

СОРБЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ ХИТИНСОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКСОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ БИОМАССЫ ОТРАБОТАННОГО ПРОДУЦЕНТА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

*Изучена возможность вторичного использования отходов микробиологического синтеза лимонной кислоты – биомассы продуцента *Aspergillus niger*. В результате последовательного кислотно-щелочного гидролиза из биомассы *Aspergillus niger* выделен хитин-глюкановый комплекс и исследована его сорбционная способность. Для характеристики и сравнительного анализа сорбционной способности полученных образцов хитин-глюканового комплекса использовались следующие показатели: адсорбционная активность (сорбционная емкость), коэффициент распределения и удельная поверхность. Сорбционная способность хитин-глюканового комплекса в значительной степени зависит как от уровня влажности биомассы, так и количества этапов кислотно-щелочного гидролиза.*

➤ **Ключевые слова:** отход производства, хитин-глюкановый комплекс, сорбционная способность.

Введение

Решение вопроса целевого использования отхода микробиологического синтеза лимонной кислоты – биомассы продуцента *Aspergillus niger*, является весьма актуальным в связи с необходимостью рационального использования возобновляемых природных ресурсов с экономической и экологической точки зрения. Хитин грибов образует трудно разрушаемые комплексы с глюканами и при кислотно-щелочных обработках биомассы грибов выделяется не хитин, а хитин-глюкановый комплекс. Биомасса *Aspergillus niger*, остающаяся при производстве лимонной кислоты представляет большой интерес, в связи с содержанием в ней до 22% хитин-глюканового комплекса [1, 8].

Инактивированной грибной биомассе, а также, и продуктам ее обработки, характерна способность активно взаимодействовать с ионами тяжелых металлов и извлекать их из различных сред. Связывание ионов тяжелых металлов такой грибной биомассой может включать процессы, свойственные химическим сорбентам, т. е. ионный обмен, адсорбцию, комплексообразование, осаждение и кристаллизацию [1]. Биомасса обладает универсальными сорбционными свойствами: хорошо развитой поверхностью, клетки в своем составе имеют полифункциональные группы: ацетиламидные, карбоксильные, фосфатные, способные образовывать комплексы с металлами по хелатному механизму, с помощью координационных связей, а также нерастворимые соединения. Кроме органической части в состав биомассы входит неорганические компоненты, которые также играют роль в извлечении металлов [2].

На сегодняшний день невозможно ни оптимизировать процесс удаления ионов тяжелых металлов, ни управлять им в обычных системах биоочистки сточных вод. Промышленные предприятия сбрасывают свои сточные воды в городскую канализационную систему или в природный водоем после предварительной обработки [3].

В связи с этим особую актуальность приобретает разработка способов получения сорбента из биомассы отработанного продуцента лимонной кислоты, для решения проблем, связанных как с хитиновым сырьем, так и с очисткой природных и сточных вод от тяжелых металлов.

Целью работы является получение хитинсодержащих комплексов из биомассы отработанного продуцента лимонной кислоты и исследование их сорбционной способности

Объекты и методы исследований

Источником хитин-глюканового комплекса является отход микробиологического синтеза лимонной кислоты – биомасса *Aspergillus niger* Б-1, выращиваемая в ходе глубинного культивирования на свекловичной мелассе. Исходное сырье, полученное на ОАО «Скидельский сахарный комбинат» подвергалось последовательному трех- и четырехступенчатого кислотно-щелочному гидролизу (рис. 1).

На первой щелочной стадии биомассу продуцента лимонной кислоты обрабатывали 6% раствором NaOH в течение 3 часов при температуре 90 °С. Вторая стадия заключалась в обработке полученного после первой стадии полупродукта 3% раствором соляной кислоты при температуре 55 °С

в течение 1 часа. Третья стадия – обработка полученного на второй стадии полупродукта 6% раствором перекиси водорода. Четвертая стадия – обработка полученного на третьей стадии полупродукта 5% раствором NaOH в течение 1 часа при температуре 80 °С. После каждой стадии обработки образцы промывались дистиллированной водой до pH = 7. Полученные образцы гомогенизировались (Homogenizer type MPM-302, Польша) и высушивались тонким слоем. Сушка продукта осуществлялась при температуре 20 °С [4, 5]. В работе использовались химические реактивы марки «х. ч.» фирмы «Реахим» (Россия).



Рис. 1. Биомасса отработанного продуцента лимонной кислоты и полученные образцы хитин-глюканового комплекса

Влажность полученных образцов хитин-глюканового комплекса определялась после высушивания при температуре 130 °С в течение 40 минут и последующего охлаждения в эксикаторе в течение 20 минут. Влажность продукта в процентах вычисляли по формуле:

$$X = 100 \frac{m_1 - m_2}{m_1},$$

где m_1 – масса навески до высушивания, г; m_2 – масса навески после высушивания, г.

Полученные образцы хитин-глюканового комплекса анализировались на предмет адсорбционной активности по метиловому оранжевому спектрофотометрическим методом (спектрофотометр РВ 2201 (ЗАО «Solar» Россия)) [6].

Для характеристики и сравнительного анализа сорбционной способности полученных образцов ХтГК использовали следующие показатели: адсорбционную активность (сорбционная емкость), коэффициент распределения и удельную поверхность.

Сорбционную емкость (СЕ) полученного сырого образца ХтГК по индикатору в мг на 1 г продукта вычисляли по формуле:

$$CE = (C_1 - C_2K) 0,025 / m,$$

где C_1 – массовая концентрация исходного раствора индикатора, мг/л; C_2 – массовая концентрация раствора индикатора после сорбции, мг/л; K – коэффициент разбавления – 100; 0,025 – объем раствора индикатора, взятого для осветления, л; m – масса навески сорбента, г (в пересчете на сухое вещество).

Коэффициент распределения – K_d (мл/г) в системе сорбент-сорбат рассчитывали по формуле:

$$K_d = CE / C_{\text{кон}},$$

где СЕ – сорбционная емкость (мг/г); $C_{\text{кон}}$ – конечная концентрация индикатора в растворе (мг/л).

Удельная поверхность – $S_{\text{уд}}$ (м²/г) образцов определялась по количеству адсорбированного ХтГК метилового оранжевого. Удельную поверхность образцов рассчитывали по формуле:

$$S_{\text{уд}} = A \cdot S \cdot N_a,$$

где A – количество сорбированного индикатора (мг/г); $S = 0,57 \cdot 10^{-18}$ (площадь, занимаемая одной молекулой индикатора в монослое при мономолекулярном заполнении сорбента, м²); N_a – число Авогадро.

Исследована сорбционная способность грибной биомассы и ее структурных компонентов в образцах различной влажности (30, 80%) и одинаковых по влажности образцов ХтГК, получен-

ных варьированием количества стадий кислотного-щелочного гидролиза (трех- и четырехступенчатыми схемами).

Полученные образцы хитин-глюканового комплекса анализировались на предмет адсорбционной активности к шестивалентному хрому. Фотометрический метод определения хрома шестивалентного основан на измерении светопоглощения окрашенного (красно-фиолетового) комплексного соединения, образующегося в результате реакции 1,5-дифенилкарбазида с бихромат-ионами в кислой среде, в диапазоне длин волн от 540 до 550 нм и определении хрома по значению оптической плотности раствора [7].

Аккумуляцию ионов кальция и магния хитин-глюкановым комплексом, полученным путем кислотного-щелочного гидролиза из отхода производства лимонной кислоты – биомассы *Aspergillus niger* проводили после взаимодействия исследуемой пробы воды с сорбентом в течение 1 часа (при температуре 25 °С, 200 об/мин). Отфильтрованные пробы воды с индикатором после сорбции оттитровывали стандартизированным раствором ЭДТА до изменения красно-фиолетовой окраски в голубую. Исследуемые пробы воды анализировали в трех повторностях. Для проведения анализа в пробах воды определяли общее содержание ионов кальция и магния (общую жесткость) титрованием раствором ЭДТА (трилоном Б) с эриохромом черным [9]. Общую жесткость исследуемой пробы воды до сорбции и после сорбции определяли по формуле:

$$C_x = \frac{N \cdot n \cdot 1000}{V},$$

где N – нормальность стандартизированного раствора ЭДТА; n – объем раствора ЭДТА, затраченный на титрование, мл; V – объем пробы воды, взятой для исследования, мл

Результаты исследования и их обсуждение

Полученные образцы хитин-глюканового комплекса анализировались на предмет адсорбционной активности по метиловому оранжевому. Для построения градуировочного графика (рис. 1) измеряли оптическую плотность (400 нм) растворов сравнения, приготовленных из рабочего раствора индикатора массовой концентрации 150 мг/л.

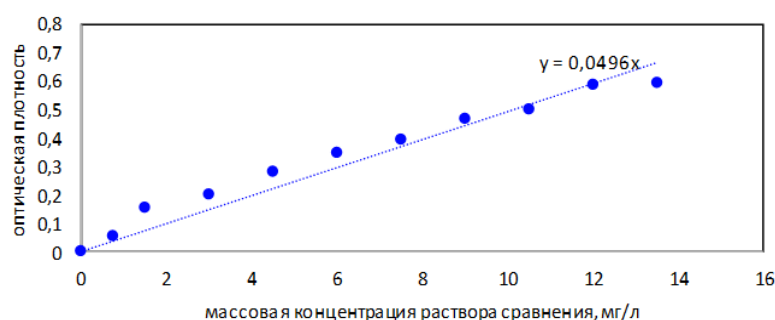


Рис. 1. Зависимость оптической плотности от массовой концентрации раствора сравнения метилового оранжевого

Для характеристики и сравнительного анализа сорбционной способности полученных образцов ХтГК использовали следующие показатели: адсорбционную активность (сорбционная емкость), коэффициент распределения и удельную поверхность.

Один из факторов, определяющий состояние биосорбента, обеспечивающий сорбционные свойства, является уровень гидратированности. Однако по литературным данным трудно судить об оптимальном количестве связанной воды в грибной биомассе, используемой для сорбции. В одних случаях просто удаляются излишки воды из нее с использованием вакуумного насоса [10], в других – подвергаются сушке до постоянной влажности [11], в-третьих – используется сырая биомасса без достижения определенной влажности [12].

В связи с этим было проведено исследование влияния влажности на сорбционную активность. Адсорбционную активность (сорбционная емкость), коэффициент распределения и удельную поверхность рассчитывали для образцов различной влажности (80% и 30%) в пересчете на сухое вещество. Выявлено, что сорбционная емкость хитин-глюканового комплекса, выделенного (трехступенчатая схема) из биомассы *Aspergillus niger* Б-1– отхода производства лимонной кислоты, высушенного до влажности 30% ниже на 62% сорбционной емкости сырого образца (влажность 80%). Адсорбционная активность полученного образца ХтГК, выделенного по четырехступенчатой схеме, высу-

шенного до влажности 30% на 65% ниже таковой сырого образца. При более значительном уровне удаления влаги температурный фактор играет весьма существенную роль в уменьшении сорбционной способности. Сравнение сорбционной емкости одинаковых по влажности образцов ХтГК, полученных варьированием стадий кислотно-щелочного гидролиза (трех- и четырехступенчатыми схемами) показывает, что адсорбционная активность образцов (влажность 30%) увеличивается на 28% в результате четырехступенчатой обработки (табл. 1). Четырехступенчатая схема выделения хитин-глюканового комплекса способствует практически его полному отбеливанию (рис. 2).

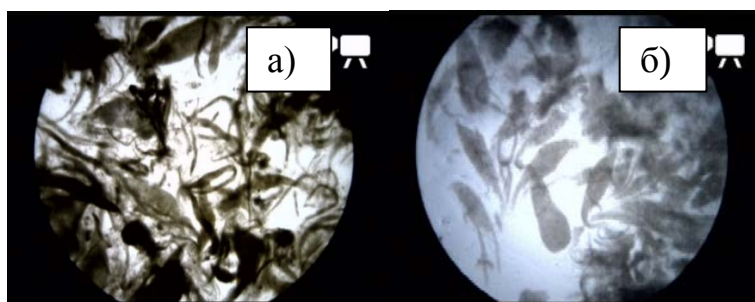


Рис. 2. Хитин-глюкановый комплекс (микроскопия при использовании объектива $\times 40$), выделенный путем кислотно-щелочного гидролиза: а) трехступенчатая обработка, б) четырехступенчатая обработка

Сравнительный анализ сорбционной способности по полученным показателям: адсорбционной активности (сорбционная емкость), коэффициента распределения и удельной поверхности представлен в табл. 1–3.

Таблица 1

Сорбционная емкость (мг/г) по отношению к метиловому оранжевому

Трехступенчатая обработка		Четырехступенчатая обработка	
Влажность 80%	Влажность 30%	Влажность 80%	Влажность 30%
250,00	94,29	345,00	121,10

Таблица 2

Коэффициент распределения (мл/г) по отношению к метиловому оранжевому

Трехступенчатая обработка		Четырехступенчатая обработка	
Влажность 80%	Влажность 30%	Влажность 80%	Влажность 30%
0,19	0,08	0,28	0,10

Таблица 3

Удельная поверхность ($\text{м}^2/\text{г}$) по отношению к метиловому оранжевому

Трехступенчатая обработка		Четырехступенчатая обработка	
Влажность 80%	Влажность 30%	Влажность 80%	Влажность 30%
$857,85 \cdot 10^5$	$323,55 \cdot 10^5$	$1183,80 \cdot 10^5$	$415,20 \cdot 10^5$

Анализ аккумуляции ионов кальция и магния хитин-глюкановым комплексом, полученным путем кислотно-щелочного гидролиза из отхода производства лимонной кислоты – биомассы *Aspergillus niger* Б-1 проводили после взаимодействия исследуемой пробы воды с сорбентом в течение 1,5 часа (при температуре 25 °С, 200 об/мин). Отфильтрованные пробы воды с индикатором после сорбции оттитровывали стандартизированным раствором ЭДТА до изменения красно-фиолетовой окраски в голубую. Исследуемые пробы воды анализировали в трех повторностях (табл. 4).

Таблица 4

Содержание ионов кальция и магния (общая жесткость)

Общая жесткость, мг-экв/л								
№	до сорбции				после сорбции			
	Проба 1	C_x	Проба 2	C_x	Проба 1	C_x	Проба 2	C_x
1	4,872	4,553	4,611	5,017	1,506	1,450	1,338	1,506
2	4,785		5,655		1,338		1,171	
3	4,002		4,785		1,506		2,008	

Исследование показало, что общее содержание ионов кальция и магния (общая жесткость) существенно уменьшилось во всех исследуемых пробах воды. В пробе 1 общая жесткость уменьшилась после сорбции на 68%; в пробе 2 на 70%.

Полученные образцы хитин-глюканового комплекса анализировались на предмет адсорбционной активности к шестивалентному хрому фотометрическим методом. Для построения градуировочного графика (рис. 3) использовали стандартный раствор бихромата калия, содержащий 100 мкг/мл хрома, приготовленный из реактива марки «х. ч.» (0,0283 г бихромата калия растворяли в дистиллированной воде в мерной колбе емкостью 100 мл). Разбавлением стандартного раствора в 100 раз получали рабочий раствор с содержанием хрома 1 мкг/мл. Измеряли оптическую плотность (540 нм) растворов сравнения, приготовленных из рабочего раствора хрома шестивалентного, массовой концентрации 1 мкг/мл. Суммарное содержание хрома C_x в мг/л находили по формуле:

$$C_x = \frac{C \cdot n}{1000},$$

где C – концентрация хрома, найденная по градуировочному графику, мкг/л; n – степень разбавления исходной пробы.

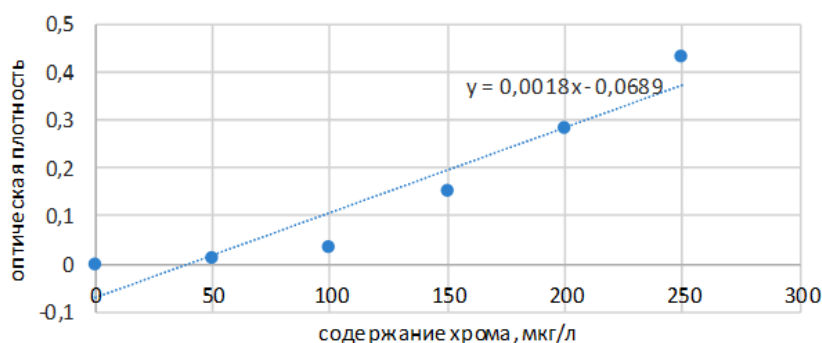


Рис. 3. Зависимость оптической плотности от массовой концентрации раствора сравнения хрома (VI)

Анализ аккумуляции хрома шестивалентного хитин-глюкановым комплексом, полученным путем кислотного-щелочного гидролиза из отхода производства лимонной кислоты – биомассы *Aspergillus niger* проводили после взаимодействия исследуемой пробы с сорбентом в течение 1,5 часов (при температуре 25 °С, 200 об/мин). В отфильтрованных пробах после сорбции определяли содержание хрома фотометрическим методом с 1,5-дифенилкарбазидом. Исследуемые пробы анализировали в трех повторностях (табл. 5).

Таблица 5

Результаты определения хрома шестивалентного

№	До сорбции				После сорбции			
	Оптическая плотность	Среднее значение оптической плотности	Содержание хрома (VI) мкг/л	C_x , мг/л	Оптическая плотность	Среднее значение оптической плотности	Содержание хрома (VI) мкг/л	C_x , мг/л
1	0,156	0,156	48,40	0,0484	0,038	0,077	4,5	0,0045
2	0,168				0,088			
3	0,144				0,106			

Таким образом, общее содержание ионов хрома существенно уменьшилось во всех исследуемых пробах. Выявлено, что сорбционная емкость хитин-глюканового комплекса, выделенного из биомассы *Aspergillus niger* – отхода производства лимонной кислоты, к шестивалентному хрому составила 4,4 мкг/г. Концентрация хрома в пробах после сорбции уменьшилась на 91%.

Исследование показало, что сорбционная способность хитин-глюканового комплекса в значительной степени зависит как от уровня влажности биомассы, так и количества этапов кислотного-щелочного гидролиза. У полученных образцов хитин-глюканового комплекса, высушенных при +20 °С, с уменьшением влажности наблюдается заметное уменьшение сорбирующей способности. Четырехступенчатая схема выделения хитин-глюканового комплекса способствует полному его отбеливанию и значительному увеличению его адсорбционной активности.

Анализ аккумуляции ионов кальция и магния хитин-глюкановым комплексом, полученным путем кислотного-щелочного гидролиза из отхода производства лимонной кислоты – биомассы *Aspergillus*

lus niger Б-1 показал, что общее содержание ионов кальция и магния (общая жесткость) существенно уменьшилось во всех исследуемых пробах воды, что противоречит некоторым литературным данным о сорбционной способности хитин-глюканового комплекса к биогенным элементам.

Выявлена высокая сорбционная емкость хитин-глюканового комплекса, выделенного из биомассы *Aspergillus niger* – отхода производства лимонной кислоты, к шестивалентному хрому, что может способствовать разработке сорбционного метода удаления соединений шестивалентного хрома с помощью хитин-глюканового комплекса в природных и сточных водах.

Литература

1. Щербин А. А. Антацидные и сорбционные свойства грибного порошка из вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) // Вопросы питания. – 1999. – Т. 68, № 5–6. – С. 23–25.
2. Захарова, В. И. Очистка промышленных сточных вод от тяжелых цветных металлов с помощью биосорбентов // Прикл. биохим. и микробиол. – 2001. – Т. 37. – № 4. – С. 405–412.
3. Форстер, К. Ф. Экологическая биотехнология / К. Ф. Форстер. – Ленинград: Химия, 1990. – 384 с.
4. Котляр, М. Н. Методы выделения и модификации хитин-глюканового комплекса из биомассы *Aspergillus niger*: автореф. дис. ... канд. техн. наук: 03.00.23 / М.Н. Котляр; Казанский госуд. техн. ун-т. – Казань, 2001. – 23с.
5. Кречетов, А. А. Физико-химические свойства хитин-глюкановых комплексов из биомассы грибов *Aspergillus niger*: автореф. дис. ... канд. х. наук: 02.00.04 / А. А. Кречетов; Марийский госуд. ун-т. – Йошкар-Ола, 2002. – 17с.
6. Уголь активный осветляющий древесный порошкообразный: ГОСТ 4453-74. – Введ. 01.01.76. – Москва: Издательство стандартов, 1976. – 19 с.
7. Методические указания. Методика выполнения измерений массовой концентрации хрома (VI) в водах фотометрическим методом с дифенилкарбазидом: РД 52.24.446-95. – Введ. 21.07.1995. – Москва: Росгидромет, 1995. – 16 с.
8. Лурье, Ю. Ю. Химический анализ производственных сточных вод / Ю. Ю. Лурье. – Москва: Химия, 1974. – 336 с.
9. Baldrian, P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi // Enzyme and Microbial technology – 2003. – Vol. 32. – P. 78–91.
10. Yalcinkaya, Y. Biosorption of cadmium from aquatic systems by carboxymethylcellulose and immobilized *Trametes versicolor*. // Hydrometallurgy. – 2002. – Vol. 63. – P. 31–40.
11. Pethkar, A. Recovery gold from solution using *Cladosporium cladosporioides* biomass beans // J. Biotechnol. – 1998. – Vol. 63, № 2. – P. 121–136.
12. Vianna, L. Screening of waste biomass from *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* and *Bacillus lentus* fermentation for removal of Cu, Zn and Cd by biosorption // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – Vol. 1. – P. 437–440.

O. V. Pavlova

SORPTION CAPACITY OF CHITIN-CONTAINING COMPLEXES ISOLATED FROM BIOMASS WASTE PRODUCER OF CITRIC ACID

The possibility of recycling of waste microbiological synthesis of citric acid - biomass producing Aspergillus niger. Sequential acid-alkaline hydrolysis of biomass Aspergillus niger isolated chitin- glucan complex and investigated its sorption capacity. For characteristics and comparative analysis of the sorption of the prepared samples of chitin- glucan complex, the following indicators: the adsorption activity (sorption capacity), the distribution coefficient and surface area. Sorption capacity chitin-glucan complex largely depends on the humidity level of biomass and the number of stages of the acid-base hydrolysis.