорбента к работе и от молекулярной массы (Мм). Хитозан обладает повышенной избирательностью к ионам тяжелых металлов, полярным веществам, что позволяет ожидать высокую эффективность в процессе очистки как питьевой, так и морской воды.

В области технологии хитина и изучения его свойств проводили исследования многие ученые как за рубежом, так и в России (Elden C.A., Blair H. S. и Но



Ting-Chung, Maruca R. , Muzzarelli R.A.A., Kurita Keisuke, Onsoyen E. и Skaugrud O., Roberts G. A. F., Ершов Б.Г., Inouc К., Феофилова Е.П., Быков В.П., Быкова В.М., Немцев С.В., Терещина В.М., Горовой Л.Ф. и Петюшенко А. П., Варламов В.П., Албулов А.И., Ruiz M, Domard A., Piron E., Guibal E., Новиков В.Ю., Маслова Г.В., Мезенова О.Я., Мукатова М.Д., Сафронова Т.М., Смирнов М.Л. Вместе с тем, все известные способы получения хитозана основаны на использовании жёстких химических процессов, не позволяющих получить хитозан с заданной Мм в соответствии с направлением его последующего применения. Актуальным, в этой связи, является изыскание способа получения хитозана с заданными характеристиками (Мм, СДА) из исходного хитина целевого применения (в качестве сорбента).

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы - разработка технологии хитозана с применением щадящих способов обработки ХСС ферментными препаратами, регулирующих гидролитическое расщепление высокомолекулярного полимера с последующим исследованием сорбционных свойств полученного низкомолекулярного продукта.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

- изучение размерно-массовых характеристик, химического состава речных раков, как источника ХСС;
- исследование возможности применения низкотемпературного способа консервирования отсортированных мелких речных раков для использования в качестве дополнительного хитинсодержащего сырья;
- апробирование комбинированного способа (ферментативно-химического) получения хитина из заготовленного методом высушивания ХСС речных раков и изучение его качественных показателей;
- изучение влияния способа фракционирования хитина по размерам частиц перед деацетилизацией на изменение химических характеристик хитозана;
- исследование органолептических, физико-химических свойств полученного хитозана разной молекулярной массы;

- обоснование режимов процесса гидролитического расщепления высокомолекулярного хитозана (ВМХ) ферментными препаратами для получения низкомолекулярного хитозана (НМХ) с заданными химическими характеристиками;
- выявление сорбционной способности хитозана с известной молекулярной массой при очистке им воды, загрязненной ионами тяжелых металлов;
- изучение адсорбирующих свойств хитозана различной Мм при очистке морской воды, загрязненной ионами тяжелых металлов;
- установление возможности восстановления хитозана, примененного в лабораторных условиях в качестве сорбента, при определении уровня содержания ионов тяжелых металлов в морской воде в целях повторного его использования;
- исследование возможности применения хитина (хитозана) в качестве сорбента при очистке воды от нефтяных загрязнений.

Научная новизна работы. Научно обоснованы стадии технологического процесса получения из хитинсодержащего сырья речных раков низкомолекулярного хитозана с адсорбционными свойствами, предназначенного для использования в качестве сорбента ионов тяжелых металлов и очистки воды от нефтяных загрязнений.

Обоснованы режимы низкотемпературного способа консервирования отсортированных мелких речных раков при заготовке ХСС, обеспечивающие оптимальные сроки хранения их до переработки.

Изучена зависимость молекулярной массы (Мм) и степени деацетилирования (СД) хитозана от размеров частиц исходного хитина.

Обоснованы оптимальные режимы получения низкомолекулярного хитозана из высокомолекулярного с применением ферментных препаратов.

Выявлена эффективность очистки питьевой и морской воды от ионов тяжелых металлов с помощью сорбента-хитозана с Мм не более 100 кДа и определена последовательность связывания им тяжелых металлов в ряду Cd, Hg, Zn, As, Pb, Cu.

Определена возможность применения хитина (хитозана) в качестве сорбента воды, загрязненной нефтяной пленкой.

Предложен способ восстановления хитозана известной Мм, применённого при проведении исследований, в качестве сорбента ионов тяжёлых металлов.

Практическая значимость работы и реализация результатов. Разработаны проекты технической документации на получение низкомолекулярного хитозана с заданными свойствами (ТУ 9289-049-00471704-10 и ТИ к ним).

Разработаны и внедрены в учебный процесс методические указания «Хитозан – сорбент для очистки питьевой воды от ионов тяжелых металлов» для студентов специальности 240902.65 «Пищевая биотехнология».

Для научно-исследовательской лаборатории «Экологическая химия» Национального института океанографии и рыбного хозяйства (г. Александрия, АРЕ) разработана «Модифицированная методика определения содержания ионов тяжелых металлов в морской воде с применением хитозана в качестве сорбента» взамен применяемого в настоящее время сорбента-полиакриламида.

Проведены опыты по очистке воды от нефтяных загрязнений с применением хитина (хитозана) в испытательной лаборатории сырья, материалов и продукции в г. Астрахани, которые подтвердили возможность использования хитина (хитозана) в качестве сорбента нефтяных загрязнений.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Способ заготовки и срок хранения ХСС при переработке речных раков с применением низких температур.
2. Обоснованные оптимальные режимы получения низкомолекулярного хитозана из высокомолекулярного с применением ферментных препаратов.
3. Физико-химические характеристики хитозана известной молекулярной массы для целевого применения в качестве сорбента при очистке воды питьевой и морской от ионов тяжёлых металлов, нефтяных загрязнений.

Апробация работы. Основные результаты исследований обсуждены на 52^{ой}, 53^{ей} научно-практических конференциях профессорско-преподавательского состава (ППС) Астраханского государственного технического университета (АГТУ) (Россия, 2008-2009). Международных научно-практических конференциях: International Conference of the European Chitin Society (Venice, Italy 23-26

May 2009), Workshop ^{14th} European congress on biotechnology (Barcelona, Spain 13-16 September, 2009), Международной отраслевой научной конференции профессорско преподавательского состава, посвящённой 80-летию основания АГТУ (54-ая конференция ППС) (Россия, 2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, в том числе 6 статей, 2 из которых в издании, рекомендованном ВАК РФ.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, выводов, списка использованной литературы и 7 приложений на 24 страницах. Работа изложена на 130 страницах основного текста, содержит 26 таблиц, 29 рисунков. Список литературы включает 158 наименований, в том числе 84 – зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Введение. Обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и приведена практическая значимость работы.

Глава I. Литературный обзор. Приведен анализ сырьевых ресурсов для получения хитина, характеристика биополимеров: хитина и хитозана, способы их получения, основные направления применения. На основе анализа сорбционных свойств хитина и хитозана, а также современного состояния экологии водных объектов, выявлена эффективность применения низкомолекулярного хитозана для очистки воды, содержащей ионы тяжёлых металлов. Намечены основные направления исследований по теме диссертации.

Глава 2. Объекты, методы исследования и методика постановки эксперимента. В качестве объектов исследований использованы живые речные раки, выловленные в дельте реки Волги; варёные речные раки; измельчённые массы живых и варёных речных раков; ХСС; хитин, полученный химическим (кислотно-щелочным) и комбинированным (ферментативно-химическим) способами; хитозан высокомолекулярный и низкомолекулярный; вода питьевая, содержащая ионы тяжёлых металлов, морская вода, вода с нефтяными загрязнениями.

Методы исследования. Отбор средних проб для физико-химических ис-

следований ракообразных и подготовка их к анализам были осуществлены в соответствии с ГОСТ 7631 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Правила приемки, органолептические методы оценки качества, методы отбора проб для лабораторных испытаний». Химические показатели - массовые доли: воды, белка, минеральных веществ, жира, содержание хитина были определены по ГОСТ 7636 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа». Отбор проб комплекса протеиназ и подготовка его к применению для депротеинирования ХСС осуществлялись по ТУ 9289 – 009 – 00971704 -05. Степень деацетилирования хитозана устанавливалась методом кондуктометрического титрования, молекулярная масса – капиллярной вискозиметрией (Немцев, 1997). Содержание нерастворимых веществ в хитозане определено по ТУ 15-16-14-93. Содержание токсичных элементов в хитозане было определено методом атомно-адсорбционной спектроскопии. Определение концентрации ионов тяжелых металлов, внесенных в питьевую воду, осуществлено по ГОСТ 52180. Уровень содержания ионов тяжелых металлов в морской воде был установлен по методике АРАН (Американская ассоциация охраны общественного здоровья, 1985).

Методика постановки экспериментов. Заготовка ХСС осуществлялась двумя способами: 1) измельчение отсортированных мелких экземпляров речных раков без термической обработки с последующим замораживанием и хранением при температуре минус 18°C; контролем для определения сроков хранения служила варёномороженная измельчённая масса; 2) высушивание измельчённых хитинсодержащих отходов (ХСО), заготовленных при разделывании варёных речных раков (карапакс) и концентрата панциря (измельчённые клешни и ножки), отделённого от азотистых веществ гидросепарированием.

Программно – целевая модель проведения исследований представлена на рис. 1.

Эксперименты по получению хитина в дальнейшем проводились на высушенном измельчённом карапаксе (ХСС-КС).

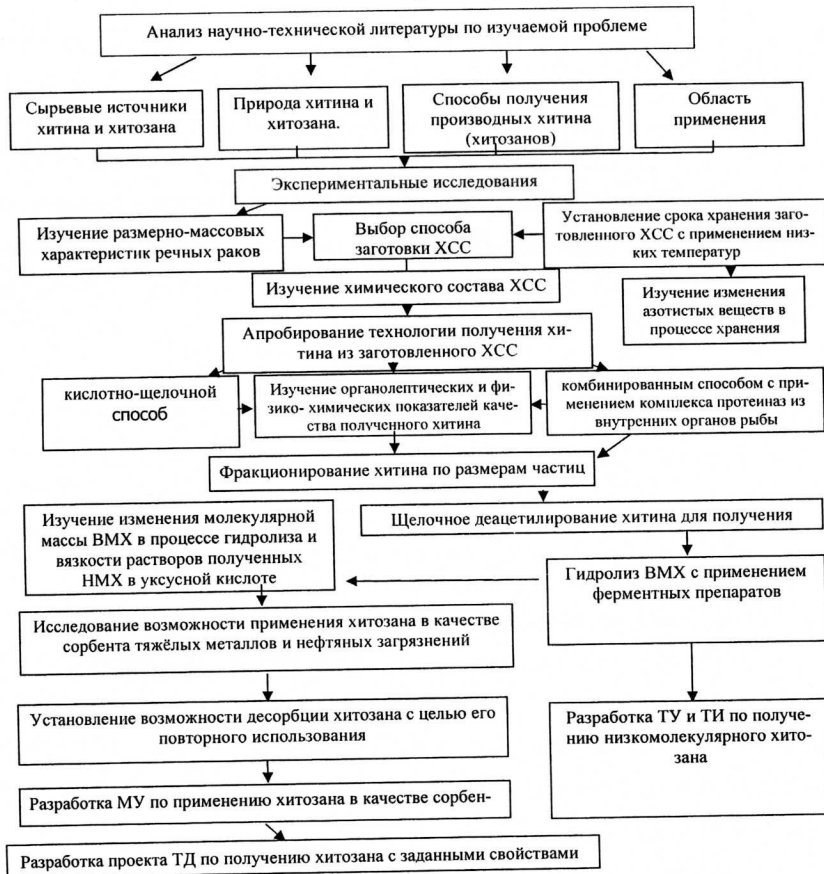


Рис. 1. Программно – целевая модель проведения исследований

Были апробированы два способа получения хитина: 1) кислотно-щелочной (химический) и 2) комбинированный (ферментативно-химический). При получении хитина 2-ым способом для деминерализации ХСС-КС была использована соляная кислота (3,5 % раствор), затем осуществлялось депротеинирование комплексом кислых протеиназ, полученных из желудков хищной рыбы (сома), с последующей очисткой хитина от источников азотистых веществ щелочной обработкой.

Для получения хитозана оба образца хитина, изготовленные 1 и 2 способами, были обработаны 50 %-ной концентрированной щёлочью. При этом образец по 2-

му способу перед обработкой был фракционирован по размерам частиц хитина: 0,5, 1,5, 2,5 мм, что способствовало получению хитозана с разной молекулярной массой: высокомолекулярный хитозан (ВМХ) с молекулярной массой (Мм) порядка 200 кДа и низкомолекулярный хитозан (НМХ) с Мм порядка 100 кДа и менее, в зависимости от размера частиц хитина. Гидролиз ВМХ ферментными препаратами без фракционирования позволил так же получить НМХ в зависимости от вида, дозы ферментного препарата и продолжительности процесса, сорбционные способности которого были разными при применении его в качестве сорбента для очистки загрязнённой воды ионами тяжёлых металлов разной концентрации. Для изучения сорбционной способности хитозана разной Мм в лабораторных условиях был собран макет колоночных установок.

При статистической обработке результатов исследований и построения графических зависимостей была использована стандартная программа Microsoft Excel и statistics 6.0.

Глава 3. Результаты исследований и их обсуждение

3.1. Размерно-массовая характеристика речных раков и изменения азотистых веществ сыромороженных и варёномороженных в процессе низкотемпературного хранения. Для заготовки ХСС при переработке промысловых речных раков интерес представляло изучение размерно-массовой характеристики живых раков (табл. 1).

Таблица 1 – Размерно-массовая характеристика речных раков

Объект исследования	Размерный ряд	Длина, см	Масса, г	Массовая доля в партии, %	
				по длине	по массе
Речной рак	Мелкий	9,0 – 10,9	20,9 – 36,6	46,8	35,6
	Средний	11,0 – 12,0	29,6 – 49,0	36,1	38,2
	Крупный	12,1 – 15,0	45,9 – 69,2	17,1	26,1

Установлено, что доля крупного по длине речного рака (12,1 – 15,0 см) в партии составляет менее 20% от общей массы. Наибольшее значение 46,8% приходится на долю мелкого речного рака (9,0 - 10,9 см) и на долю среднего (11,0 - 12,0 см) - 36,1%.

Крупные и средние экземпляры раков подвергались кратковременной тепловой обработке (бланшированию). При этом происходила инактивация фер-

ментов и уплотнение мышечной ткани, которая впоследствии легко отделялась от хитинового покрова в процессе разделявания раков. Мелкие экземпляры живых раков были разделены на две части. Одна часть была измельчена до размеров частиц 5 мм, другая часть была подвержена бланшированию продолжительностью 20 мин, стечке, охлаждению и последующему измельчению. Химический состав образцов живых и бланшированных раков (контроль) приведён в таблице 2.

Таблица 2 – Химический состав мелких живых и бланшированных раков без предварительного разделявания

Объект исследования	Содержание, %						
	воды	жира	белка	азота хитина	общего азота	минеральных веществ	хитина
Измельчённая масса раков: -живых	75,90 ±0,01	0,99 ±0,02	14,15 ±0,03	0,22 ±0,01	3,00 ±0,01	5,74 ±0,03	3,22 ±0,02
-бланшированных	71,37 ±0,01	0,94 ±0,03	6,87±0,03	0,20 ±0,01	2,90 ±0,01	7,80 ±0,02	3,00 ±0,01

Определено, что живые речные раки и бланшированные по общему химическому составу отличаются незначительно. Содержание хитина составляет 3,22 и 3,00 % соответственно. В живых речных раках воды содержится несколько больше (75,9%) минеральных веществ меньше (5,74%), по сравнению с бланшированными 71,37% и 7,8% соответственно, что связано с потерей воды при кратковременной тепловой обработке первых.

Образцы измельченных масс бланшированных и живых раков, неподверженных тепловой обработке были упакованы в полиэтиленовые пакеты и направлены на хранение при температуре минус 18-20°C. В процессе хранения установлено, что pH мышечного сока измельченной массы вареномороженого рака возрастает менее интенсивно (от 7,00 до 8,28), по сравнению с pH мышечного сока сыромороженого (от 7,00 до 8,51).

Динамика изменения азотистых веществ во время хранения также свидетельствовала о некотором отставании накопления небелкового азота (НБА), азота свободных аминокислот (ФТА) и азота летучих оснований (АЛО) в образце вареномороженой массы, чем в образце сыромороженой. Данные наблюдений свидетельствовали о гидролитическом распаде азотистых веществ обоих образ-

цов во время хранения. Причем тенденция более глубокого распада азотистых веществ сохраняется в образце измельчённой массы сыромороженной, чем в образце вареномороженной. Из полученных результатов вытекает, что замораживание измельченной массы живых мелких отсортированных экземпляров раков до температуры минус 18°C и дальнейшее хранение при этой температуре является вполне допустимым способом заготовки ХСС.

Учитывая, что порядка 50% живых раков (см. табл. 1) от поступающей партии приходится на мелкие экземпляры, разделывание которых представляет трудоемкий процесс, можно считать, что указанный способ заготовки этой части ХСС является приемлемым и позволяющим механизировать процесс отделения панциря от мышечных белков речных раков.

3.2 Сравнительная характеристика качественных показателей хитина, полученного разными способами. Получение хитина из панциря речных раков проводилось двумя способами: химическим, основанным на деминерализации ПСС соляной кислотой и депротеинировании гидроксидом натрия (No and Meyers, 1995), а также комбинированным, отличающимся тем, что депротеинирование деминерализованного ПСС раков осуществлялось ферментным препаратом, представляющим собой комплекс кислых протеиназ, полученных из желудочной ткани хищной рыбы (сома). Это позволило вторую стадию очистки от белков осуществлять слабым раствором гидроксида натрия (щелочная доочистка) (Утешев Р.Р., 2006).

Качественные показатели хитина, полученного химическим (контроль) и комбинированным (химический, совмещённый с ферментативным) способами приведены в таблице 3.

Из данных таблицы 3 следует, что по органолептическим показателям хитин, полученный разными способами, соответствует требованиям ТУ 64-14-170. Хитин, полученный химическим способом, содержит 1,8% примесей белка, которые на 0,3 % больше допустимого значения (1,5 %). Данный факт, по-видимому, связан с недостаточной эффективностью процесса депротеинизации химическим способом. Хитин, полученный комбинированным способом, по

физико-химическим показателям воды содержит 6,0 %, примесей белка - 0,9 % и минеральных веществ - 0,2 %, что свидетельствует о высоком качестве полученного биополимера.

Таблица 3 – Качественные показатели хитина, полученного химическим и комбинированным способами

Наименование показателя	Химический способ (контроль)	Комбинированный способ	Требования ТУ 64-14-170-89 (хитин)
Внешний вид	Хлопья		порошок или хлопья
Цвет	светло-кремовый	Белый	от белого до серовато-розового
Массовая доля, (%) не более: воды	9,00 $\pm$ 0,04	6,00 $\pm$ 0,04	10,0
минеральных веществ	0,30 $\pm$ 0,03	0,20 $\pm$ 0,02	1,0
Белковых веществ	1,80 $\pm$ 0,06	0,9 $\pm$ 0,02	1,5

Гидролиз белков панциря при применении комплекса кислых протеиназ из внутренностей хищной рыбы (сома) для получения хитина из панциря речных раков, благодаря более мягким режимам обработки (ферментативный), позволяет в большей степени сохранить функциональные свойства хитина, по сравнению с кислотно-щелочным. Полученные данные подтвердили результаты исследований, проведенных ранее Р.Р. Утеушевым (2006).

3.3. Исследование качества хитозана, полученного по традиционной технологии из разных образцов хитина. Хитин, полученный комбинированным способом, очищенный от примесей белковых и минеральных веществ, после измельчения был фракционирован на 3 фракции посредством просеивания через сито размерами диаметров ячеек в мм: 2,5; 1,5; 0,5. Указанные фракции хитина и хитин, полученный химическим способом, были подвергнуты деацелированию концентрированной щёлочью (50%-ной) при гидромодуле хитин : раствор 1:10. Процесс осуществлялся при температуре 95–98°C в течение 2 часов, после чего хитозан промывался водой в соотношении 1:10 до pH 7,0 и высушивался при температуре не выше 60°C. Выход хитозана составил 85% от массы сухого хитина. В таблице 4 приведены качественные характеристики полученных образцов хитозана.

Установлено, что содержание азотистых веществ в хитозане из хитина, полученного кислотно-щелочным способом, составляет 1,8, что в 2 раза больше,

чем в образцах хитозана из фракций хитина, полученного комбинированным способом (0,87- 0,92%). Этот факт объясняется тем, что, как в хитине, так и в хитозане белки прочно связаны ковалентными связями, в связи с чем достичь 100%-ного депротенирования достаточно сложно (No et al., 1995).

Таблица 4 – Качественные характеристики хитозана из хитина, полученного разными способами

Наименование показателя	Способ получения хитина			
	кислотно-щелочной	Комбинированный		
		1 фракция	2 фракция	3 фракция
Цвет	светло-кремовый			
Запах	без запаха			
Размеры частиц, мм	1,50 – 2,50	0,50	1,50	2,50
Плотность, кг/м ³	0,22	0,29	0,24	0,20
Содержание воды, %	8,50 ± 0,06	5,40 ± 0,05	5,80 ± 0,06	5,80 ± 0,09
Азотистые вещества (N x 6,25), %	1,80 ± 0,01	0,87 ± 0,03	0,91 ± 0,05	0,92 ± 0,03
Минеральные вещества, %	0,30 ± 0,03	0,27 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,22 ± 0,03
Молекулярная масса, КДа	224,0	68,0	112,0	172,0
Степень деацетилирования (СД), %	80,0	82,0	78,3	77,0
Растворимость в - уксусной кислоте, %	90,00 ± 0,06	94,50 ± 0,05	92,70 ± 0,06	91,80 ± 0,02
- соляной кислоте, %	90,00 ± 0,07	93,00 ± 0,08	91,50 ± 0,03	91,00 ± 0,04
Вязкость 1%-го раствора в уксусной кислоте, мм ² /с	4,8	1,7	2,8	3,9
Нерастворимые вещества, %	0,50 ± 0,02	0,30 ± 0,01	0,40 ± 0,05	0,40 ± 0,02

Установлено, что молекулярная масса (Мм) хитозана, полученного из сухо-го хитина кислотно-щелочным способом, наибольшая и составляет 224 кДа. Наименьшая Мм хитозана 68 кДа установлена в образце хитозана из хитина с размерами частиц 0,5 мм, полученного комбинированным способом. Мм образцов хитозана из хитина с размерами частиц 1,5 и 2,5 мм составили 112 и 172 кДа, соответственно.

Следовательно, предварительное фракционирование хитина, перед проведением деацетилирования позволяет получить хитозан различной Мм в зависимости от способа получения и размеров частиц. При этом выявлено, что чем меньше размеры частиц хитина, тем с меньшей Мм можно получить хитозан.

3.4 Обоснование режимов процесса гидролитического расщепления ВМХ ферментными препаратами

Разработке способа получения хитозана с низкой молекулярной массой уде-

ляется большое внимание (Choi Y. I. и др., 2004). НМХ обладает, как правило, более высокой биологической активностью и сорбционными свойствами, по сравнению с ВМХ (Rhoades J. и Roller S., 2000; Юнес А. М. И Мукатова М.Д., 2009). Поэтому способ гидролиза ВМХ при необходимости получения из него НМХ имеет большой интерес.

В качестве ферментных препаратов для деградации хитина и хитозана применяют комплексы ферментов различного происхождения.

В наших исследованиях ферментативный гидролиз ВМХ с Мм 172 и 224 кДа) был осуществлен с помощью протеолитических ферментных препаратов папаина и протосубтилина.

Для получения низкомолекулярного хитозана были проведены эксперименты по гидрированию высокомолекулярных хитозанов, полученных из хитина комбинированным (Мм 172 кДа) и химическим (Мм 224 кДа) способами ферментными препаратами: папаином и протосубтилином. Были использованы разные дозы ферментов (%): 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 и разные температурные условия от 40 до 55°C.

Выявлено, что ферментный препарат папаин более эффективен в процессе гидрирования хитозана, по сравнению с протосубтилином, также Мм хитозана из хитина, полученного химическим способом расщепляется более медленно в процессе гидролиза, по сравнению с хитозаном из хитина, полученного комбинированным способом. Через 5 часов гидролиза хитозана из хитина, полученного комбинированным способом ферментным препаратом - папаином при дозах 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 % при температуре 40°C его молекулярная масса уменьшается до 90; 90; 90; 59 и 50 кДа, соответственно, по сравнению с протосубтилином до 110; 105; 80; 81 и 75 кДа, соответственно. При гидролизе хитозана из хитина, полученного химическим способом ферментным препаратом папаином в тех же дозах, его молекулярная масса уменьшается за указанное время гидролиза до 100; 88; 80; 80 и 69 кДа, соответственно, по сравнению с протосубтилином до 120; 96; 85; 73 и 70, соответственно. По истечении 6 часов гидролиза продолжение процесса до 8 часов на изменение Мм не оказывает влияния.

Таким образом, для получения полимера с Мм ниже 100 кДа при температуре 40°C, продолжительность гидролиза хитозана из хитина, полученного комбинированным и химическим способами составляет 4-5 часов при дозе фермента папаина и протосубтилина не более 1%, соответственно. В таблицах 5 и 6 приведены изменения Мм хитозанов, полученных разными способами, в процессе гидролиза при оптимально выбранной температуре 50°C.

Таблица 5 - Изменение молекулярной массы хитозана из хитина, полученного комбинированным способом в процесс гидролиза ферментными препаратами

Продолжи- тельность процес- са, час	Дозы фермента %									
	0,5		1,0		1,5		2,0		3,0	
	Молекулярная масса, КДа									
	Пап аин	Прото субт илин	Пап аин	Прото субт илин	Пап аин	Прото субт илин	Пап аин	Прото субт илин	Пап аин	Прото субт илин
0	172	172	172	172	172	172	172	172	172	172
1	139	150	130	145	137	141	120	131	108	117
2	123	141	112	133	116	120	95	109	90	92
3	100	127	93	115	96	103	70	94	70	80
4	91	113	80	97	75	90	52	65	49	52
5	79	102	68	85	50	79	33	65	29	37
6	78	90	62	85	40	65	20	42	18	37
7	78	90	62	85	40	65	20	42	18	40
8	78	90	62	85	40	65	20	42	18	40

Таблица 6 - Изменение молекулярной массы хитозана из хитина, полученного химическим способом в процесс гидролиза ферментными препаратами

Продолжительность процесса, час	Дозы фермента %									
	0,5		1,0		1,5		2,0		3,0	
	Молекулярная масса, КДа									
	Пап аин	Прото субт илин	Пап аин	Прото субт илин	Пап аин	Прото субт илин	Пап аин	Прото субт илин	Пап аин	Прото субт илин
0	224	224	224	224	224	224	224	224	224	224
1	198	206	189	200	180	193	170	186	150	174
2	165	180	145	160	140	148	129	135	118	128
3	132	165	117	124	109	119	94	100	89	93
4	109	130	90	100	78	90	60	80	52	71
5	88	108	70	85	60	77	38	53	31	44
6	85	92	70	82	58	71	38	53	30	44
7	85	92	70	82	55	71	30	53	29	44
8	85	92	70	82	55	70	30	53	29	44

Как показывают данные таблиц 5, 6 в результате гидролиза исходных хитозанов с Мм 172 и 224 кДа из хитина, полученного комбинированным и химическим

ским способами при температуре 50 °С Мм уменьшается также в зависимости от доз фермента и продолжительности процесса.

Следовательно для получения полимера с Мм ниже 100 кДа, продолжительность процесса гидролиза хитозана из хитина, полученного комбинированным и химическим способами, при дозе фермента папаина не более 0,5% составляет 4- 5 часов при температуре 50 °С. С увеличением дозы папаина до 2-3% продолжительность процесса гидролиза сокращается в 1,5-2 раза.

Для получения полимера с Мм ниже 100 кДа, продолжительность процесса гидролиза хитозана из хитина, полученного комбинированным и химическим способом при дозе фермента папаина не более 0,5%, составляет 5-6 часов при температуре 55°С.

При использовании ферментного препарата протосубтилина с дозами 1,0; 1,5; 2 и 3% сохраняется такая же закономерность.

В результате проведённой работы установлена возможность получения низкомолекулярного хитозана с применением разных доз ферментных препаратов: папаина и протосубтилина. Кроме того, установлено, что дозу ферментного препарата для получения низкомолекулярного хитозана необходимо выбирать в зависимости от вида фермента и назначения полимера для применения.

Вязкость коллоидных растворов хитозана возрастает с увеличением концентрации хитозана в растворе. Поэтому изучение изменения вязкости 1%-го раствора гидролиза хитозана представляло большой интерес в зависимости от вида, дозы ферментных препаратов и продолжительности процесса гидрирования. В процессе гидролиза были определены через каждый час показатели вязкости 1%-ного раствора образцов хитозана в уксусной кислоте, установленные визуально по образованию хлопьевидного осадка.

Было установлено, что после 5 часов гидролиза вязкость раствора хитозана, также как его молекулярная масса, при всех дозах папаина остается неизменной. Вязкость раствора хитозана, гидрилизованного протосубтилином, остается неизменной при всех дозах после 6 часов процесса гидролиза.

Таким образом, можно утверждать, что с уменьшением Мм хитозана в

процессе гидролиза снижается аналогично вязкость его в 1%-ном растворе уксусной кислоты, которая стабилизируется после 5 часов при использовании папаина и 6 часов – протосубтилина.

При необходимости получения низкомолекулярного хитозана для применения в качестве структурообразователя в пищевой промышленности следует гидролиз ВМХ осуществлять при дозе ферментных препаратов (папаина или протосубтилина) дозой 1% в течение не менее 4 -5 часов соответственно, чтобы вязкость раствора хитозана в 1%-ном растворе уксусной кислоты составила порядка 2,3-2,5 мм²/г при Мм 100 кДа.

3.5 Исследование сорбционной способности хитозана разной молекулярной массы. Исследование сорбционных свойств образцов хитозана, полученного из хитина комбинированным способом, проведено на серии водных растворов, содержащих разные катионы: цинка, свинца, мышьяка, кадмия, ртути и меди в количествах от 10 до 30 мкг/л. Водные растворы с разной концентрацией катионов пропускались через колонки, с помещёнными в них хитозанами разных типов, для установления степени их сорбционной способности в зависимости от Мм (тип I - 68 кДа, тип II - 112 кДа и тип III - 172 кДа).

В целом установлено, что при концентрации ионов тяжелых металлов 10 мг/л хитозан типа I размером частиц 0,5 мм с молекулярной массой 68 кДа имеет самую высокую сорбционную емкость по отношению ко всем металлам (95-99%). При концентрации ионов тяжёлых металлов 30 мг хитозан типа II с размером частиц 1,5 мм с Мм 112 кДа имеет более низкую сорбционную способность (65,6%). Наименьшей сорбционной способностью (56,6%) при концентрации ионов 30 мг/л обладает хитозан типа III с размером частиц 2,5 мм Мм 172 кДа (табл. 7). Вместе с тем, для всех типов хитозана характерна высокая адсорбционная ёмкость по отношению к ионам кадмия, при концентрации его в воде, не превышающей 20 мг/л.

Таким образом, увеличение степени сорбции ионов тяжелых металлов хитозаном происходит с уменьшением размеров его частиц и Мм, а также при концентрации в воде ионов тяжелых металлов, не превышающей 20 мг/л.

Таблица 7 – Сорбционные способности хитозанов типов I, II и III при очистке воды от ионов тяжелых металлов

Концентрация ионов тяжелых металлов мкг/л	Степень сорбции, %					
	Zn	Cd	Pb	Cu	Hg	As
Хитозан типа I (Мм 68 кДа)						
10	99	99	98	95	99	98
20	90	99	93	95	99	94
30	67	98	90	90	93	90
Хитозан типа II (Мм 112 кДа)						
10	90	99	98	95	99	98
20	88	99	90	91	98	92
30	66	93	77	87	76	85
Хитозан типа III (Мм 172 кДа)						
10	86	99	90	90	97,5	93
20	86	99	90	80	97	91
30	57	83	77	80	67	80

Максимальное значение степени сорбции установлено для хитозана с меньшим размером частиц 0,5 мкм (тип I) и высокой СД 82%, что оказывает значительное влияние на кинетику сорбции.

Определено, что все три типа хитозана с Мм 68, 112, 172 кДа и СД 82, 78,3 и 77 %, соответственно, использованные в качестве сорбента для очистки питьевой воды, содержали микроорганизмы различной морфологии почти одного уровня, что связано, по-видимому, с условиями их хранения (не герметичные пакеты). Однако при использовании их в качестве сорбента тяжёлых металлов для очистки воды, содержащиеся в хитозане микроорганизмы не передаются, а наоборот их количество в воде несколько снижается, что по-видимому, подтверждает антибактериальное свойство хитозанов.

Для установления возможности применения в качестве сорбента хитозана известной молекулярной массы при анализе загрязнённости морской воды были проведены эксперименты по исследованию проб воды, изъятых из береговой зоны Средиземного моря. В таблице 8 приведены степени сорбции хитозанами разной Мм тяжелых металлов, содержащихся в морской воде, в мкг/л: Zn -14, Cu -70, Cd-49, Pb -36, Ni-34, Mn -52, Fe-480.

Анализ содержания ионов тяжёлых металлов в морской воде до и после сорбции показал, что концентрация всех ионов после сорбции значительно ни-

же, чем начальная.

Таблица 8 - Степень сорбции тяжёлых металлов, содержащихся в морской воде, хитозанами различной Мм

Тип хитозана	Степени сорбции, %						
	Zn	Cu	Pb	Cd	Ni	Mn	Fe
Тип I Мм 68 кДа	95,0	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0	89,5
Тип II Мм 112 кДа	90,0	97,0	99,0	94,0	99,0	96,0	85,4
Тип III Мм 172 кДа	86,0	95,7	99,0	92,0	99,0	91,3	79,1

Хитозан с Мм 68 кДа и СД 82 % обладает лучшей сорбционной способностью к ионам тяжелых металлов, т.к. степень очистки морской воды превышает 95%, кроме ионов железа, для которых степень сорбции составляет 89,5%. Высокая сорбционная способность хитозана связана, по-видимому, с наличием в его структуре гидрокси- и аминогрупп. Это делает его эффективным комплексообразующим сорбентом для ионов тяжелых металлов. Полученные результаты подтверждают результаты, приведённые в работах других исследователей (Chung et al., 2005; Li et al., 1997).

Таким образом, установлена возможность применения хитозана с Мм 68 кДа и СД 82% в качестве сорбента для очистки как питьевой, так и морской воды.

Исследование возможности восстановления хитозана, образовавшего в воде комплексы в виде хелатов, представляет практический интерес, так как сорбент может быть повторно использованным при санитарно-гигиеническом контроле качества морской воды, сбрасываемых в водоемы промышленных сточных вод, содержащих ионы тяжёлых металлов.

Известно, что ЭДТА (этилендиаминтетраацетат) является сильным комплексообразователем. По-видимому, указанное свойство ЭДТА превосходит свойство образования комплекса хитозаном с тяжёлыми металлами. Это свойство ЭДТА было проверено промывкой хелатокомплекса хитозана с ионами тяжёлых металлов раствором ЭДТА (табл. 9).

Определено, что ЭДТА извлекает ионы Ni, Cu, Cd, Pb, Mn, Fe и Zn на 57-98,5% и 50-94% и 46-88,5% из хелатокомплексов хитозана с ними, образованных тремя типами хитозана разной Мм. При этом, чем меньше Мм хитозана, образо-

вавшего комплекс с ионами тяжелых металлов, тем больше степень восстановления хитозана.

Таблица 9 – Степень восстанавливаемости хитозана из комплексов с ионами тяжелых металлов раствором ЭДТА

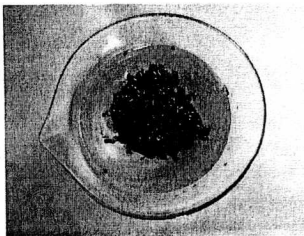
Тип хитозана	Степень извлечения тяжёлых металлов из хелатокомплексов, %						
	Zn	Cu	Pb	Cd	Ni	Mn	Fe
Тип 1 Мм 62 кДа	57,0	98,5	91,6	96,0	91,0	96,0	87,5
Тип 2 Мм 112 кДа	50,0	72,8	91,6	94,0	88,2	92,0	82,0
Тип 3 Мм 172 кДа	46,0	71,4	83,3	92,0	82,3	88,5	72,5

Установлена самая высокая степень восстановления хитозана типа I с размером частиц 0,5 мм с Мм 62 кДа из комплексов с ионами тяжёлых металлов (выше 90,0%), кроме железа (87,5%) и цинка (57,0%). Наибольшая эффективность рекуперации была выявлена из комплекса Cu (98,5%) с хитозаном типа I (с размером частиц 0,5 мм).

3.6 Исследование возможности применения хитина и хитозана в качестве сорбентов воды от нефтяных загрязнений. Известно, что хитин и хитозан обладают сорбционными свойствами по отношению к нефтяным загрязнениям, но у хитина данные свойства выражены слабее, по сравнению, с хитозаном (Феофилова Е.П., 1982).

В лабораторных условиях были проведены исследования по применению хитина (хитозана) в качестве сорбента нефтяной плёнки. Для проведения экспериментов была использована нефть Тенгизского месторождения. Хитин и 3 типа хитозана были нанесены на поверхности воды, загрязнённой сплошной нефтяной плёнкой. Хитин и хитозаны при контакте с нефтяной плёнкой сразу сорбируют нефть, в результате чего образуются твёрдые сгустки (рис. 2), легко отделяемые от поверхности воды. При этом адсорбционные свойства хитина и хитозанов не отличаются при визуальном наблюдении. Отличительной особенностью в адсорбции между хитином и хитозанами является то, что сгустки, образованные хитином постепенно выпадают в осадок в течение 2 часов. В случае сорбирования хитозаном образованные сгустки продолжают оставаться на поверхности воды, что облегчает их изъятие.

Рис. 2. Внешний вид сорбированной нефтяной пленки хитином и хитозанами



Модельные опыты позволили установить, что для сбора и удаления нефтяной пленки с поверхности 1 м^2 необходимо $0,16 \text{ кг}$ хитина или хитозана любого

типа при дозе 10% сорбента от массы нефтяной пленки.

Образование твёрдого сгустка при нанесении на поверхность нефтяной пленки хитина или хитозана, по-видимому, указывает на происхождение физической сорбции, зависящей от пористости полимера. Что касается выпадения в осадок сгустка, образованного хитином, по-видимому, указывает на большую плотность хитина, по сравнению с плотностью хитозанов.

Исходя из этого, следует предположить, что извлекаемые твердые образования нефтяной пленки с хитином вероятно возможно использовать в составе асфальтобетонных покрытий при строительстве дорог, что является предметом дальнейших исследований.

Выводы

1. Разработана технология получения низкомолекулярного хитозана с заданными химическими характеристиками из хитина, полученного комбинированным способом на основе переработки ХСС речных раков для целевого применения.
2. Предложен рациональный способ заготовки ХСС при глубокой переработке речных раков посредством направления отсортированных мелких экземпляров, не подлежащих очистке от панциря из-за трудоемкости, на измельчение в свежем виде, с последующим замораживанием и хранением при температуре не выше минус 18°C сроком не более 1 месяца.
3. Выявлено, что ХСС, заготовленное способом консервирования холодом свежих раков без термической обработки, при применении механического процесса отделения панциря (гидросепарирования), по химическому составу незначительно отличается от ХСС, заготовленного посредством отделения от

панциря бланшированных раков, по содержанию (%): хитина 3,2 и 3,0, общего азота 3,0 и 2,9, и минеральных веществ 5,7 и 7,8 соответственно.

4. Подтверждено преимущество комбинированного способа получения хитина, из высушенного ХСС, по сравнению с химическим, из-за низкого уровня примесей белка (0,9 %) и минеральных веществ (0,2 %), содержащихся в конечном продукте.

Содержание азотистых веществ в хитозане из хитина, полученного химическим способом, составило 1,8, что в 2 раза больше, чем в фракциях хитина, полученного с применением комбинированного способа (0,87- 0,92%).

5. Выявлена эффективность фракционирования хитина перед его деацетилированием, что позволяет получить из него хитозан разной молекулярной массы (Мм). При этом, чем меньше размеры частиц в фракциях хитина (0,5, 1,5 и 2,5 мм), тем меньшую Мм (62, 112, 172 кДа) имеет хитозан и большую СД (82, 78,3; 77) соответственно.

6. Обоснованы оптимальные режимы получения низкомолекулярного хитозана из высокомолекулярного применением ферментных препаратов папаина и протосубтилина в дозах (%) 0,5 и 1,0 при температуре 50 °С продолжительностью процесса гидролиза 4 и 5 часов соответственно. При этом молекулярная масса хитозана не превышает 100 кДа, степень деацетилирования составляет 82%.

7. Выявлена зависимость сорбционной способности хитозана от его Мм при очистке воды, загрязненной тяжёлыми металлами (Cd, Hg, Zn, As, Pb, Cu). Установлено, что хитозан с Мм 68 кДа, СД 82% имеет самую высокую сорбционную емкость (95-99%) по отношению ко всем металлам.

8. Установлено, что адсорбирующее свойство хитозана при очистке проб морской воды, зависит так же от его Мм, СД и исходной концентрации в ней ионов тяжёлых металлов (Cd, Zn, Pb, Cu, Fe, Ni, Mn). Определено, что хитозан с Мм 68 кДа имеет наиболее высокую степень сорбции (более 90%) для всех металлов за исключением железа, для которого степень сорбции составляет 89,5%.

9. Доказана возможность восстановления хитозана, использованного в качестве сорбента, при анализе степени загрязненности морской воды ионами тяже-

лых металлов, что позволяет использовать его повторно.

10. Определена возможность использования хитина (хитозана) в качестве сорбента для очистки водоемов от нефтяных загрязнений.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы:

Статьи в журналах, входящих в перечень ВАК

1- **Younis Alaa Eldin Mohamed**, Aly Eldeen M. Production of chitin from crustacean shells by using ferments // Естественные Науки – АГУ– 2009. – № 4(29) – Р. 69-73.

2. **Younis Alaa Eldin Mohamed**, Aly Eldeen M. Application of chitosan as a sorbent of heavy metal ions in the water processing // Естественные Науки – АГУ– 2009. – № 2(27) – Р. 156-162.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации:

1. **Алаа Эльдин Мухаммед Юнес**, Мукатова М.Д. Сравнительная характеристика изменения азотистых веществ сыромороженных и вареномороженных речных раков в процессе низко-температурного хранения // ВЕСТНИК АГТУ – 2008. – № 3(44) – С. 103-105 .

2. Мукатова, М.Д., **Алаа Эльдин Мухаммед Юнес**. Влияние вида и дозы ферментных препаратов на физико-химические показатели хитозана // ВЕСТНИК АГТУ – № 1/2009. – С. 141-144 .

3. Мукатова, М.Д., Привезенцев А. В., Боева Т. В., **Юнес А.М.** Биологически активные вещества пресноводных ракообразных способы получения и перспективы применения // ВЕСТНИК АГТУ – № 2/2009. – С. 109-113.

4. **Alaa Eldin M. Younis** and Mukatova M. D. Production of chitosan and its used as sopbent // POS 1-30 - EUCHIS 2009 - 9th International Conference of the European Chitin Society, Venice, Italy 23-26 May 2009 – 8 P. (статья в электронном сборнике).

5. Mukatova, M. D., **Younis A.M.**, Privezentzev A.V. Biologically active substances of fresh-water crustacean, methods of extraction and prospects of use // 14th European congress on biotechnology – Barcelona, Spain 13-16 September, 2009– P. 12-13.

6. **Алаа Эльдин Мухаммед Юнес**, Мукатова М.Д. Хитин из панциря речных раков в качестве сорбента для очистки водоемов от нефтяных загрязнений // МОНК, Материалы 54-ой конференции ИПС, посвященной 80-летию основания АГТУ, 2010 - С. 122.

Подп. в печать 19.10.10 Объем 45 п.л. Тираж 100 экз. Заказ 960
ВНИРО. 107140, Москва В. Красносельская, 17

5/12-1

