

**УНИВЕРСИТЕТ ПО ХРАНИТЕЛНИ ТЕХНОЛОГИИ -  
ПЛОВДИВ**

**UNIVERSITY OF FOOD TECHNOLOGIES -  
PLOVDIV**



**SCIENTIFIC WORKS  
Volume LIV, Issue 2  
Plovdiv, October 19-20, 2007**

**НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНО УЧАСТИЕ**

**“ХРАНИТЕЛНА НАУКА, ТЕХНИКА И  
ТЕХНОЛОГИИ 2007”**

**‘FOOD SCIENCE, ENGINEERING AND  
TECHNOLOGIES 2007’**

**НАУЧНИ ТРУДОВЕ**

**Том LIV, Свитък 2**

**Пловдив, 19 - 20 октомври 2007**



## ХИТИН-ПРОТЕИНОВЫЙ КОМПЛЕКС – АЛЬТЕРНАТИВА ИЗВЕСТНЫМ ХИТИНСОДЕРЖАЩИМ ПРЕПАРАТАМ

Н.К. Черно, С.О. Озолина, Л.С. Шум

*Дана характеристика функционально-физиологических свойств (сорбции холевой кислоты, ионов двухвалентных металлов, фенола, анилина, вододерживающей и жиросвязывающей способности, антиоксидантной активности) хитин-протеиновых комплексов. Показано, что хитин-протеиновые комплексы могут быть использованы как компоненты биологически активных добавок в качестве альтернативы хитину и хитозану.*

### CHITIN-PROTEIN COMPLEX AS THE ALTERNATIVE TO THE KNOWN CHITIN CONTAINING PREPARATIONS

N.K. Chernov, S.A. Ozolina, L.S. Shum

*The characteristics of functional-physiological properties (sorption of cholic acid, ions of bivalent metals, phenol, aniline, ability to retain the water and to bind the oil, antioxidant activity) of chitin-protein complexes of crustacean are given. The experimental data have shown, that chitin-protein complexes can be used in biological active supplements as the alternative to chitin and chitosan.*

В мире наблюдается тенденция увеличения спроса на биологически активные добавки (БАД) с включением хитина, хитозана и их производных [9]. Уникальные свойства этих полисахаридов (избирательная сорбционная способность, биосовместимость, биodeградируемость, нетоксичность, бактерицидность и т.д.) и неисчерпаемые запасы сырья обуславливают возрастающий интерес к их производству и использованию как компонентов БАД различной направленности.

Наиболее распространенный промышленный способ получения хитина — кислотнo-щелочная обработка панцирьсодержащего сырья, в результате которой удаляются сопутствующие ему соединения [1,9]. Первой операцией технологического процесса является деминерализация. При этом получают промежуточный продукт, в составе которого преобладают хитин и белок, а незначительную его часть составляют липиды, фенольные соединения и др. В результате дальнейшего исчерпывающего депротеинирования такого продукта получают хитин, который может быть преобразован дезацетилированием в хитозан.

Получение хитина и хитозана сопряжено с рядом трудностей технологического характера и образованием значительного количества экологически вредных побочных продуктов [9]. Поэтому актуально получение альтернативных хитинсодержащих субстанций — составляющих БАД, технология которых более проста и позволяет сохранить в их составе сопутствующие хитину биологически активные вещества. К таковым потенциально относится хитин-протеиновый комплекс (ХПК) — полупродукт, образующийся на стадии деминерализации панцирьсодержащего сырья.

В связи с этим, целью работы явилась оценка возможности использования ХПК как альтернативы хитину и хитозану на основе результатов их сравнительной характеристики.

## Материалы и методы исследования

Как хитинсодержащее сырье рассматривали отходы переработки ракообразных, обитающих в водоемах Украины, — длиннопалых раков *Pontastacus leptodactylus*, креветок *Palaemon adspersus* и *Palaemon elegans*.

ХПК получали обработкой панцирьсодержащих отходов 3,5 %-ным раствором HCl при массовом соотношении твердой и жидкой субстанций 1:15 в течение 2-8 ч при комнатной температуре [1,9]. В результате дальнейшего исчерпывающего депротеинирования ХПК 4,0 %-ным раствором NaOH при температуре 100 °C получали хитин [1], который преобразовывали дезацетилизацией 40,0 %-ным раствором NaOH при высокой температуре в хитозан [1].

ИК-спектроскопические исследования проводили на спектрофотометре «Specord 71». Индекс упорядоченности биополимеров определяли как соотношение оптических плотностей полос поглощения при 1370 см<sup>-1</sup> и 2900 см<sup>-1</sup>, индекс кристалличности — при 1430 см<sup>-1</sup> и 900 см<sup>-1</sup> [2]. Индекс симметричности оценивали по отношению высокочастотной и низкочастотной части ширины полосы поглощения при 3400 см<sup>-1</sup>, измеренных от середины перпендикуляра, проведенного через максимум полосы поглощения OH-групп и базисную линию [2]. Степень ацетилизации рассчитывали по формуле  $(D_{1655} \cdot \text{см}^{-1} / D_{3450} \cdot \text{см}^{-1}) \times 100 / 1,33$ , где  $D$  — оптическая плотность при соответствующих длинах волн [11].

Рентгенограммы снимали на порошковом дифрактометре «Siemens D500» по геометрической схеме Брэгга-Брентано в интервале углов 5° ≤ 2θ ≤ 55° (напряжение на трубке 40 kV, ток 20 mA, сканирование с шагом 0,02°, время накопления 10 с в каждой точке). С целью элиминирования комптоновского рассеяния использовали изогнутый монохроматор из пиролитического графита на дифрагированном пучке.

Водоудерживающую способность (ВУС) препаратов определяли как массовую долю влаги, удерживаемую 1 г образца после экспозиции его в дистиллированной воде в течение 24 ч и последующего центрифугирования при 6000 об/мин в течение 15 мин.

Жиросвязывающую способность (ЖСС) определяли как массовую долю масла, удерживаемого 1 г образца при контакте с 5,0 см<sup>3</sup> оливкового масла при комнатной температуре в течение 10 мин и последующего центрифугирования при 2500 об/мин в течение 1 ч [12].

Для определения величины сорбции ионов двухвалентных металлов исследуемые образцы массой 0,25 г помещали в растворы хлоридов свинца, кадмия и кальция концентрацией 0,01 моль/л объемом 5,0 см<sup>3</sup> и выдерживали 17 часов при 37 °C. Затем в фильтратах определяли концентрацию ионов металлов [7].

Для определения величины сорбции холевой кислоты образцы массой 0,10 г помещали в раствор холевой кислоты концентрацией 2 мг/см<sup>3</sup> в фосфатном буфере pH 8,0 объемом 2,5 см<sup>3</sup>. Смесь выдерживали при 25 °C в течение 2,5 ч, затем в фильтрате определяли концентрацию холевой кислоты [3].

Для изучения величины сорбции производных ароматических углеводов образцы (0,50 г) выдерживали в водных растворах фенола / анилина концентрацией 10 ммоль/л объемом 200 см<sup>3</sup> при встряхивании в течение 1 ч, а затем в фильтрате определяли равновесные концентрации фенола / анилина бромид-броматным методом [4].

Антиоксидантную активность определяли модифицированным тиоцианатным методом [8] с неспецифическим субстратом окисления (1,3 %-ный раствором оливкового масла в 96 %-ном этиловом спирте).

### Результаты и их обсуждение

Препараты хитина и хитозана представляли собой практически чистые полисахариды (98,3-99,1 %). В ХПК панцирей раков массовая доля хитина составила 55,3 %; в ХПК креветок — практически в 1,5 раза меньше.

Надмолекулярную структуру продуктов оценивали с использованием методов рентгеноструктурного анализа и ИК-спектроскопии.

Рентгеноструктурное исследование препаратов ХПК, хитина и хитозана показало, что по рассеивающей способности их можно разбить на две группы — хорошо отражающие (ХПК раков и креветки *Palaemon elegans*, все образцы хитина, хитозан) и слабо отражающие (панцири всех ракообразных и ХПК креветки *Palaemon adspersus*) (табл. 1). Хорошо отражающие продукты характеризовались степенью кристалличности 12–17 % и размерами кристаллитов 5–6 нм. Для слабо отражающих — степень кристалличности не превышала 1 %, а размеры кристаллитов — 3 нм. Полученные продукты являются нанокристаллическими, причем их нанокристалличность и степень кристалличности пропорциональны размеру кристаллитов. Кроме того, прослежена тенденция увеличения степени кристалличности и размера кристаллитов хитина при его извлечении из сырья. В среднем кристаллиты содержат по 3–6 элементарных ячеек вещества в  $\alpha$ -модификации в каждом из трех измерений.

Таблица 1

Микроструктурные характеристики препаратов, полученные с помощью рентгеноструктурного анализа

Препарат	Степень кристалличности X, %	Размер кристаллитов $\Delta$ , нм
<b>Жесткопанцирные ракообразные (речные раки <i>Pontastacus leptodactylus</i>)</b>		
Панцирь	0,58	<3
ХПК	16,2	5,6
Хитин	15,8	5,8
Хитозан	10,4	5,1
<b>Мягкопанцирные ракообразные (креветки)</b>		
<i>Palaemon elegans</i>	Панцирь	0,88
	ХПК	12,8
	Хитин	15,6
<i>Palaemon adspersus</i>	Панцирь	0,56
	ХПК	0,88
	Хитин	12,3

Таким образом, степень кристалличности исследуемых препаратов меньше таковой для хитина и хитозана из панцирей дальневосточных крабов и антарктического криля [5]. Это позволяет прогнозировать большую реакционную способность полученных продуктов по сравнению с описанными в литературе.

При выделении хитина из ХПК удаляется белковая компонента и соответственно возрастают индексы упорядоченности и кристалличности полимеров (табл. 2), характеризующие их надмолекулярную структуру. Это согласуется с противоположной тенденцией изменения индекса симметричности, который характеризует плотность и прочность сетки водородных связей по гидроксильным группам.

Таблица 2

## Характеристики препаратов по данным ИК-спектроскопии

Препарат	Индекс упорядоченности	Индекс кристалличности	Индекс симметричности	Степень ацетилирования, %	
<b>Жесткопанцирные ракообразные (речные раки <i>Pontastacus leptodactylus</i>)</b>					
ХПК	1,16	0,50	0,60	—	
Хитин	1,24	0,63	0,52	82,8	
Хитозан	0,88	0,35	1,04	30,0	
<b>Мягкопанцирные ракообразные (креветки)</b>					
<i>Palaemon elegans</i>	ХПК	0,90	0,49	0,63	—
	Хитин	0,98	0,60	0,58	83,6
<i>Palaemon adspersus</i>	ХПК	0,85	0,40	0,77	—
	Хитин	0,92	0,55	0,68	84,4

Белковая составляющая ХПК, как показано результатами наших исследований, гидролизруется пищеварительными ферментами незначительно (не более, чем на 10 %). Таким образом, ХПК, как хитин и хитозан, можно отнести к категории пищевых волокон — биополимеров либо их комплексов, не разрушающихся под воздействием ферментов желудочно-кишечного тракта человека.

Известно, что проявление ряда функциональных свойств энтеросорбентами, к которым относятся полученные препараты, позволяет прогнозировать их физиологические эффекты. Такими функциональными свойствами являются ВУС, ЖСС, сорбционная активность по отношению к ионам двухвалентных металлов, производным моноциклических аренов (анилина, фенола), производной стеролов (холевой кислоты), антиоксидантные свойства.

Сравнительная характеристика функционально-физиологических свойств ХПК, хитина и хитозана приведена в табл. 3 и на рис. 1.

Почти одинаково поглощали воду хитин, хитозан, а менее интенсивно — ХПК, что согласуется со степенью их кристалличности (табл. 1): чем она больше, тем меньше способность к водопоглощению.

Между собой ХПК из жестко- и мягкопанцирных ракообразных незначительно отличались по своим функциональным свойствам. Все они имели очевидные преимущества по способности сорбировать холевую кислоту и анилин не только в сравнении с чистыми полисахаридами, но и другими известными природными энтеросорбентами, в частности, пищевыми волокнами зерновых [3,6]. Величины сорбции ионов  $Pb^{2+}$  и  $Cd^{2+}$  коррелируют со степенью деацетилирования хитина (табл. 2, 3).

Для объективной оценки эффективности использования ХПК по сравнению с хитином как сорбента тяжелых металлов необходимо учесть следующее: 1 г ХПК сорбирует 5,2 мг ионов свинца, а полученный из него хитин (0,45 г из расчета практического выхода продукта) связывает 5,9 мг ионов свинца. Аналогично 1 г ХПК связывает 4,7 ммоль фенола, а полученный из него хитин (0,45 г) или хитозан (0,36 г) — 2,3 ммоль и 2,2 ммоль фенола соответственно. Однако переработка ХПК в хитин и хитозан требует дополнительных материальных затрат и сопровождается образованием побочных продуктов, загрязняющих окружающую среду.

Таблица 3

## Функциональные свойства ХПК, хитина и хитозана

Препарат	ВУС, г H <sub>2</sub> O / г препарата	ЖСС, г масла/г препарата	Сорбция ионов двухвалентных металлов, мг/г препарата			Сорбция холевой кислоты, мг/г препарата	Сорбция анилина, ммоль/г препарата	Сорбция фенола, ммоль/г препарата	
			Pb <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>				
Жесткопанцирные ракообразные (речные раки <i>Pontastacus leptodactylus</i> )									
ХПК	2,2	2,0	5,2	2,3	3,2	21,9	12,3	4,7	
Хитин	4,4	3,4	13,2	7,3	0,0	6,7	4,6	5,0	
Хитозан	5,0	4,7	30,6	20,5	0,2	1,6	2,5	6,2	
Мягкопанцирные ракообразные (креветки)									
Palaemon elegans	ХПК	2,0	3,2	13,4	9,8	4,2	18,3	12,0	11,5
	Хитин	6,8	7,5	8,9	5,2	0,1	5,4	5,0	4,8
Palaemon adspersus	ХПК	1,9	4,0	8,0	5,4	4,7	16,5	6,2	7,5
	Хитин	7,8	8,1	7,9	4,4	0,3	4,8	4,8	2,8

Таким образом, целесообразность применения ХПК в качестве энтеросорбента очевидна.

Важной характеристикой получаемых продуктов являются их антиокислительные свойства. По своей антиоксидантной активности ХПК превосходил не только хитин и хитозан, но и приближался к кверцетину (рис. 1). Исследование вклада отдельных составляющих ХПК в антиокислительные свойства показало, что наибольшую ответственность за ингибирующую способность в реакциях свободнорадикального окисления несет полисахаридная компонента, а также содержащиеся в качестве сопутствующих веществ каротиноиды и фенольные соединения, концентрация которых составляла 8,81 и 0,17 мг/100 г соответственно [10].

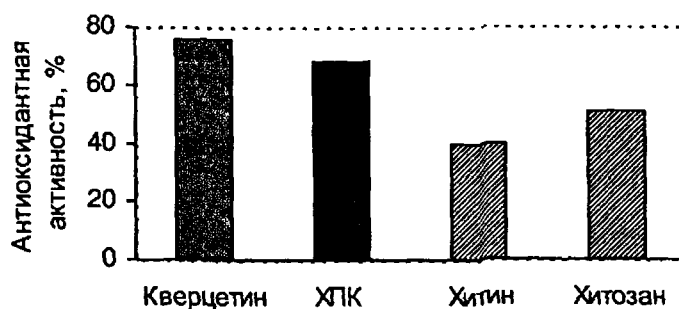


Рис.1 Антиоксидантная активность исследуемых препаратов в сравнении с кверцетином в концентрации 0,01 %

## Выводы

Характеристика функциональных свойств позволяет прогнозировать эффективность использования ХПК ракообразных водоемов Украины в составе БАД как альтернативы применяемым в настоящее время хитину и хитозану. Восполнение потребности в хитине и хитозане посредством использования ХПК позволит рассмотреть новые подходы к переработке панцирьсодержащих отходов: значительно сократить энергозатраты, повысить экологическую безопасность и экономическую эффективность производства.

## Литература

1. Артюхова С.А., Богданов В.Д., Дацун В.М. и др. Технология продуктов и гидробионтов – М.: Колос, 2001. – 496 с.
2. Базарнова Н.Г., Карпова Е.В., Катраков И.Б. и др. Методы исследования древесины и ее производных: Уч. пособие. – Барнаул: Изд-во Алт. гос. ун-та, 2002. – 160 с.
3. Данилова Е.И., Дудкин М.С., Щелкунов Л.Ф. и др. Сорбция холевых кислот пищевыми волокнами // Вопросы питания. – 1996. – № 1. – С. 30-33.
4. Кульский Л.А., Левченко Т.М., Петрова М.В. Химия и микробиология воды. – К.: Вища шк., 1987. – 116 с.
5. Марьин А.П., Феофилова Е.П., Генин Я.В. и др. Влияние кристалличности на сорбционные и термические свойства хитина и хитозана // Высокомолекул. соед.: Сер. Б. – 1982. – № 9. – С. 658-662.
6. Дудкин М.С., Черно Н.К., Казанская И.С. и др. Пищевые волокна – К.: Урожай, 1988. – 149 с.
7. Пономарев В.Д. Аналитическая химия: В 2 т. – М.: Высшая шк., 1982. – Т. 2: Количественный анализ. – 288 с.
8. Салькова Е.Г., Амзашвили М.Г. Изучение антиоксидантной активности экстрактов кутикулы яблок // Прикл. биохим. и микробиол. – 1987. – Т. 23. – Вып. 5. – С. 686-691.
9. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрыбина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. – М.: Наука, 2002. – 364 с.
10. Черно Н.К., Озолина С.О., Шум Л.С. Антиоксидантна активність компонентів панцерів ракоподібних // Матеріали міжвузівської науково-практичної конф. – Полтава, 2004. – С. 231-234.
11. Acharya B. Vishu Kumar, Lalitha R. Gowda, Rudrapatnam N. Tharanathan. Non-specific depolymerization of chitosan by pronase and characterization of the resultant products // Eur. J. Biochem. – 2004. – Vol., № 4. – P. 713-723.
12. Rotka H. Pflanzenfasern. Ballaststoffe in der menschlichen Ernährung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1980. – 340 S.

Наталья Кирилловна Черно, доктор технических наук, профессор;  
София Александровна Озолина, кандидат химических наук, доцент;  
Лариса Сергеевна Шум, аспирант.  
Одесская национальная академия пищевых технологий;  
кафедра органической химии.  
тел.: 8 (0482) 29-11-53;  
e-mail: loris\_shum@ukr.net