

О. В. Павлова

*Гродненский государственный университет имени Янки Купалы,
г. Гродно, Республика Беларусь*

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ РЕЖИМОВ КИСЛОТНО-ЩЕЛОЧНОГО ГИДРОЛИЗА В ПРОЦЕССЕ ПОЛУЧЕНИЯ ХИТОЗАНА

Аннотация. Приведены функциональные свойства хитозана и потенциал его применения в различных областях промышленности. Отмечена необходимость определения оптимальных условий получения хитозана с заданными свойствами в условиях кислотно-щелочного гидролиза.

Объектом исследования является хитинсодержащее сырье (биомасса мицелиальных грибов), целью исследования является определение оптимальных условий кислотно-щелочного гидролиза в получении хитозана.

В основной части с целью оптимизации стадий получения хитозана в условиях кислотно-щелочного гидролиза представлены результаты исследований по подбору оптимальных режимов стадии депротеинизации, деминерализации и деацетилирования хитинсодержащего сырья (биомассы мицелиальных грибов).

Результаты проведенных многофакторных экспериментов позволили установить параметры обработки, способствующие максимальному элиминированию белка и минеральной составляющей в хитинсодержащем сырье, оптимальным условиям деацетилирования для получения хитозана.

Ключевые слова: биомасса мицелиальных грибов, хитозан, трехфакторный эксперимент, регрессионный анализ.

O. V. Pavlova

Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus

IMPROVEMENT OF ACID-BASE HYDROLYSIS METHODS IN THE PROCESS OF OBTAINING CHITOSAN

Abstract. The introduction describes the functional properties of chitosan and its potential applications in various industries. It emphasizes the need to find optimal conditions for producing chitosan with the desired properties through acid-base hydrolysis.

The study focuses on chitin-containing raw materials (filamentous fungi biomass), and the objective is to determine the optimal conditions for acid-base hydrolysis in chitosan production.

The main section presents the results of studies on selecting optimal conditions for the deproteinization, demineralization, and deacetylation stages of chitin-containing raw materials (filamentous fungi biomass) in order to optimize the stages of chitosan production through acid-base hydrolysis.

The results of the conducted multifactorial experiments made it possible to establish processing parameters that promote maximum elimination of protein and mineral components in chitin-containing raw materials, and optimal deacetylation conditions for obtaining chitosan.

Keywords: biomass of filamentous fungi, chitosan, three-factor experiment, regression analysis.

Введение. Синтетические полимеры постепенно заменяются биоразлагаемыми материалами, особенно теми, которые получены из возобновляемых природных ресурсов [1]. Природные биополимеры обладают рядом преимуществ, таких как доступность, биосовместимость и биоразлагаемость, что обеспечивает экологическую безопасность и возможность получения различных химически или ферментативно модифицированных производных для конкретных целей. Полисахариды, как класс природных макромолекул, обладают высокой биоактивностью, которые получают из сельскохозяйственного сырья, отходов панцирей ракообразных, сахарного производства и др. [2].

Хитозан – это природный нетоксичный биополимер, получаемый путем деацетилирования хитина. Хитоолигосахариды – это продукты распада хитозана или хитина, полученные путем кислотного-щелочного или ферментативного гидролиза. Хитозан и его производные продемонстрировали различные функциональные свойства, которые позволили использовать их во многих областях, включая пищевую промышленность [3], косметику [4], биомедицину [5], сельское хозяйство [6], охрану окружающей среды [7] и управление сточными водами [7]. Кроме того, биоразлагаемая, нетоксичная и неаллергенная природа хитозана особенно способствует его потенциальному использованию в качестве биоактивного материала [8] (рис. 1).

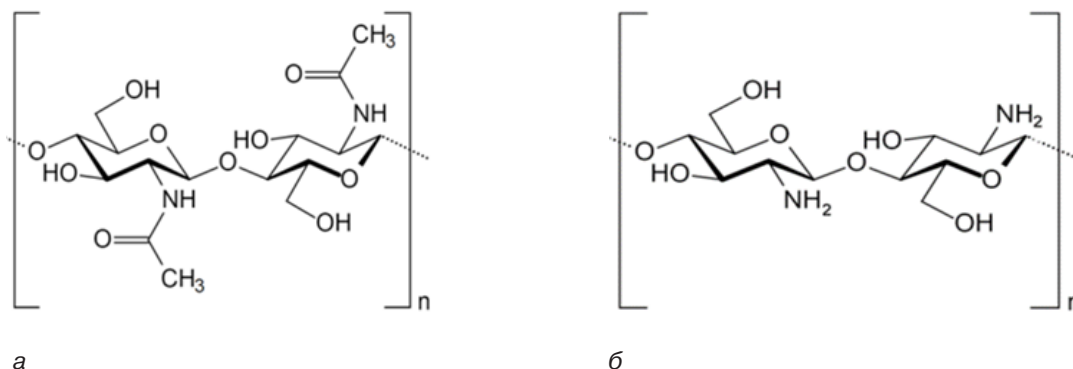


Рис. 1. Структурные формулы хитина (а) и хитозана (б)
Fig. 1. Structural formulas of chitin (a) and chitosan (b)

Хитин/хитозан получают совместно в ходе одного технологического цикла или по отдельности. Выбор метода выделения хитозана определяется составом компонентов сырья, который может быть использован непосредственно или служить биоматериалом для получения хитозана. Кислотно-щелочной гидролиз (депротеинизация, деминерализация, деацетилирование) составляет основу большинства современных промышленных технологий получения хитина/хитозана. Условия кислотного-щелочного гидролиза зависят как от источника хитинсодержащего сырья, так и от требований к конечному продукту, которые, в свою очередь, определяются областью применения.

Объект исследования – хитинсодержащее сырье (биомасса мицелиальных грибов).

Цель работы – определение оптимальных условий кислотного-щелочного гидролиза в получении хитозана.

Материалы и методика исследования. Хитозан выделялся из биомассы мицелиальных грибов (отхода биотехнологического производства лимонной кислоты) в результате последовательного трехступенчатого кислотного-щелочного гидролиза. На первой ступени хитинсодержащее сырье обрабатывали раствором гидроксида натрия – 2–3 %, при температуре $(50 \pm 10)^\circ\text{C}$, экспозиции (210 ± 30) минут, второй этап состоял в воздействии на полученный полупродукт после первой стадии раствором соляной кислоты с концентрацией 3–6 %; при температуре $(45 \pm 15)^\circ\text{C}$ и экспозиции обработки 60 мин. Третья стадия деацетилирования для получения хитозана со СД 64–67 % в условиях кислотного-щелочного гидролиза заключалась в обработке хитинсодержащего сырья раствором щелочи с концентрацией 50 %, при температуре – $70\text{--}110^\circ\text{C}$, экспозиции – 180 мин.

Результаты исследований и их обсуждение. Согласно результатам проведенных ранее исследований [9] и с целью возможного сокращения температурного режима обработки п/ф и как следствие, сокращения материальной составляющей в технологии получения хитозана проведен эксперимент по совершенствованию стадии депротеинизации. Составлена матрица ПФЭ, согласно которой приготовлено 3³ варианта режимов стадии депротеинизации. Условия функционирования выбранных факторов указаны в таблице 1.

Т а б л и ц а 1. Уровни варьирования компонентов среды
Table 1. Units of variation of components of the environments

Фактор	Условное обозначение фактора	Уровень			Интервал варьирования (λ)
		Нижний (-)	Средний (0)	Верхний (+)	
NaOH, %	X2	1	3	5	2
Температура, $^\circ\text{C}$	X1	20	40	60	20
Экспозиция, мин	X3	120	240	360	120

Контролируемый показатель, содержание белка (сырого протеина) в биомассе определяли по общему азоту. Матрица планирования трехфакторного эксперимента по оценке влияния режимов стадии депротеинизации на контролируемый показатель (количество белка в биомассе) и его результаты представлены в таблице 2.

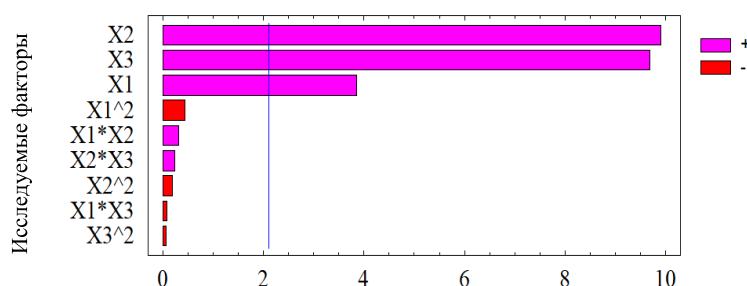
Результаты регрессионного анализа показали, что $R^2 = 0,9242$, стандартная ошибка расчетной оценки 0,0377, средняя абсолютная ошибка 0,4478. Проверка статистической значимости каждого фактора осуществлялась путем сравнения среднего квадрата с оценкой экспериментальной ошибки. Три исследуемых фактора имеют Р-значения менее 0,05, что указывает на их значимость. Для сравнения эффектов влияния экспериментальных факторов на функцию отклика, а также оценки значимости полученных коэффициентов уравнений регрессии на рисунке 2 представлена карта Парето. Оценки эффектов на диаграмме расположены по абсолютной величине значений (от наибольших к наименьшим), показано также направление действия фактора.

Т а б л и ц а 2. Матрица планирования трехфакторного эксперимента и его результаты
($n=3$, $P=0,4478$, $R^2=0,9242$)

Table 2. Matrix planning three-factor experiment and its results

Номер образца	Исследуемые факторы			Содержание белка, мг/г
	X1,t	X2,°C	X3,τ	
1	0	0	-1	0,21
2	-1	0	-1	0,34
3	1	1	-1	0,46
4	0	1	0	0,22
5	-1	-1	-1	0,48
6	1	0	0	0,12
7	1	-1	0	0,35
8	1	-1	1	0,45
9	-1	-1	1	0,46
10	0	0	0	0,17
11	-1	1	-1	0,45
12	0	-1	1	0,45
13	1	1	0	0,34
14	-1	1	0	0,34
15	1	1	1	0,46
16	0	-1	0	0,22
17	0	1	-1	0,45
18	0	-1	-1	0,44
19	1	0	-1	0,35
20	1	0	1	0,34
21	-1	-1	0	0,35
22	-1	0	1	0,34
23	0	1	1	0,45
24	-1	1	1	0,46
25	1	-1	-1	0,46
26	-1	0	0	0,18
27	0	0	1	0,22

Рис. 2. Стандартизированная карта Парето для содержания белка в биомассе
Fig. 2. Standardized Pareto map for protein content in biomass



Результаты проведенного трехфакторного анализа показали, что на содержание белка в биомассе после депротеинизации достоверно влияют все три показателя (экспозиция, температура, концентрация гидроксида натрия). Так как целью эксперимента было снижение содержания белка (сырого протеина) в биомассе, то оптимальными условиями для достижения данных показателей являются концентрация гидроксида натрия – 2–3 %, температура $(50 \pm 10) ^\circ\text{C}$, экспозиция (210 ± 30) минут. Содержание белка в биомассе после стадии депротеинизации по сравнению с сырой биомассой снижается на 99,92–99,95 %. По результатам проведенных экспериментов получено уравнение регрессии, которое адекватно описывает взаимосвязь содержания белка в биомассе получаемого полупродукта хитозана от режимов стадии депротеинизации, и является эмпирической математической моделью стадии депротеинизации:

$$Y = 0,375 - 0,0002 \times X_1 - 0,0038 \times X_2 - 0,0009 \times X_3, \quad (1)$$

где Y – адсорбционная активность, мг/г; X_1 – температура, $^\circ\text{C}$; X_2 – концентрация, %; X_3 – экспозиция, мин.

При анализе уравнения регрессии установили, что увеличение температуры на $1 ^\circ\text{C}$ приводит к уменьшению содержания белка в биомассе в среднем на 0,0002 мг/г; увеличение концентрации гидроксида натрия на 1 % приводит к уменьшению контролируемого показателя в среднем на 0,0038 мг/г; увеличение экспозиции на 1 минуту приводит к уменьшению содержания белка в биомассе в среднем на 0,0009 мг/г.

Поверхности отклика позволяют выбрать диапазоны варьирования факторов, которые обуславливают получение минимального содержания белка в биомассе. Поверхность отклика, отражающая зависимость содержания белка от времени и температуры обработки и концентрации гидроксида натрия представлены на рисунках 3–5.

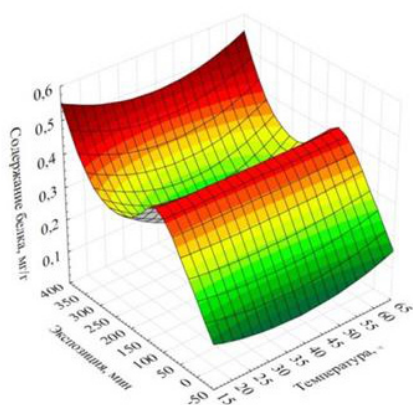


Рис. 3. Поверхность отклика, отражающая зависимость содержания белка от температуры обработки и экспозиции
Fig. 3. Response surface, reflecting the dependence of protein content on processing temperature and exposure

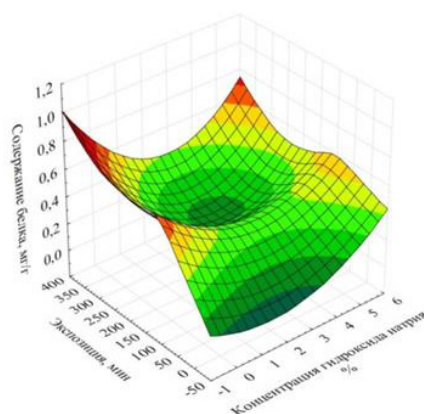


Рис. 4. Поверхность отклика, отражающая зависимость содержания белка от концентрации и экспозиции
Fig. 4. Response surface, reflecting the dependence of protein content on concentration and exposure

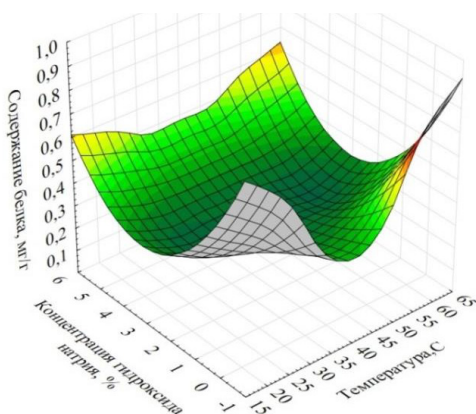


Рис. 5. Поверхность отклика, отражающая зависимость содержания белка от концентрации и температуры обработки
Fig. 5. Response surface, reflecting the dependence of protein content on concentration and processing temperature

Показано, что увеличение температуры, концентрации гидроксида натрия и экспозиции приводит к уменьшению содержания белка в биомассе, влияние всех факторов является достоверным.

Экспериментально установлено, что термохимическая обработка исходного сырья способствует снижению большинства металлов в полученных образцах, причем в разной степени [10]. Оптимизация стадии деминерализации в ходе многофакторного эксперимента и регрессионного анализа (таблица 3–4) способствовала определению режимов, обуславливающих эффективное удаление минеральных веществ, которые закрывают доступ реагентов к хитину на последующих стадиях обработки.

Т а б л и ц а 3. Уровни варьирования компонентов среды
T a b l e 1 3. Units of variation of components of the environments

Фактор	Условное обозначение фактора	Уровень			Интервал варьирования (λ)
		Нижний (-)	Средний (0)	Верхний (+)	
Температура, °C	X1	20	40	60	20
Концентрация соляной кислоты, %	X2	2	4	6	2
Экспозиция, мин	X3	20	40	60	20

Т а б л и ц а 4. Матрица планирования трехфакторного эксперимента и его результаты
T a b l e 4. Matrix planning three-factor experiment and its results

Номер образца	Исследуемые факторы			Массовая доля сырой золы, %
	X1, t	X2, °C	X3, τ	
1	1	-1	1	5,9
2	-1	0	0	7,6
3	0	1	-1	6,8
4	-1	1	1	5,7
5	1	1	1	1,7
6	0	-1	-1	8,8
7	0	0	-1	7,7
8	0	1	1	4,3
9	1	1	0	4,2
10	-1	1	-1	7,5
11	1	0	1	4,5
12	1	-1	0	6,6
13	0	-1	1	6,5
14	-1	-1	-1	9,5
15	0	1	0	5,9
16	-1	-1	0	8,9
17	0	-1	0	7,6
18	0	0	1	5,8
19	-1	1	0	6,7
20	1	0	-1	6,8
21	-1	-1	1	7,7
22	-1	0	1	6,9
23	1	1	-1	5,3
24	1	0	0	5,7
25	0	0	0	6,9
26	-1	0	-1	8,7
27	1	-1	-1	7,8

Результаты проведенного трехфакторного анализа показали, что на массовую долю сырой золы в полупродукте хитозана после деминерализации достоверно влияют все три показателя (экспозиция, температура, концентрация соляной кислоты). Содержание сырой золы в полупродукте хитозана после стадии деминерализации по сравнению с сырой биомассой

снижается на 87,31 %. Регрессионный анализ показал, что увеличение температуры на 1 °С приводит к уменьшению содержания золы в биомассе в среднем на 0,058 %; увеличение концентрации соляной кислоты на 1 % приводит к уменьшению контролируемого показателя в среднем на 0,59 %; увеличение экспозиции на 1 мин приводит к уменьшению содержания золы в полупродукте в среднем на 0,055 %. Установлены оптимальные режимы деминерализации хитинсодержащего сырья: процентная концентрация HCl 3–6 %; температура (45 ± 15) °С; экспозиции обработки 60 минут

Изучение литературных источников, а также проведенные исследования в данном направлении на предварительном этапе, дают основание полагать, что на степень деацетилирования хитозана влияют все три фактора, однако при нагревании образцов выше 130 °С и длительной экспозиции развивается термоокислительная деструкция, приводящая к потере низкомолекулярных фракций хитозана обладающих наибольшей адсорбционной активностью. Следовательно, температурный режим не должен превышать отметку в 130 °С. Также установлено, что при концентрации гидроксида натрия больше 35 % происходило деацетилирование не только аморфных, но и кристаллических участков полимера, за счет диффузии гидроксида натрия ближе к поверхности или внутрь макромолекулы, что говорит о целесообразности увеличения концентрации NaOH в ходе эксперимента. Проведено исследование по оптимизации стадии деацетилирования, составлена матрица ПФЭ, согласно которой приготовлено 3³ варианта режимов стадии деацетилирования. Условия функционирования выбранных факторов указаны в таблице 5.

Т а б л и ц а 5. Уровни варьирования компонентов среды
Table 5. Units of variation of components of the environments

Фактор	Условное обозначение фактора	Уровень			Интервал варьирования (λ)
		Нижний (-)	Средний (0)	Верхний (+)	
Температура, °С	X1	70	90	110	20
Концентрация NaOH, %	X2	30	40	50	10
Экспозиция, мин	X3	60	120	180	60

Контролируемый показатель – степень деацетилирования хитозана. Определение степени деацетилирования хитозана проводили при помощи потенциметрического титрования хлористого водорода, связанного с аминогруппами молекул хитозана. Матрица планирования трехфакторного эксперимента по оценке влияния режимов стадии деацетилирования на контролируемый показатель (степень деацетилирования хитозана) и его результаты представлены в таблице 6.

Т а б л и ц а 6. Матрица планирования трехфакторного эксперимента и его результаты
Table 6. Matrix planning three-factor experiment and its results

Номер образца	Исследуемые факторы			СД, %
	X1,t	X2,°С	X3,τ	
1	0	0	1	62
2	-1	1	-1	61
3	-1	0	1	62
4	-1	-1	0	57
5	1	0	-1	57
6	1	0	0	59
7	1	1	0	62
8	0	-1	0	58
9	-1	0	0	58
10	0	1	-1	61
11	-1	-1	1	58
12	1	1	1	64
13	-1	0	-1	58
14	0	0	-1	57
15	1	-1	0	55

Окончание табл. 6

Номер образца	Исследуемые факторы			СД, %
	X1,t	X2,°C	X3,τ	
16	-1	1	1	67
17	1	-1	1	56
18	-1	1	0	62
19	1	0	1	56
20	1	-1	-1	54
21	1	1	-1	61
22	0	1	0	62
23	-1	-1	-1	58
24	0	-1	-1	57
25	0	0	0	59
26	0	-1	1	58

Результаты проведенного трехфакторного анализа показали, что на степень деацетилирования хитозана достоверно влияют все три показателя (экспозиция, температура, концентрация щелочи). Оптимальные условия для получения хитозана с СД 64–67 % – концентрация щелочи 50 %, температура 70–110 °С при экспозиции 180 минут. Установлено, что увеличение температуры на 1 °С приводит к уменьшению степени деацетилирования в среднем на 0,039 %; увеличение концентрации гидроксида натрия на 1 % приводит к увеличению контролируемого показателя в среднем на 0,302 %; увеличение экспозиции на 1 минуту приводит к увеличению степени деацетилирования в среднем на 0,026 %. Поверхности отклика, отражающие зависимость степени деацетилирования от времени и температуры обработки и концентрации щелочи представлены на рисунках 6–8.

После стадии деацетилирования образцы промывали дистиллированной водой до pH = 7 и отжимали вручную через капроновый фильтр.

Таким образом, предложена усовершенствованная технология получения хитозана из отходов производства лимонной кислоты (биомассы мицелиальных грибов), состоящая из операций гомогенизации, депротеинизации, деминерализации, деацетилирования, промывки водой и отжима (рисунок 9).

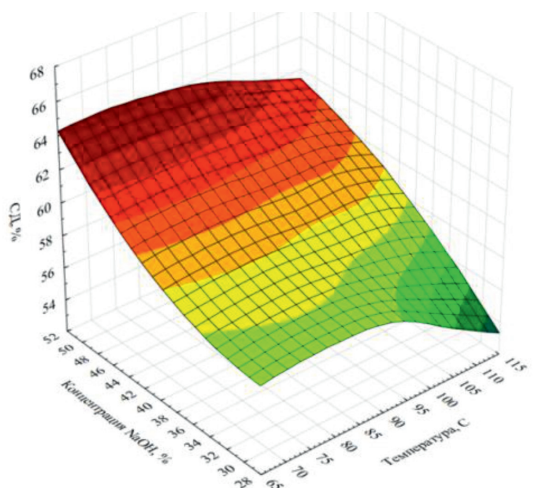


Рис. 6. Поверхность отклика, отражающая зависимость степени деацетилирования от концентрации щелочи и температуры

Fig. 6. Response surface, reflecting the dependence of the degree of deacetylation on the concentration of alkali and temperature

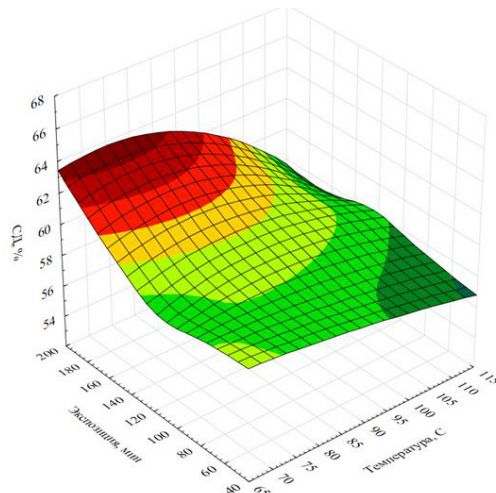


Рис. 7. Поверхность отклика, отражающая зависимость степени деацетилирования от температуры и экспозиции

Fig. 7. Response surface, reflecting the dependence of the degree of deacetylation on temperature and exposure

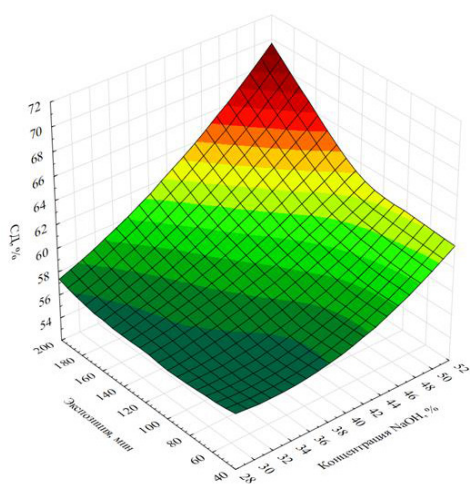


Рис. 8. Поверхность отклика, отражающая зависимость степени деацетилирования от экспозиции и концентрации щелочи
Fig. 8. Response surface, reflecting the dependence of the degree of deacetylation on exposure and alkali concentration

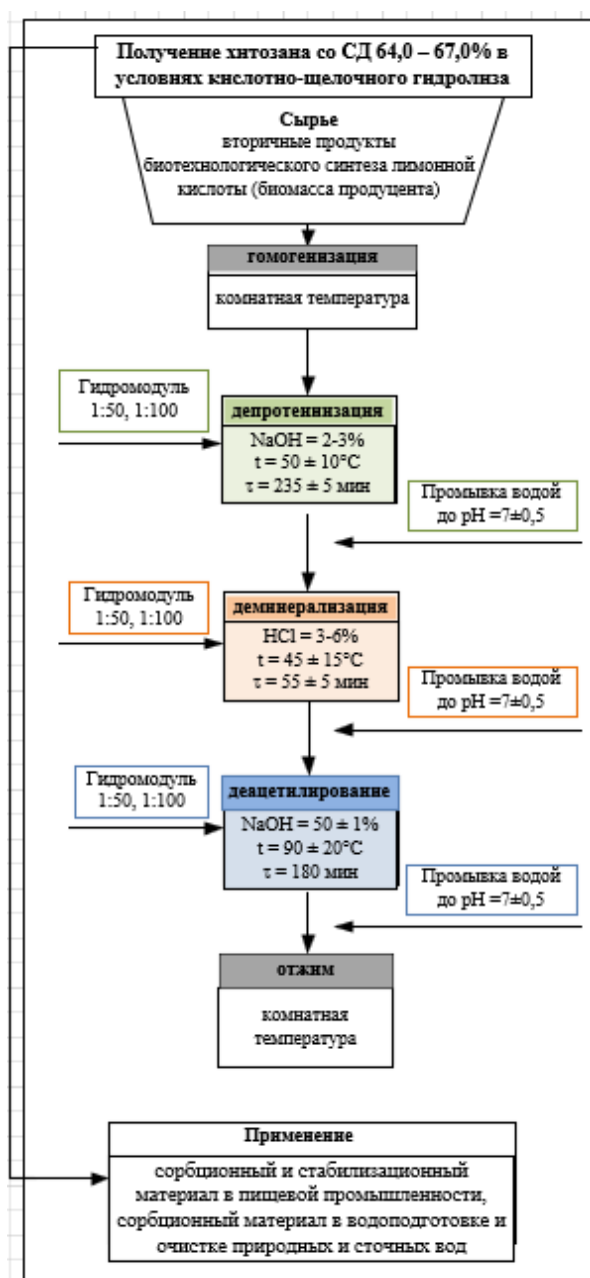


Рис. 9. Технология выделения хитозана из хитинсодержащего сырья (биомассы продуцента лимонной кислоты)
Fig. 9. Technology for the extraction of chitosan from chitin-containing raw materials (citric acid producer biomass)

Заключение. По результатам проведенных исследований установлены параметры обработки, способствующие максимальному элиминированию белка в хитинсодержащем сырье: процентная концентрация гидроксида натрия 2–3 %, температура (50 ± 10) °C, экспозиция (210 ± 30) мин., максимальному элиминированию минеральной составляющей: процентная концентрация HCl 3–6 %; температура (45 ± 15) °C; экспозиции обработки 50–60 мин.; установлены оптимальные условия деацетилирования для получения хитозана со СД 64–67 % в условиях кислотно-щелочного гидролиза: концентрация щелочи 50 %, температура – 70–110 °C, экспозиция – 180 мин.

Список использованных источников

1. Tharanathan, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future / R. N. Tharanathan // Trends in Food Science and Technology. – 2003. – Vol. 14, № 3. – P. 71–78.
2. Ramesh, H. P. Carbohydrates: the renewable raw materials of high biotechnological value / H. P. Ramesh, R. N. Tharanathan // Critical Reviews in Biotechnology. – 2003. – Vol. 23, № 2. – P. 149–173.
3. Shahidi, F. Food applications of chitin and chitosans / F. Shahidi., J. K. V. Arachchi, Y. J. Jeon // Trends in Food Science and Technology. – 1999. – Vol. 10, № 2. – P. 37–51.
4. Ravi Kumar, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications/ M. N. V. Ravi Kumar // Reactive and Functional Polymers. – 2000. – Vol. 46, № 1. – P. 1–27.
5. Felt, O. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery/ O. Felt, P. Buri, R. Gurny // Drug Development and Industrial Pharmacy. – 1998. – Vol. 24, № 11. – P. 979–993.
6. Yamada, N. Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharides/ N. Yamada, K. Shibuya // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 1993. – Vol. 57, № 3. – P. 405–409.
7. Peniche-Covas, L. W. Adsorption of mercuric ions by chitosan / L. Peniche-Covas, W. Alvarez, W. Arguelles-Monal // Journal of Applied Polymer Science. – 1992. – Vol. 46, № 7. – P. 1147–1150.
8. Kurita, K. Chemistry and application of chitin and chitosan / K. Kurita // Polymer Degradation and Stability. – 1998. – Vol. 59. – № 1–3. – P. 117–120.
9. Pavlova, O. Optimization of Deproteinization Modes of Chitine-containing Raw Materials in the Process of Producing Chitosane from Micellar Mushrooms of Aspergillus Species / O. Pavlova, V. Tratsiakova, M. Stachelska // Academia Journal of Biotechnology. – 2018. – Vol. 6, № 2. – P. 042–046.
10. Павлова, О. В. Оптимизация режимов деминерализации хитинсодержащего сырья в технологии получения хитозана из мицелиальных грибов рода Aspergillus / О. В. Павлова, С. С. Ануфрик, С. Н. Анушин // Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Сер. 6. Тэхніка. – 2017. – Т. 7, № 1. – С. 75–82.

Информация об авторах

Павлова Оксана Валерьевна, кандидат технических наук, доцент, заведующий кафедрой технологии, физиологии и гигиены питания Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, (ул. Доватора, д. 3/1, каб. 118, 230029, г. Гродно, Республика Беларусь).

E-mail: pavlova@grsu.by.

Information about the authors

Pavlova Oksana Valeryevna, PhD (Technical), , associate professor, Head of the department of technology, physiology and hygiene of food of the Yanka Kupala State University of Grodno (3/1, Dovator st., apt. 118, 230029, Grodno, Republic of Belarus).

E-mail: pavlova@grsu.by