

# Hitin - priprava i primjena

---

Terihaj, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:233282>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI PREDIPLOMKI STUDIJ**

**Lucija Terihaj**  
**ZAVRŠNI RAD**

**Zagreb, rujan 2020.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja **Lucija Terihaj** \_\_\_\_\_

Predala je izraden završni rad dana: 8. rujna 2020.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki, Fakultet kemijskog  
inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu  
Izv. prof. dr. sc. Vanja Kosar, Fakultet kemijskog inženjerstva i  
tehnologije, Sveučilište u Zagrebu  
Doc. dr. sc. Zvonimir Katančić, Fakultet kemijskog inženjerstva i  
tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred  
povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 11. rujna 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEIMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDIPLOMSKI STUDIJ

Lucija Terihaj

*Hitin – priprava i primjena*

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

Članovi ispitnog povjerenstva: prof.dr.sc. Ana Vrsalović Presečki

izv.prof.dr.sc. Vanja Kosar

doc.dr.sc. Zvonimir Katančić

Zagreb, rujan 2020.

### *Zahvala*

*Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki na predloženoj temi, stručnom vodstvu i savjetima te pomoći prilikom izrade završnog rada.*

*Zahvaljujem se roditeljima koji su uvijek bili uz mene i pružali mi pomoć i podršku tijekom cijelog školovanja.*

*Također zahvaljujem i svim mojim kolegama i prijateljima zbog kojih je studiranje bilo lakše i zabavnije*

## SAŽETAK

### *Hitin- priprava i primjena*

S porastom svijesti o zaštiti okoliša sve se više okrećemo prirodnim izvorima energije i prirodnim materijalima. Veliku važnost u tome imaju biopolimeri koji su potpuno razgradivi u prirodi. Jedan od važnijih biopolimera je hitin koji je po zastupljenosti na drugom mjestu nakon celuloze. Kod prerade morskih plodova nastaju velike količine otpada koje se zbog nedostatka prostora za skladištenje bacaju u more i time ga onečišćuju. Kako je hitin glavna komponenta skeleta rakova, morski otpad rakova se prerađuje time čime se dobiva hitin koji je nemoguće kemijski sintetizirati. Hitin se može ekstrahirati kemijskom i biološkom ekstrakcijom te je u ovom radu dana usporedba između ove dvije metode. Primjena tako dobivenog komercijalnog hitina je široka zbog mnogobrojnih pozitivnih svojstva hitina.

**Ključne riječi:** biopolimeri, hitin, hitozan, deprotonizacija, demineralizacija

## **ABSTRACT**

### *Chitin – preparation and uses*

With the growing awareness of environmental protection, we are turning to natural sources of energy and material. Biopolymers have great importance in that. Chitin is considered important marine renewable source due to his high availability as waste from the seafood processing industry. Chitin can be extracted by chemical or biological extraction which are shown in this work. This purified chitin has a wide range of application due to his numerous positive properties.

**Key words:** biopolymers, chitin, chitosan, demineralization, deproteination

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. BIOPOLIMERI.....	2
3. HITIN.....	6
4. PRPREMA HITINA .....	9
4.1 KEMIJSKA PRIPRAVA HITINA.....	11
4.2 BIOLOŠKA PRIPRAVA HITINA .....	12
4.3 PRIKAZ ZNANSTVENOG ISTRAŽIVANJA KEMIJSKE I BIOLOŠKE PRIPRAVE HITINA .....	15
5. PRIMJENA HITINA .....	24
6. ZAKLJUČAK .....	27
7. LITERATURA .....	28
8. ŽIVOTOPIS .....	30



## 1. UVOD

Globalno zatopljenje, zagađenje zraka i iscrpljivanje prirodnih resursa je uzrokovalo mnoge ekološke katastrofe i zbog toga se sve više potiče upotreba organskih proizvoda odnosno polimera dobivenih iz obnovljivih izvora.<sup>[1]</sup>

Svijet se godinama oslanjao na sintetičku plastiku no kako su se pojavile neželjene posljedice korištenja iste sve veći naglasak se stavlja na razvoj biorazgradivih polimera koji predstavljaju novije područje u znanosti polimera i polimernih tehnika koji nalaze široku primjenu. Biopolimeri su lančane molekule različite duljine građene od ponavljajućih jedinica monomera. Grade ih polisaharidi, proteini i nukleinske kiseline koji određuju karakteristike biopolimera poput krutosti, čvrstoće, elastičnosti i žilavosti. Stajanjem u prirodi se razgrađuju na neškodljive proizvode procesom biorazgradnje. Biorazgradnja je prirodan proces u kojem se organske kemikalije u okolišu pretvaraju u jednostavnije spojeve, mineralizirane i preraspodijeljene kroz elementarne cikluse kao što su kružni ciklus ugljika, dušika i sumpora u prirodi. Oni su kao takvi pogodni za široku upotrebu u svakodnevnom životu. Kako se sve više radi na njihovom istraživanju do danas su otkriveni mnogi materijali proizvedeni od biopolimera koji imaju željena svojstva kao što su osjetljivost na vlagu, čvrstoće i elastičnost.<sup>[2]</sup>

Uz celulozu koja je prisutna u biljkama je najčešći biopolimer hitin koji je prisutan u ljuskama rakova, micelama gljiva i kukcima. Glavni izvor industrijskog hitina je morski otpad ostao nakon prerade morske hrane (škampi, jastozi, kozice). 40% mase otpada je hitin dok ostatak odlazi na proteine i minerale. Većina tog otpada se baca u more što je jedan od glavnih izvora zagađenja u obalnim područjima, te bi iz tog razloga korištenje otpada za proizvodnju hitina moglo biti rješenje ekoloških problema i alternativa zbrinjavanju morskog otpada.<sup>[15]</sup> Iz otpada se hitin dobiva biološkom i kemijskom ekstrakcijom i tako dobiven hitin je u širokoj upotrebi u mnogim sektorima kao što su biomedicina, biotehnologija, prehrambena industrija, veterinarska industrija i drugi.<sup>[1]</sup>

## 2. BIOPOLIMERI

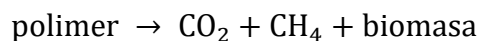
Prirodni polimeri ili biopolimeri su vrsta polimera koja nastaje u živim organizmima ili se kemijski sintetiziraju iz bioloških sirovina kao što su šećer, škrob, prirodne masti i ulja.<sup>[4]</sup> Prirodnim polimerima odnosno biopolimerima smatraju se makromolekulski spojevi, molekulske mase od nekoliko tisuća do nekoliko stotina tisuća, koji se u prirodi nalaze kao dijelovi biljnih ili životinjskih tkiva. To su polimeri koji se razgrađuju u bezopasne, jednostavne neškodljive proizvode u biološkoj okolini, tlu, moru, vodi, ljudskom ili životinjskom tijelu. Takav prirodni tok razgrađivanja naziva se biorazgradnja.<sup>[4]</sup> U prirodne makromolekule spadaju polinukleotidi tj. deoksiribonukleinska kiselina (DNA) i ribonukleinska kiselina (RNA), međutim ne smatraju se polimernim materijalima u pravom smislu jer osim funkcije u živim organizmima nemaju nikakvu primjenu.<sup>[3]</sup>

Biorazgradnja je razgradnja izazvana enzimskim djelovanjem mikroorganizama, gljivica ili bakterija pri čemu se organske tvari u okolišu pretvaraju u jednostavne spojeve (biomasu, ugljični dioksid i vodu ili metan) tj. bitno im se mijenja kemijska struktura. Biorazgradnja može biti u prisutnosti kisika (aerobna) ili u odsutnosti kisika (anaerobna).<sup>[4]</sup>

Aerobna razgradnja:



Anaerobna razgradnja:



Biorazgradnja je značajna za zaštitu okoliša. Uz dovoljno vremena svaki biopolimerni materijal će postati kompost. Na brzinu biorazgradnje utječu faktori okoliša i značajke polimernog materijala (struktura, morfologija, kristaličnost, funkcionalnost, topljivost i molekulska masa).<sup>[3]</sup>

### Struktura biopolimera

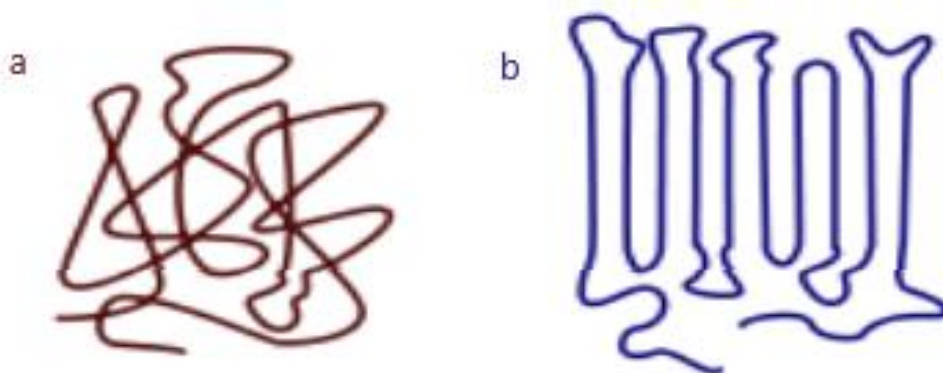
Strukturu polimera čine kemijski sastav, veličina molekula, konfiguracija, konformacija i nadmolekulska struktura. Osnovne konstitucijske jedinice prirodnih polimera su složenije nego kod sintetskih i od tuda proizlazi njihova kompleksnija građa. Konfiguracija polimera opisuje prostorni razmještaj atoma ili atomskih grupa u ponavljanoj jedinici. Postoje dvije konfiguracijske strukture, a to su struktura "glava-glava" koja je češća i struktura "glava-glava" odnosno "rep-rep". Konformacija polimera predstavlja prostorni raspored atoma ili skupine atoma nastao rotacijom oko jednostruke veze između ugljikovih atoma. Svaka

makromolekula nastoji postići oblik s minimalnom potencijalnom energijom. Do promjena u konformaciji dolazi zbog utjecaja temperature ili djelovanja mehaničke sile. Neki od najčešćih konformacijskih oblika su: cik-cak konformacija, spiralna konformacija te statističko klupko.<sup>[3]</sup>

Polimeri mogu imati različite nadmolekulske strukture, različitih stupnjeva središtenosti. Nadmolekulska struktura je rezultat postojanja intermolekularnih veza. Dva oblika nadmolekulske strukture su amorfna i kristalna struktura.<sup>[3]</sup>

Kod amorfni polimera ne postoji središtenost tj. amorfna struktura predstavlja nesređena područja u strukturi. To su polimeri bez trodimenzijske kristalne središtenosti.<sup>[5]</sup> Karakterizira ih skup međusobno gusto isprepletenih makromolekula. Amorfni polimeri nemaju pravo talište nego se tale unutar određenog temperaturnog intervala i pri sobnoj temperaturi se nalaze u staklastom stanju.<sup>[3]</sup>

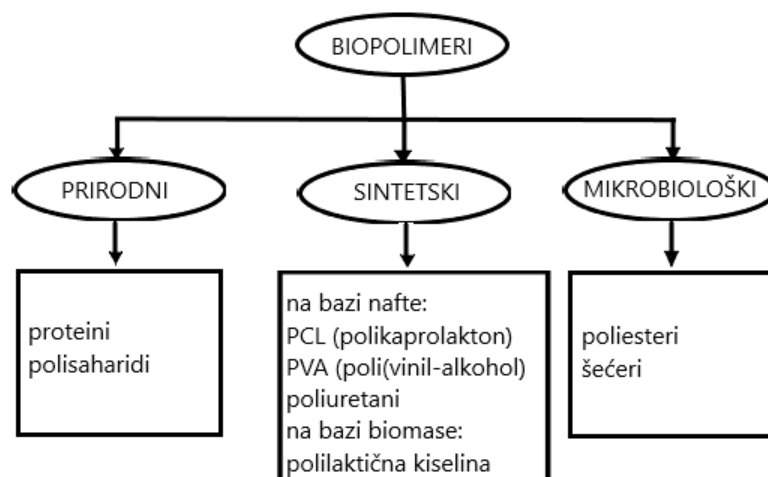
Kristalasti polimeri su polimeri s djelomično sređenom strukturom. To nije potpuno sređena struktura već se sastoji od kristalnih područja u amorfnoj strukturi. Takva struktura omogućuje boja mehanička i fizikalna svojstva u odnosu na amorfne polimere. S povećanjem duljine lanca kristalnost raste dok se sa povećanjem stupnja grananja smanjuje. Vidimo da na stupanj kristalnosti uz intermolekulske veze utječu i duljina te grananje lanca.<sup>[3]</sup> Na slici 1. je prikazana amorfna i kristalna struktura polimera.<sup>[6]</sup>



**Slika 1.** Amorfna (a) i kristalna (b) struktura polimera<sup>[6]</sup>

### Podjela biopolimera

Biopolimeri se mogu podijeliti na više načina. Jedan od njih je ovisno o njihovom podrijetlu, pri čemu se dijele na prirodne, sintetske i mikrobiološke, slika 2.<sup>[4]</sup>



**Slika 3.** Podjela polimera ovisno o podrijetlu <sup>[7]</sup>

Prirodni biopolimeri se dobivaju od biljaka, morskih i domaćih životinja. To su polisaharidi i proteini koji imaju dobra barijerna svojstva za plinove ali su veoma hidrofilni.<sup>[4]</sup>

Sintetski biopolimeri su proizvedeni kemijskim sintezama od biomonomera. Kemijskom sintezom moguće je dobiti veliki broj biopoliestera. Jedan od najpoznatijih sintetskih biopolimera je polilaktid (PLA). Monomer ove kiseline je mliječna kiselina (etanska kiselina) koja se lako dobije fermentacijom bakterija mliječne kiseline korištenjem ugljikohidrata kao supstrata. Kao ugljikohidrati se koriste kukuruz, pšenica, šećerni sirup i drugi.<sup>[4]</sup>

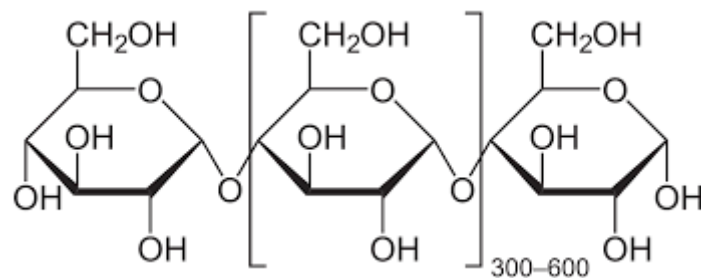
Mikrobiološki biopolimeri su polimeri dobiveni direktno iz prirodnih organizama. Akumuliraju ih mnoge bakterije kao izvor energije i kao rezerve ugljikohidrata. Njihove osobine su povezane s osobinama monomera od kojih su izgrađeni što omogućuje široku lepezu različitih biopolimera koji se sintetiziraju mikrobiološkom fermentacijom.<sup>[4]</sup>

Druga podjela biopolimera je s obzirom na osnovne monomerne građevne jedinice prema kojoj se polimeri mogu svrstati u nekoliko glavnih grupa:

- a) Polisaharidi
- b) Lignini
- c) Proteini
- d) Prirodne kaučuk
- e) Prirodne smole

Polisaharidi su ugljikohidrati veće molekulske mase i složenije građe koji se sastoje od velikog broja monosaharida povezanih glikozidnom vezom. Osnovna građevna jedinica je glukoza i oni su najrašireniji u živoj prirodi. Najvažniji biopolimeri ove skupine su škrob, celuloza i hitin. <sup>[4]</sup>

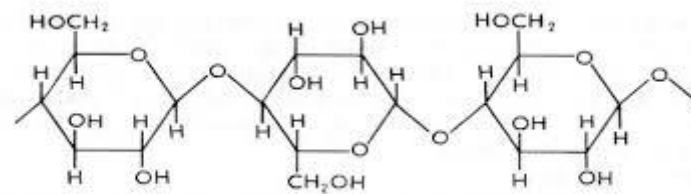
Škrob je uz celulozu najvažniji u grupi prirodnih polimera. On je rezervna hrana u biljkama, fini prah. Građen je od najmanje 10000 međusobno povezanih molekula (jedinica) D-glukoze povezanih  $\alpha$ -1,4-glikozidnom vezom. <sup>[8]</sup>



**Slika 4.** Strukturna formula škroba <sup>[9]</sup>

Škrob se potpuno razgrađuje u glukozu. Dobivamo ga izoliranjem iz biljaka gdje je uglavnom građen od amiloze i amilopektina. Upotrebljava se u industriji papira i tekstila, prehrambenoj industriji i za dobivanje sintetskih polimera. <sup>[8]</sup>

Celuloza se nalazi u biljkama kao što su pamuk, lan, juta i razno drveće. Vrlo je slična škrobu jer su građeni od iste monomerne jedinice. Kod celuloze je svaka glukozna jedinica zarotirana za 180° oko osi osnovnog lanca i u odnosu na zadnju ponavljajuću jedinicu. <sup>[8]</sup>



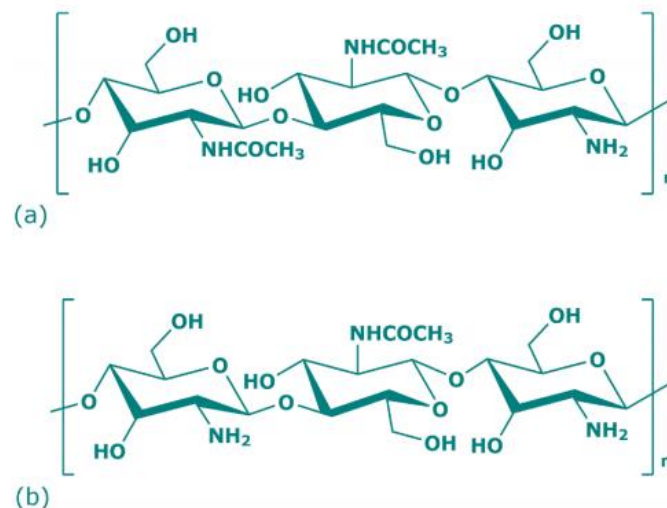
**Slika 5.** Strukturna formula celuloze <sup>[10]</sup>

Celuloza ima znato bolja mehanička svojstva od škroba i zato se čisti škrob ne upotrebljava kao materijal dok je celuloza jaka i iz nje se izrađuju vlakna za odjeću i konopci za papir. <sup>[8]</sup>

### 3. HITIN

Prvo otkriće hitina bilo je 1799. godine kad je Charles Hatcett radio dekalifikaciju ljuski rakova te je zabilježio da je pronašao novu tvar otpornu na uobičajene kemikalije. Tada nije znao da je to hitin i nije radio daljnja istraživanja. Nekoliko godina kasnije točnije 1811. godine Henri Braconnot proučavajući gljive pronašao je novu tvar koju je nazvao "fungine". 1823. je istu tvar izolirao Augustine Odier i nazvao ju hitin te je to ime zadržala i danas. <sup>[11]</sup>

Hitin je prirodni polisaharid izoliran iz mnogih živih organizama, on je drugi najbrojniji polimer ugljikovih spojeva nakon celuloze. Hitin za razliku od celuloze na drugom ugljikovom atomu umjesto hidroksidne grupe ima acetamidnu grupu ( $\text{CH}_3\text{CONH}_2$ ). On je linearni polisaharid sastavljen od dugih nizova 2 -acetamido – 2 deoksi –  $\beta$  – D glukana (N-acetil D – glukozamin) povezanih  $\beta$  (1 – 4) glikozidnom vezom. <sup>[6]</sup> Njegova opća formula je  $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5$ , a do te strukture je došao George Ledderhasen 1895. godine kada je proučavao hidrolizu hitina koncentriranom klorovodičnom kiselinom. Hitozan je deacilirani derivat hitina koji čini vanjsku ovojnica člankonožaca. Prvi ga je otkrio Charles Rouget 1859. godine. Hitozan je linearni polisaharid koji se sastoji od nasumično povezanih od D –glukozamina i N-acetil-D-glukozamina  $\beta$ (1 – 4) vezama ovisno o stupnju deacetilacije polimera. <sup>[12]</sup> Na slici 5. su prikazane strukture hitina (a) i hitozana (b).



**Slika 6.** Struktura hitina (a) i hitozana (b) <sup>[1]</sup>

Hitin u prirodi dolazi u tri alotropske modifikacije  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  hitin. Oni se mogu identificirati raznim tehnikama od kojih su neke infracrvena spektroskopija, NMR spektroskopija i rendgenska difrakcija. Najčešći od ove tri modifikacije je  $\alpha$ -hitin koji je prisutan u gljivama, kvascima, jastozima, rakovima, škampima i insektima.  $\beta$ -hitin nalazimo u unutarnjim dijelovima tijela glavonožaca dok je  $\gamma$ -hitin prisutan kod nekih insekata i lignji.

Glavna razlika između ove tri modifikacije je u njihovoj strukturi.  $\alpha$ -hitin je ortorompski kristalni sustav unutar kojeg se nalaze antiparalelni lanci molekula.  $\beta$ -hitin je za razliku od  $\alpha$ -hitina monoklinski sustav s paralelnim lancima, dok  $\gamma$ -hitin ima nasumičan raspored lanaca. Lance unutar  $\alpha$  i  $\beta$  hitina na mjestu drže intramolekularne vodikove veze. Kod  $\alpha$ -hitina su uz intramolekularne prisutne i intermolekularne vodikove veze, te vanjske vodikove veze koje sprečavaju difuziju malih molekula u kristalnu strukturu  $\alpha$ -hitina. Tih veza nema kod  $\beta$ -hitina i zato on bubri u blizini polarnih molekula koje prodiru unutar molekule. To omogućava kontroliranje topljivosti, bubrenja i reaktivnosti  $\beta$ -hitina. Bez obzira na to alotropske modifikacije su i dalje netopljive u uobičajenim otapalima. <sup>[13]</sup>

#### Fizikalna i kemijska svojstva hitina

Stupanj deacetilacije je udio monomera glukozamina u strukturi hitina. Ima velik utjecaj na topljivost hitina. Ako je stupanj deacetilacije preko 50% hitin postaje topljiv u octenoj kiselini i njegova struktura prelazi u strukturu hitozana. Stupanj deacetilacije može se odrediti brojnim tehnikama kao što su UV spektroskopija, IR spektroskopija, H-NMR, titracijom i drugima. <sup>[1]</sup>

Molarna masa hitina ovisi o njegovu porijeklu i povezana je s metodom dekalifikacije hitina s klorovodičnom kiselinom. Molarna masa se može odrediti tekućinskom kromatografijom i mjerenjem viskoznosti. Dobivena molarna masa hitina je u rasponu od 0,4 do  $2,4 \times 10^6$ . <sup>[1]</sup>

Topljivost hitina također ovisi o porijeklu hitina. On je netopljiv u vodenom mediju jer acetilirane amino grupe stvaraju vodikove veze koje sprječavaju bubrenje i otapanje. Kako je hitin blago lužnat to svojstvo mu omogućava topljivost u raznim drugim medijima. <sup>[1]</sup>

#### Biološka svojstva hitina

Hitin i hitozan pokazuju dobra antimikrobna djelovanja za bakterije, gljivice i kvasce. Uz to imaju i dobro antioksidativno i protutumorno djelovanje. <sup>[12]</sup>

Mehanizam antibakterijskog i antigljivičnog djelovanja nije još u potpunosti poznat ali su predstavljene različite hipoteze. Jedan od uzroka takvog djelovanja može biti povezan s formiranjem nepropusnog sloja nastalog umrežavanjem polisaharida koju su po prirodi polikationi i negativno nabijene stanične površine pri pH nižim od 6,5. Ovaj sloj bi spriječio unos hranjivih tvari u bakterijske stanice što dovodi do smrti mikroorganizama. Drugi mehanizam uzima u obzir svojstva kelatnih tvari kakve su hitin i hitozan i njihov utjecaj na

rast mikroorganizama. Treći mehanizam povezuje se s lakim prodiranjem hitozana s malom molekulskom masom kroz stanične stijenke bakterije i njegovo vezanje na deoksiribonukleinsku kiselinu (DNA) pri čemu se inhibira sinteza ribonukleinske kiseline (RNA) i proteina. Niska molekulska masa i visoki stupanj deacetilacije pojačavaju antibakterijsko djelovanje hitozana uz poboljšanje permeabilnosti i bolje elektrostatsko vezanje na membranu bakterija. <sup>[1]</sup>

Antioksidativno djelovanje hitina i hitozana te drugih derivata hitina se povezuje s njihovom sposobnosti uklanjanja kisikovi radikala različitih komponenti poput alkilnih i hidroksilnih spojeva, te superoksida. Ni ovaj mehanizam još nije potpuno razjašnjen no trebao bi biti povezan s kelacijom slobodnih metalnih iona polisaharidnim, hidroksidnim i amino grupama što dovodi do stvaranja stabilnog sustava. Pokazalo se da visok stupanj deacetilacije zajedno s niskom molekulskom masom pogoduje učinkovitijem antioksidativnom djelovanju. <sup>[1]</sup>

Glavna komponenta sluzi je mucin, glikoprotein bogat negativnim nabojem koji reagira s pozitivnim nabojem hitozana. Studije su pokazale da fizikalne i kemijske karakteristike hitozana pogoduju poboljšanju mukoadhezivnih svojstva pretežito povezanih sa stupnjem deacetilacije i molekulskom masom. Za razliku od antioksidativnog i antimikrobnog djelovanja ovdje dolazi do poboljšanja mukoadhezivnih svojstva kada je korišten polisaharid s visokim stupnjem deacetilacije i velikom molekulskom masom. <sup>[1]</sup>



#### 4. PRPREMA HITINA

Glavni izvor hitina je iz morskih izvora otpad rakova, škampi, jastoga koji je zaostao nakon njihove obrade. Oni su važne sirovine jer su lako dostupne u velikim količinama. Hitin se u njima nalazi kao dio složene strukturne mreže koju čini s proteinima na koje se veže kalcijev karbonat kako bi se formirala ljuska. Ona se sastoji od hitina (15 – 40%), proteina (20 – 40%), kalcijeva karbonata (20 – 50%), pigmentata i lipida.<sup>[14]</sup>

Alternativni izvor hitina su gljive. Gljive sadrže manji postotak hitina ali je njihova prednost to što nisu sezonski ograničene i ne zahtijevaju agresivan tretman kiselinom i lužinom za pročišćavanje i demineralizaciju. Kod gljiva je struktura hitina dopunjena fleksibilnijim  $\beta$ -glukanom. Glavna razlika između ova dva hitina je u tome što je hitin iz morskih izvora povezan s proteinima i mineralima, a hitin iz gljiva s drugim polisaharidima kao što je glukan koji se može pojaviti u većim količinama unutar samog hitina. Procesi ekstrakcije hitina iz oba izvora su vrlo slični te oba zahtijevaju da je početni materijal koji je kod gljiva biomasa, a kod morskih izvora ljuske rakova opran i smrvljen (homogeniziran). Kod gljiva nije potreban korak demineralizacije jakim kiselinama, a deproteinizacija se izvodi na isti način.<sup>[15]</sup>

Ekstrakcija hitina je najvažniji korak dobivanja hitina iz morskih izvora. To je zato jer koraci ekstrakcije diktiraju svojstva konačnog produkta kao što su čvrstoća, stupanj deacetilacije i molarna masa koja kasnije utječu na primjenu hitina. Metode ekstrakcije bi trebale biti jednostavne, ekološke i ekonomski isplative. Postoje kemijska i biološka ekstrakcija hitina i obje se sastoje od dva glavna koraka deproteinizacije i demineralizacije dok je treći korak izbjeljivanje odnosno uklanjanje pigmenta. Prije postupka izolacije hitina i kod kemijske i kod biološke ekstrakcije potrebno je odabrati ljuske koje će se koristiti. Idealno bi bilo kad bi one bile od iste vrste i jednake veličine što nije uvijek moguće. Nakon odabira ljuske se ispiru, suše i melju na sitne komadiće kako bi se smjesa homogenizirala.<sup>[16]</sup>

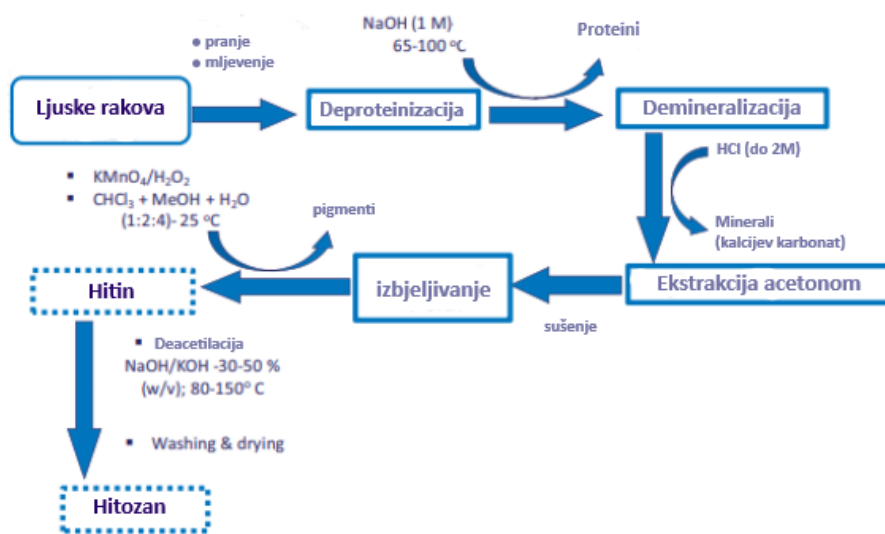
U tablici 1. su prikazane usporedbe između kemijske i biološke i kemijske proizvodnje hitina, zajedno s njihovim prednostima i manama.<sup>[16]</sup>

**Tablica 1.** Usporedba kemijske i biološke metode pripreme hitina<sup>[16]</sup>

Metoda ekstrakcije	Kemijska metoda	Biološka metoda
Parameti	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Demineralizacija s koncentriranim kiselinama(HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COOH i HCOOH</li> <li>-Deproteinizacija s NaOH kod temperature do 160°C trajanja do 72 sata</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Demineralizacija potaknuta dodatkom bakterija koje stvaraju mliječnu kiselinu</li> <li>-Deproteinizacija dodatkom proteolitičkih bakterija</li> </ul>
Prednosti i mane	<ul style="list-style-type: none"> <li>-dobra za komercijalnu proizvodnju hitina</li> <li>-loša za okoliš zbog velike količine otpada koji nastaje</li> <li>-skup i kompliciran proces</li> <li>-teško je odvojiti nusprodukte zbog koncentrirane kiseline i lužine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-dobra za okoliš jer nemamo velikih količina otpada</li> <li>-proces je ograničen na istraživanja u laboratoriju</li> </ul>
Kvaliteta ekstrahiranog hitina i druge karakteristike	<ul style="list-style-type: none"> <li>-nestalan stupanj acetilacije i velika molarna masa koji negativno utječu na svojstva pročišćenog hitina</li> <li>-omogućava gotovo potpuno uklanjanje organskih soli no pri tome može doći do reakcija deacetilacije i depolimerizacije</li> <li>-tretman otpadnih voda koje sadrže kiselinu i lužinu može povećati troškove proizvodnje</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-homogen i kvalitetan konačni produkt</li> <li>-trošak proizvodnje se može smanjiti ako se koristi otpadna biomasa kao izvor ugljika</li> <li>-otopljeni proteini i minerali se mogu koristiti u prehrani životinja i ljudi</li> </ul>

#### 4.1 KEMIJSKA PRIPRAVA HITINA

Kako su izvori hitina složene konfiguracije s drugim komponentama (mineralima i proteinima) potrebni su različiti postupci kako bi se iz hitinskog materijala dobio hitin, a zatim hitozan. Pigmenti kao što su melanin i karotenoidi se uklanjaju s 0,02M  $\text{KMnO}_4$  pri  $60^\circ\text{C}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NaClO}$  ili smjesom organskih kiselina. <sup>[14]</sup> Na slici 6. je prikazana shema kemijske pripreve hitina.



Slika 7. Kemijska ekstrakcija hitina<sup>[16]</sup>

Deproteinizacija se provodi kako bi se uklonili proteini iz ljuske rakova, to je posebno bitno kod pripreve hitina za korištenje u biomedicini jer su proteini glavni krivac alergija na morske plodove koje se često javljaju kod ljudi. Kao reagens za deproteinizaciju se koriste razne kemikalija od kojih su neke  $\text{NaOH}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{KOH}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{NaHSO}_3$ ,  $\text{CaHSO}_3$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  i druge. Najčešća za deproteinizaciju se primjenjuje  $\text{NaOH}$  u rasponu koncentracija od 0,125M do 5M, pri temperaturi do  $160^\circ\text{C}$  uz različito trajanje tretmana. Kao negativan rezultat upotrebe  $\text{NaOH}$  je to što uvijek dolazi do djelomičnog deacetiliranja hitina i do smanjenja njegove molarne mase.<sup>[13]</sup>

Demineralizacija se sastoji od uklanjanja minerala, najvećim djelom kalcijeva karbonata. Demineralizacija se provodi tretiranjem raznim kiselinama od kojih su neke  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  i  $\text{HCOOH}$ . Među njima je za demineralizaciju najčešća

klorovodična kiselina. Kako udio kalcijeva karbonat varira između vrsta rakova i uvjeta rasta razlikuju se i količine korištene kiseline. Negativne posljedice demineralizacije su depolimerizacija i deacetilacija kako bi te posljedice prevladali koriste se blage kiseline kakve preferira ovaj proces.<sup>[14]</sup> Reakcijom s klorovodičnom kiselinom dolazi do razgradnje kalcijeva karbonata na kalcijev klorid koji je u vodi topiva sol i na plin ugljikov (IV) oksid prema reakciji:



Nakon otapanja se u vodi topiva sol lako odvoji filtracijom. Kako bi se pospješilo otapanje i otopili svi minerali kiselina se dodaje u većim koncentracijama ili većem volumenu<sup>[13]</sup>

Postoje tehnike intenziviranja procesa. Jedna od takvih tehnika je ultrazvučni potpomognuta ekstrakcija koja poboljšava proces deproteinizacije jer dolazi do pucanja vodikovih veza između proteina i hitina. No kod visokih intenziteta dolazi i do depolimerizacije hitina te se s trajanjem smanjuje njegova kristaličnost. Prednost ove tehnike je što se postiže visoki stupanj demineralizacije i deproteinizacije bez korištenja velikih količina kiseline i lužine. Druga tehnika intenziviranja procesa je tehnika zračenja mikrovalovima gdje hitin dobiven ovom metodom ima ista fizikalno kemijska svojstva kao polimer dobiven uobičajenom kemijskom tehnikom. Ova tehnika je brža i učinkovitija od standardne jer daje bolju kvalitetu hitina bez promjene njegovih fizikalno kemijskih svojstva. No kako su ove metode tek u početnoj fazi istraživanja treba uzeti u obzir da može doći do odstupanja od ovih teza.<sup>[14]</sup>

## 4.2 BIOLOŠKA PRIPRAVA HITINA

Kemijska ekstrakcija hitina ima više mana od kojih su najznačajnije to što se mijenjaju fizikalno kemijska svojstva hitina odnosno dolazi do smanjenja molarne mase i povećanja stupnja deacetilacije, nastaju velike količine otpadnih voda koje sadrže kemikalije i povećavaju se troškovi procesa pročišćivanja hitina. Biološka ekstrakcija je bolja od kemijske zato što čuva strukturu hitina, nudi visoku obnovljivost u kratkom vremenu, potrebno je manje energije za izvođenje procesa i stvara se manje otpada u odnosu na kemijski proces.<sup>[17]</sup>

Preferiraju se dvije metode bioekstrakcije, a to je kombinacija upotrebe proteolitičkih enzima za razgradnju proteina i kemijske metode demineralizacije i fermentacija korištenjem bakterija mliječnih kiselina i proteolitičkih bakterija (Slika 7).<sup>[1]</sup>

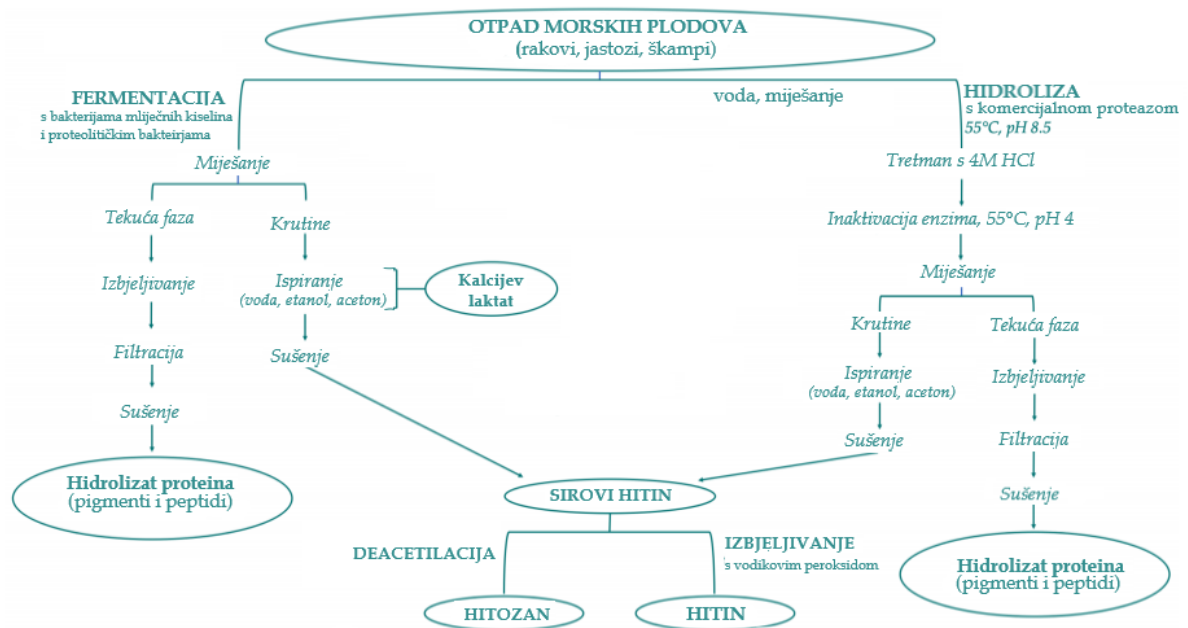
Ekstrakcija hitina zahtjeva korištenje proteaze jer mnoge proteaze uklanjaju proteine iz ljuski rakova i minimaliziraju deacetilaciju i depolimerizaciju tijekom ekstrakcije hitina. Za ovaj postupak se većinom koriste sirove proteaze razlog tome je to što su pročišćene proteaze vrlo skupe i zato što su u neprerađenom obliku učinkovitije. Proteaze se nabavljaju iz otpada riba čime se dodatno smanjuje zagađenje okoliša. Učinkovitost ove enzimske metode je 10 – 15% manje u odnosu na kemijski proces zbog zaostalog proteina koji je i dalje povezan s hitinom. Kod ovog postupka je potrebno prvo provesti demineralizaciju kako bi se povećala propusnost i smanjilo prisustvo potencijalnih inhibitora enzima čime se pospješuje djelovanje proteolitičkih enzima. <sup>[9]</sup> Najčešće upotrebljavane proteaze su kimotripsin, papin, tripsin, subtilizin, pepsin i pankeratin. Krajnji produkt dobiven ovom metodom ima bolja fizikalno kemijska svojstva u odnosu na produkte dobivene drugim metodama.<sup>[1]</sup>

Trošak korištenja enzima se može smanjiti provedbom deprotonizacije fermentacijom koja se postiže mikroorganizmima. Fermentacija se može podijeliti u dvije kategorije na fermentaciju mliječnom kiselinom i fermentaciju bez mliječne kiseline.<sup>[17][14]</sup>

Fermentacija se može provesti dodavanjem laktobacila, bakterije koja stvara mliječnu kiselinu i proteazu. Mliječna kiselina se dobiva konverzijom glukoze što smanjuje pH i suzbija rast kvarljivih mikroorganizama. Mliječna kiselina zatim reagira s kalcijevim karbonatom i stvara talog kalcijev laktat koji je teži od ljuska rakova koje se zatim odvajaju i ispiru s vodom. Te organske soli dobivene demineralizacijom se mogu koristiti kao sredstva protiv zamrzavanja i/ili konzervansi. Deproteinizacija i istovremeno ukapljivanje može biti provedeno pod djelovanjem proteaze ili bakterija. Rezultat deprotonizacije je prozirna kapljevina s velikim udjelom topljivih peptida i slobodnim amino kiselinama. Učinkovitost fermentacije mliječne kiseline ovisi o više faktora kao što je izvor ugljika i njegova koncentracija, početna pH vrijednost, promjena pH tijekom fermentacije, temperaturi i vremenu fermentacije.<sup>[13]</sup>

Kod fermentacije bez mliječne kiseline za fermentaciju se koriste i bakterije i gljivice. Istraživanja su pokazala da je hitin izoliran ovom metodom sličan komercijalnom  $\alpha$ -hitinu.<sup>[1]</sup> Biološke metode ekstrakcije hitina su jednostavnije, produktivnije i bolje za okoliš od kemijskih metoda. No fermentacija mikroorganizmima ima svojevrskih mana kao što je duže trajanje i lošiji pristup proteaza koje blokiraju minerali koji vode do proteina. Stopa deproteinizacije mogla bi se poboljšati, a to je moguće korištenjem dvofazne fermentacije i ko-fermentacije.<sup>[13]</sup>

Biološkim procesom proizvodnje nisu potpuno uklonjeni minerali i proteini. Kako bi se dobio hitin standardne kvalitete zaostali proteini i minerali mogu se ukloniti blagim kemijskim tretmanom. Produkt dobiven fermentacijom se tretira jako razrijeđenim otopinama klorovodične kiseline i natrijeva hidroksida kako bi se uklonili zaostali proteini i minerali. Ova kombinacija kemijskog i biološkog procesa je razumna i praktična uz prednosti za okoliš.<sup>[17]</sup> Na slici 7. je prikazana shema biološkog procesa proizvodnje hitina i hitozana.



**Slika 8.** Shema biološkog procesa proizvodnje hitina i hitozana<sup>[1]</sup>

Zasad je većina studija i metoda biološke pripreme hitina izvedena u laboratorijskim uvjetima te možda neće biti primjenjiva na industrijske uvijete. Tehnologija bioekstrakcije trebala bi se primjenjivati na velike količine biootpada dobivenog preradom morske hrane, trebala bi biti brza, jednostavna, ekološki prihvatljiva s malim odtokom otpadnih voda i potpunim regeneriranjem aditivnih sastojaka kao što su proteini, organske kiseline, karotenoidi, arome i druge dodane vrijednosti.<sup>[17]</sup>

Zadnji korak pripreme hitina kod obje i kemijske i biološke metode pripreme hitina je izbjeljivanje. Kako različite vrste rakova imaju različite karotenoide na površini ljuske njihova se boja razlikuje. Karotenoidi nisu uklonjeni procesima deprotonizacije i demineralizacije već se uklanjaju dodatkom različitih kemikalija kao što su aceton, kloroform,

etanol, etil-acetat i njihove kombinacije. Uz to se koriste i oksidirajuća sredstva kao što su vodikov peroksid i natrijev hipoklorit za izbjeljivanje prethodno obrađenog hitina. [14]

#### 4.3 PRIKAZ ZNANSTVENOG ISTRAŽIVANJA KEMIJSKE I BIOLOŠKE PRIPRAVE HITINA

U ovom radu je dan prikaz istraživanja kojeg su napravili Chakravarty J. i suradnika [18] U okviru rada su ekstrahirali hitin iz otpadnih ljusaka jastoga koristeći kemijske i biološke metode ekstrakcije hitina te su proveli karakterizaciju dobivenog hitina koristeći TGA, SEM i EDX analizu. [18]

Kao izvor hitina su koristili otpadnu ljusku jastoga koja je prethodno posušena, mljevena i prosijana te skladištena na sobnoj temperaturi do korištenja. Za biološku ekstrakciju hitina koristili su dvije bakterije koje proizvode proteazu *Bacillus megaterium* i *Serratia marcescens* te bakteriju koja proizvodi organsku tj. mliječnu kiselinu *Lactobacillus plantarum*. Svi mikroorganizmi su skladišteni u 20%-tnom glicerolu pri -80°C. [18]

Za analizu kemijskog sastava uzoraka korištene su razne metode kako bi se odredili različiti parametri. pH dobivenog supernatanta je određen pomoću potenciometra, a sadržaj pepela u ostacima ljuske je određen sagorijevanjem praha ljuske u električnoj peći na 500°C tijekom 4 sata te određivanjem njegove mase. [18]

Udio proteina je određen preko sadržaja nitrata koji su određivani metodom redukcije kadmija pri čemu nastaje obojenje koje se prati sekrofotometrijski. Sadržaj proteina u netretiranom uzorku smatran je bazom za računanje stupnja deproteinizacije. [18]

$$\text{Deproteinizacija (\%)} = \frac{(P_0 \times O) - (P_F \times F)}{P_0 \times O} \times 100 \quad (1)$$

Gdje su  $P_0$  i  $P_F$  koncentracije proteina u postocima prije i poslije tretmana,  $O$  i  $F$  su mase u gramima početnog uzorka i biološki tretiranog uzorka. Udio sadržaja kalcija je određen atomskom apsorpcijskom spektrofotometrijom i izračunat prema jednadžbi:

$$\text{Deminerilizacija (\%)} = \frac{(C_0 \times O) - (C_F \times F)}{C_0 \times O} \times 100 \quad (2)$$

$c_0$  i  $c_F$  predstavljaju sadržaj kalcija u početnom i biološki tretiranom uzorku. Sva mjerenja su provedena tri puta, a vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. [18]

Prinos hitina je izračunat preko jednadžbe:

$$\text{prinos hitina}(\%) = \frac{\text{dobiveni hitin (g)}}{\text{početna masa uzorka (g)}} \times 100 \quad (3)$$

Za biološku ekstrakciju je određivana i aktivnost proteaze, ona je određena koristeći kazein kao supstrat. Za tu svrhu uzet je alikvot od 0,5mL supernatanta i pomiješan s 0,5mL 0,1% (wv<sup>-1</sup>) kazeina u 100 mM kalijevom fosfatnom puferu (pH 7). Smjesa je inkubirana 10 minuta pri 40°C. Reakcija je završena dodavanjem 1mL 0,4M trikloroctene kiseline i ostavljena da stoji na 20 minuta na 40°C. Smjesa je zatim centrifugirana na 3619×g 5 minuta kako bi se uklonio talog. Alikvot od 0,5ml supernatanta je pomiješan s 2,5mL 0,5M natrijeva karbonata i 0,5mL 0,5M Folin-fenolnog reagensa i takva smjesa je inkubirana 20 minuta na 40°C. Standardna krivulja je izrađena koristeći otopinu L-tirozina u rasponu koncentracija od 0 do 100µgmL<sup>-1</sup>. [18]

Jedinica aktivnosti proteaze je definirana kao količina enzima potrebna za otpuštanje 1µmol L-tirozina po minuti. Aktivnost proteaze je određena iz najmanje dva odvojena mjerenja provedena u više ponavljanja s odstupanjima manjima od 5%. [18]

#### Kemijski tretman ljuske jastoga

Kod kemijskog tretmana je uklanjanje proteina postignuto tretiranjem oklopa jastoga s 1M NaOH u trajanju od 3 sata pri povišenim temperaturama (80 – 90°C) uz stalno miješanje i omjer krutina: otapalo 1:10 (wv<sup>-1</sup>). Demineralizacija je postignuta s 1M HCl u trajanju od 2 sata pri sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje i omjer krutina: otapalo 1:15 (wv<sup>-1</sup>). [18] U tablici 2. je prikazan kemijski sastav ljuske jastoga prije i poslije tretmana. [18]

**Tablica 2.** Kemijski sastav ljuske jastoga nakon kemijskog tretmana

Ljuske	Proteini (%)	Kalcij (%)	Deproteinizacija (%)	Demineralizacija (%)	Pepeli (%)	Prinos hitina (%)
Prije	23.54 ± 0.78	45.68 ± 0.34	-	-	12.17 ± 1.1	-
DP – DM	6.67 ± 0.98	4.26 ± 1.02	80.16 ± 0.56	92.54 ± 0.94	2.87 ± 0.83	75.4 ± 1.23
DM – DP	2.72 ± 1.2	5.09 ± 0.67	89.97 ± 0.87	91.54 ± 1.31	3.94 ± 0.48	89.8 ± 2.5

DP-DM = depolimerizaciju prati demineralizacija .DM-DP = demineralizaciju prati depolimerizacija

Rađena su dva postupka kako bi se utvrdilo koji je učinkovitiji. Kod prvog su prvo uklanjani proteini, a zatim minerali tj. deproteinizacija je prethodila demineralizaciji (DP – DM), a u drugom postupku je bilo obrnuto demineralizacija je prethodila deproteinizaciji



(DM – DP). Kod oba postupka je deproteinizirani i demineralizirani hitin filtriran i ispiran do neutralnosti demineraliziranom vodom te sušen preko noći u peći na 60°C. [18]

Vidimo da je sadržaj proteina u ostacima manji kad je prvo provedena demineralizacija, a zatim deproteinizacija nego kada je rađeno obratno što znači da je tada bolja deproteinizacija ljuske. Također pri takvom postupku prinos hitina je bio značajno viši. Red izvođenja nije znatno utjecao na postotak demineralizacije. [18]

#### Biološki tretman ljuske jastoga

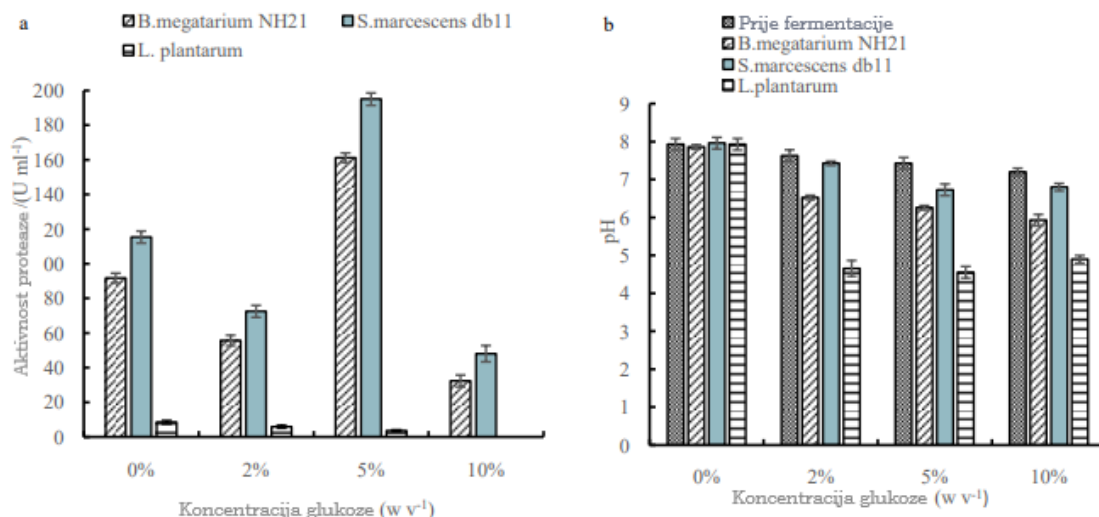
Za biološku ekstrakciju su pripremljene odvojene kulture, 10g ljuski jastoga je dodano u 50mL vode te je dopunjeno s 0%, 2%, 5% ili 10% glukoze te inokulirano s 10% *Bacillus megaterium* odnosno s 10% *Serratia marcescens* inkubirano 96 sati pri 30°C i s 10% *Lactobacillus plantarum* inkubirano 96 sati pri 37°C u tresilici (180rpm). [18]

Također su napravljena tri različita eksperimenta s dvije kulture bakterija. U prvom postupku je provedena istodobna inokulacija bakterije koja proizvodi proteazu (*Bacillus megaterium* ili *Serratia marcescens*) i *Lactobacillus plantarum*, inkubirano na 37°C u tresilici (180rpm). Kod drugog postupka je prvo išla inokulacija s bakterijom koja proizvodi proteazu, dopunjene s 5% glukoze (inkubirano pri 30°C u tresilici (180rpm)) te je nakon tri dana dodan *Lactobacillus plantarum* uz što je slijedila inkubacija na 37°C u tresilici (180rpm). Treći postupak imao obrnuti red dodavanja od drugog. Nakon 6 dana inkubacije za sve postupke je prikupljen hitin, a supernatant kulture je sačuvan za daljnja istraživanja. [18]

Biološke metode su alternativa kemijskim metodama zbog male količine otpada koji nastaje. pH i aktivnost proteaze praćeni su kroz eksperimente koji su sadržavali različitu koncentraciju glukoze koja je varirala od 0 do 10%. Praćene su promjene pH i aktivnosti proteaze u kulturama koristeći *Bacillus megaterium*, *Serratia marcescens* i *Lactobacillus plantarum* kao biokatalizatore. Maksimalna aktivnost proteaze za *Bacillus megaterium* je bila 161,3 UmL<sup>-1</sup>, a za *Serratia marcescens* 195,3UmL<sup>-1</sup> kod kulture koja je inicijalno sadržavala 5% glukoze, a za *Lactobacillus plantarum* je utvrđeno da daje zanemarive količine proteaze. Na slici 8.a je grafički prikazana ovisnosti aktivnosti proteaze o koncentraciji glukoze. [18]

U kulturama *Lactobacillus plantarum* je početna koncentracija glukoze imala značajan utjecaj na proizvodnju mliječne kiseline. U kulturi gdje je koncentracija glukoze bila 5% pH je pao s 7,9 na 4,6 te se uz to povećala učinkovitost demineralizacija od 72,83%. Ovisnost pH o koncentraciji glukoze je prikazana na slici 8.b. pH medija se smanjivao s povećanjem

vremena kultivacije. Ta promjena se povezuje s konverzijom glukoze u mliječnu kiselinu, koja nam ukazuje na sadržaj minerala. Poznato je da sojevi *Lactobacillus* proizvode mliječnu kiselinu koja otapa  $\text{CaCO}_3$  prisutan u ljuski jastoga pri čemu nastaje kalcijev laktat i na taj način dolazi do značajne demineralizacije. [18]



**Slika 9.** Ovisnost aktivnosti proteaza(a) i pH(b) o koncentraciji glukoze [18]

U uvjetima koji potiču maksimalnu aktivnost proteaze koja je postignuta u kulturi s koncentracijom glukoze 5%, deproteinizacija oklopa jastoga je bila 70,29% za *Bacillus megatarium*, a za *Serratia marcescens* 76,73%, vrijednosti su izračunate prema jednadžbi (1). Stupanj deproteinizacije poklapa se sa trendom aktivnosti proteaze odnosno najveći postotak proteina je uklonjen kod ljuske u kulturi s najvećom aktivnosti proteaze. Rast *Lactobacillus plantarum* je slab kod ljuski u mediju bez glukoze. To pokazuje da ljuska jastoga sama ne bi mogla osigurati dovoljno hrane za rast bakterije iz tog razloga proteini, kalcij i sadržaj pepela u ostacima nisu mogli biti određeni kod ovih uvjeta uzgoja. Sadržaj proteina, kalcija i pepela u ostacima te postoci demineralizacije i depolimerizacije su prikazani u tablici 3. [18]

Iz Tablice 3. je vidljivo da *Bacillus megatarium* i *Serratia marcescens* postižu viši stupanj deproteinizacije dok *Lactobacillus plantarum* postiže viši stupanj demineralizacije. S obzirom na to proveden je eksperiment za ekstrakciju hitina ko-kulturama bakterija. [18]

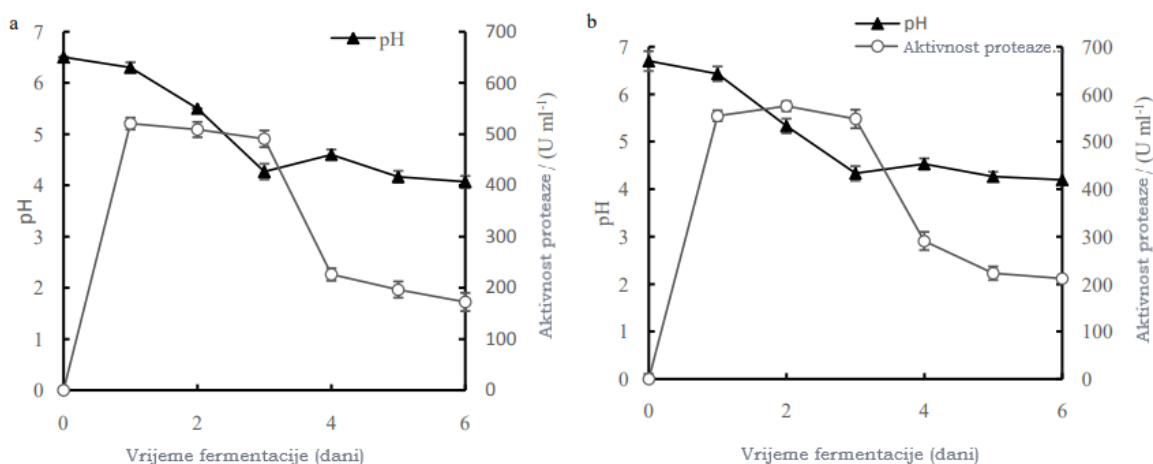
**Tablica 3.** Rezultati dobiveni nakon tretmana različitim mikrobiološkim kulturama

Mikrobiološki tretman	Glukoza (% wv <sup>-1</sup> )	Proteini (%)	Kalcij (%)	Deproteinizacija (%)	Demineralizacija (%)	Pepeo (%)	Prinos hitina (%)
Prije	-	23.54 ± 0.7	45.68 ± 0.4	-	-	12.17 ± 0.76	-
<i>Bacillus megaterium</i> NH21	0	14.30 ± 0.9	41.32 ± 1.66	51.40 ± 0.4	27.63±1.1	9.73 ± 0.43	38.73 ± 2.11
	2.5	12.58 ± 1.14	34.89 ± 0.5	58.32 ± 2.1	40.42±0.94	7.21 ± 1.17	46.63 ± 0.43
	5	8.84 ± 0.67	32.72 ± 0.9	70.29 ± 1.7	43.34±0.7	6.82 ± 0.3	49.73 ± 0.43
	10	18.57 ± 0.73	32.49 ± 1.3	41.62 ± 0.8	47.36±0.68	8.59 ± 0.62	40.90 ± 1.05
<i>Serratia marcescens</i> db11	0	13.79 ± 1.4	43.88 ± 0.78	56.06 ± 1.03	27.95±1.23	5.64 ± 0.2	39.54 ± 0.90
	2.5	16.86 ± 0.11	38.47 ± 0.84	47.51 ± 0.7	38.26±1.04	6.46 ± 0.84	42.82 ± 2.76
	5	7.17 ± 0.98	35.84 ± 0.7	76.73 ± 1.3	40.05±0.47	7.25 ± 0.37	50.71 ± 3.25
	10	14.21 ± 1.23	32.36 ± 0.69	51.88 ± 0.7	43.54±0.75	8.62 ± 0.17	43.48 ± 2.59
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	2.5	20.84 ± 0.56	19.05 ± 0.76	17.60 ± 0.17	65.64±0.33	5.74 ± 1.2	29.66 ± 1.09
	5	22.79 ± 0.84	15.56 ± 1.54	21.67 ± 2.1	72.83±0.26	3.16 ± 0.6	37.09 ± 2.08
	10	-	15.68 ± 1.28	-	73.02±1.3	4.88 ± 0.3	-

NO=nije određeno. Sve je izvedeno tri puta, standardna devijacija je uključena nakon ±

*Kokultivacija s Bacillus megaterium, Serratia marcescens i Lactobacillus plantarum*

Ekstrakcija hitina je provedena inkubacijom ljuski jastoga s kokulturama *Bacillus megaterium* i *Lactobacillus plantarum* ili *Serratia marcescens* i *Lactobacillus plantarum*. pH i aktivnost proteaze su praćeni kroz eksperiment kako bi se utvrdila optimalna strategija kokultivacije. Na Slici 9. je prikazana ovisnost promjene aktivnosti proteaze i pH u kokulturama *Bacillus megaterium* i *Lactobacillus plantarum*, *Serratia marcescens* i *Lactobacillus plantarum*.<sup>[18]</sup>



**Slika 10** Promjena aktivnosti proteaze i pH u kokulturama (a) *Bacillus megaterium* i *Lactobacillus plantarum*, (b) *Serratia marcescens* i *Lactobacillus plantarum*<sup>[18]</sup>

Vidimo da se aktivnost proteaze *Bacillus megaterium* brzo povećala na maksimalnu vrijednost od otprilike  $520\text{UmL}^{-1}$  unutar 24 sata i ostala je skoro konstantna do trećeg dana kad je uslijedio nagli pad. pH se u tri dana smanjio sa 6,5 na 4,2 kao rezultat metaboličke aktivnosti *Lactobacillus plantarum*. Za *Serratia marcescens* je postignuta maksimalna aktivnost proteaze  $575\text{UmL}^{-1}$  drugi dan te od četvrtog dana nadalje počine značajno padati. pH kulture je u tri dana naglo pao s 6,7 na 4,3. Ovi rezultati su grafički prikazani na slici 9. [18]

Povećanje kiselosti s vremenom pokazuje proizvodnju mliječne kiseline što ukazuje na uklanjanje minerala. Zbog toga je treći dan odabran da bude prigodna točka za inokuliranje medija za kulturu ljuski jastoga koji je prethodno inokuliran s odgovarajućim proizvođačem proteaza s *Lactobacillus plantarum*. Primijenjene su tri tehnike za eksperiment kokultivacije te je pri tome praćena promjena pH i aktivnosti proteaze tijekom cijelog vremena kokultivacije kako bi se zaključilo koja je metoda najbolja. Kad je *Lactobacillus plantarum* "zaposlen" u kokultivaciji pH cijelo vrijeme pada kako vrijeme raste što ukazuje na proizvodnju organske kiseline u cijelom tijeku kultivacije. [18]

U kulturi gdje je *Lactobacillus plantarum* dodan 3 dana nakon inokulacije s *Bacillus megaterium* aktivnost proteaze je imala maksimum na  $515\text{UmL}^{-1}$  i onda je 6 dan naglo pala na  $13\text{UmL}^{-1}$  kad je pH dostigao vrijednost od 5,2. Za kulturu gdje je *Lactobacillus plantarum* dodan 3 dana nakon *Serratia marcescens* aktivnost proteaze je imala maksimalnu vrijednost pri  $599\text{UmL}^{-1}$  te je takva bila 3 dana. Šesti dan kad se pH smanjio na 5,6 je naglo pala na vrijednost  $20\text{UmL}^{-1}$ . [18]

U ovom istraživanju za deproteinizaciju s *Bacillus megaterium* je postignuto uklanjanje proteina učinkovitosti 70,29%, a za *Serratia marcescens* 76,73%. Za demineralizaciju s *Lactobacillus plantarum* je postignuto uklanjanje e 72,83% minerala. U procesu kokultivacije su postignute više vrijednosti. Najbolje uklanjanje minerala od 89,59% i proteina od 87,19% uz prinos hitina od 82,56% je postignuto kokultivacijom *Serratia marcescens* i *Lactobacillus plantarum*. Točnije kad je *Serratia marcescens* dodan prvi, a *Lactobacillus plantarum* tri dana kasnije. U tablici 4. su prikazane vrijednosti deprotonizacije, demineralizacije i prinosa hitina i za ostale kokulture. [18]

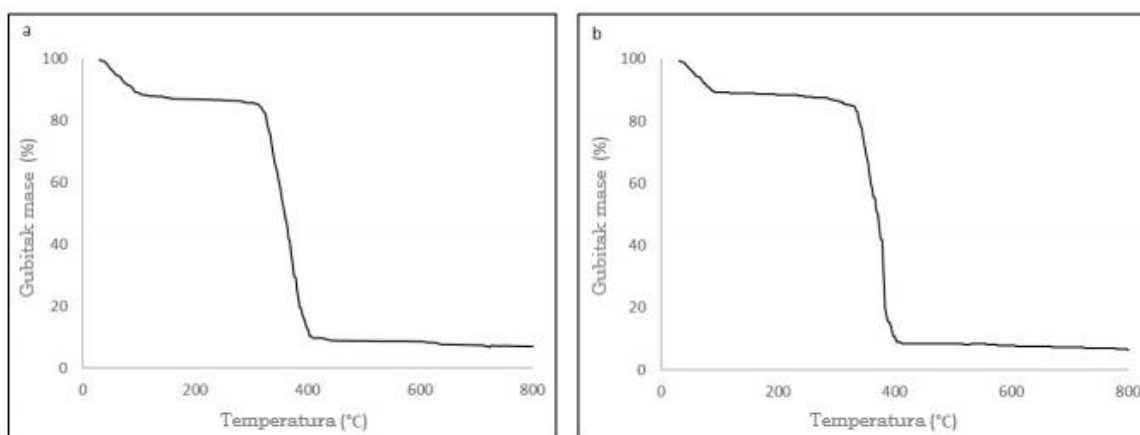
**Tablica 4.** Rezultati dobiveni nakon 6 dana tretmanom mikrobiološke kokultivacije s 5% glukoze

Mikrobiološki tretman	Deproteinizacija (%)	Demineralizacija (%)	Prinos hitina (%)
L + B	54.54 ± 1.51	60.65 ± 1.13	52.24 ± 0.22
L to B	65.46 ± 1.22	63.68 ± 0.64	58.33 ± 1.90
B to L	78.63 ± 0.94	82.90 ± 1.01	74.85 ± 3.98
L + S	63.46 ± 1.11	66.01 ± 1.02	59.87 ± 1.45
L to S	76.34 ± 1.74	68.76 ± 1.42	63.19 ± 2.02
S to L	87.19 ± 0.78	89.59 ± 0.94	82.56 ± 2.76

L + B: paralelna inokulacija *L.plantarum* i *B.megaterium*; L to B: kultura je počela s *L.plantarum*, a *B.megaterium* je dodan nakon 3 dana; B to L: kultura je počela s *B.megatrium*, a *L.plantarum* je dodan nakon 3 dana; L + S: paralelna inokulacija *L.plantarum* i *S.marcescens*; L to S: kultura je počela s *L.plantarum*, a *S.marcescens* je dodan 3 dana kasnije; S to L: kultura je započeta s *S.marcescens*, a *L.plantarum* je dodan 3 dana kasnije.

#### Karakterizacija hitina termogravimetrijskom analizom(TGA)

TGA prati promjenu mase materijala tijekom zagrijavanja kao funkciju vremena i temperature. Dobivena mjerenja daju informaciju o toplinskoj stabilnosti i sastavu materijala. U ovom istraživanju su TGA mjerenja provedena na TGA analizatoru zagrijavanjem materijala s 10°C na 800°C uz brzinu povećanja temperature od 5°Cmin<sup>-1</sup>. Toplinska razgradnja je ispitana za uzorke hitina ekstrahirane nakon uspješnih tretmana kombinacije *Bacillus megaterium* i *Lactobacillus plantarum* odnosno *Serratia marcescens* i *Lactobacillus plantarum*. Dobiveni termogrami su prikazani na slici 10. [18]

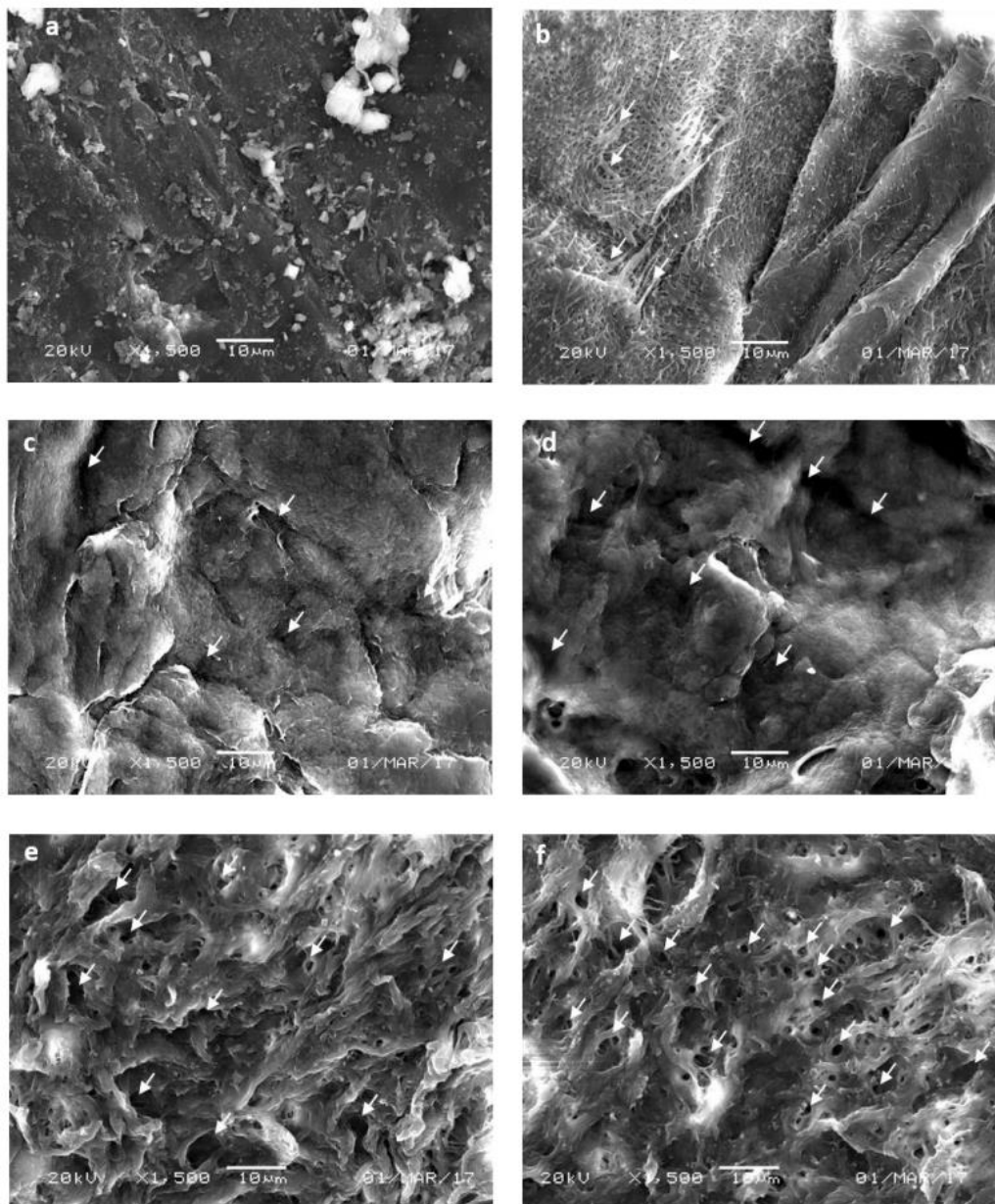


**Slika 11.** Termogrami dobiveni TGA analizom (a) *Bacillus megaterium* i *Lactobacillus plantarum*; (b) *Serratia marcescens* i *Lactobacillus plantarum* [18]

Na termogramima vidimo da je došlo do gubitka mase u dva stupnja za oba uzorka. Gubitak mase u prvom stupnju je između 50°C i 100°C i on je posljedica isparavanja vode. Do gubitka mase u drugom stupnju koji je između 300°C i 500°C se pripisuje potpunoj degradaciji strukture hitina. Postotak zaostale mase nakon iznad 500°C je od oba uzorka konstantan. [18]

### *SEM i EDX analiza*

Ljuske jastoga su ispitivane pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM) pri visokoj rezoluciji prije i poslije različitih tretmana ekstrakcije hitina kako bi se odredio utjecaj na kristalnu strukturu. Na slici 11. su prikazani rezultati se SEM analize. [18]



**Slika 12.** Rezultati SEM analize<sup>[18]</sup>

Na slici 11.a je prikazana karakteristična struktura čvrste ljuske jastog prije tretmana. Fragmenti ljuske su homogeni i čvrsti zbog mnogih minerala ugrađenih u praznine unutar strukture hitina i molekula proteina zbog čega nisu vodljiva uređena hitinska vlakna koja su sastavni dio ljuske. <sup>[18]</sup>

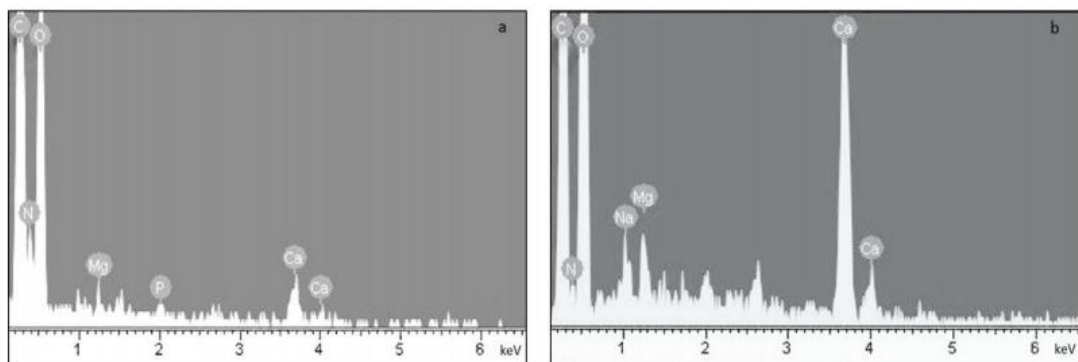
Pod 11.b je prikazana slika ljuske nakon demineralizacije s *Lactobacillus plantarum*. Uočeni su pojedinačni snopovi hitinskog vlakna koji su u međusobnom kontaktu na određeni područjima. Glatkoća strukture nakon procesa demineralizacije u odnosu na grub i kockasti izgled netretiranog uzorka ukazuje na to da su se minerali nalazili između i oko hitinskih i proteinskih vlakna. <sup>[18]</sup>

11.c i 11.d prikazuju ljusku jastoga nakon deprotonizacije s *Bacillus megaterium* (c) i *Serratia marcescens* (d). Vidljiva su plitka udubljenja no sama vlakna se ne mogu razaznati. SEM slika ljuske nakon deprotonizacije pokazuje manje frakture hitina nego nakon demineralizacije. <sup>[18]</sup>

11.e i 11.f pokazuju ljusku jastoga nakon uspješnog tretmana kokulturama *Bacillus megaterium* i *Lactobacillus plantarum* (e) i *Serratia marcescens* i *Lactobacillus plantarum* (f). Vidljiva su udubljenja s gusto frakturiranom strukturom. <sup>[18]</sup>

Ova analiza nam pokazuje da su tretmani ekstrakcije hitina značajno promijenili strukturu ljuske jastoga. <sup>[18]</sup>

Provedena je i energijski razlučujuća rendgenska analiza (EDX) demineralizirane (a) i deprotonizirane (b) ljuske jastoga. Rezultati ove analize su vidljivi na slici 12. <sup>[18]</sup>

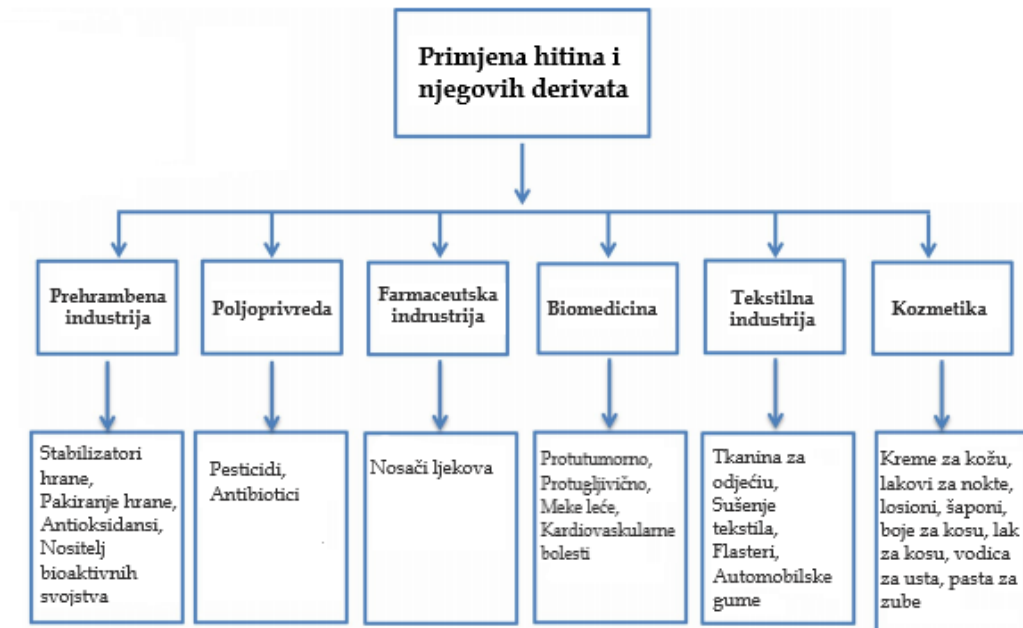


**Slika 13.** Rezultati EDX analize za demineralizirani (a) i deproteinizirani (b) uzorak <sup>[18]</sup>

Vidljivo je da je za demineralizirani uzorak vrh kalcija jako nizak što znači da je velika količina kalcija uklonjena, suprotno tome kod analize deproteiniziranog uzorka su količine kalcija i magnezija značajne. <sup>[18]</sup>

## 5. PRIMJENA HITINA

Hitin je poznat po svojim brojnim dobrim svojstvima kao što su biokompatibilnost, obnovljivost i netoksičnost. Kako je hitin teško topljiv u većini uobičajenih otapala prevodi se u derivate kao što je hitozan. U takvom obliku se primjenjuju u mnogim industrijama kao što su tekstilna, biomedicinska, farmaceutska.<sup>[14]</sup> Na Slici 7. je prikazana primjena hitina i njegovih derivata u raznim industrijama.



**Slika 14.** Primjena hitina u različitim industrijama <sup>[14]</sup>

Jedna od primjena hitina je i za proizvodnju hitinskih vlakna. Trenutno je više od 50% vlakna koja se koriste sintetsko, dok bi hitinska vlakna u tekstilnoj industriji značila veliku promjenu jer su ona biorazgradiva i prirodna. Najveći rast potrošnje hitinskih vlakana u tekstilnoj industriji je za medicinski tekstil koji se koristi kod kirurških intervencija. Kako bi se vlakna mogla koristiti u medicinske svrhe moraju biti biološki inertna, ne smiju uzrokovati komplikacije ili reagirati s tkivom. Medicinski tekstil je idealan kad se ponaša kao prirodno tkivo i zbog toga su idealna hitinska vlakna i kompoziti s hitinom. Tehnika kojom se dobivaju hitinska vlakna je prerada otopine hitina no kako je hitin netopljiv u većini uobičajenih otopina potrebno je pronaći odgovarajuću smjesu otapala za taj proces. <sup>[2]</sup>

Mnogo sintetskih polimera je korišteno u kozmetici kod proizvoda za osobnu higijenu. No kako su te sintetske perle, mikroperle ne razgrađuju, a zbog veličine ih je teško ukloniti iz okoliša pokušava se smanjiti njihova upotreba. Tu ponovo dolazi hitin koji nudi biološku



alternativu sintetskim mikroperlama zbog toga što je biorazgradiv i zbog svojih svojstva kao što je antioksidativno djelovanje. [2]

Koriste se i hitinski filmovi od kojih bi najviše koristi imale industrije proizvodnje medicinskih aparata i ambalažna industrija. Ambalažna industrija koristi gotovo 65% biopolimera koji su na tržištu, a to proizlazi iz potrebe za ekološkom ambalažom jer je to većinom proizvod za jednokratnu upotrebu. Hitinski filmovi osim za ambalažu nalaze primjenu i u medicinskoj industriji, za previjanje suhih i mokrih rana. Sprečavaju brzo sušenje čime se izbjegava stvaranje ožiljaka i skupljanje ekstrudata pa ne dolazi do dugotrajnog zacjeljivanja. [2]

Hidrogelovi s hitinom su biomaterijali koji su dizajnirani za oftalmološke uređaje ali se njihova upotreba proširila na mnogo proizvoda u medicinskoj, biološkoj i farmaceutskoj industriji. Koriste se za proizvodnju mekih leća, nosače lijekova, tkivno inženjerstvo, imobilizaciju stanica i proizvodnju obloga za rane. Različiti hidrogelovi se razlikuju po kemijskom sastavu i metodama geliranja. Uloga hitina unutar tih hidrogelova je da ubrzava regeneraciju izvanstanične matrice, potiče granulaciju, smanjuje upalnu bol i pomaže kod obnavljanja kosti. [2]

Tkivno inženjerstvo se sve više razvija jer se otkriva sve više metoda za oporavak tkiva kao što su različiti implantati, transplantacije i 3D rješenja. Materijali za pripremu matrica u tkivnom inženjerstvu koji pomažu kod obnavljanja kosti trebali bi biti biokompatibilni kako bi se mogli dobro integrirati u tkivu domaćina bez izazivanja imunološke reakcije. Trebali bi biti čvrsti i biorazgradivi unutar stanice. Zbog toga su materijali s hitinom idealni za nadomještanje koštanog tkiva jer uz poznata svojstva rade i kompozit s hidroksiapatitom koji je glavni mineralni sastojak kosti. [2]

Važnu ulogu ima i kod cijeljenja rana. Cijeljenje rana je složen biološki proces koji obuhvaća četiri stupnja hemostazu, upalu, širenje i pregradnju. To su faze koje se preklapaju u vremenu i prate određeni program koji kontroliraju i uvode različite vrste stanica. Obično ovaj mehanizam djeluje dovoljno dobro da olakša brzi oporavak kože no ranjena koža se ne regenerira potpuno jer dolazi do gubitka folikula dlaka ili znojnih žlijezda kod zacjeljene kože. Često se javlja poremećena funkcija zacjeljivanja rana i kroničnih rana te je zato jedan od glavnih ciljeva tehnologije zacjeljivanja rana poboljšanje zacjeljivanja i teže regeneriranje rana. Hitin i njegovi derivati su se pokazali korisnim sastojcima u materijalima za previjanje

rana i uz to potencijalno mogu doprinijeti razvoju kože olakšavajući njenu regeneraciju jer utječu na proces zacjeljivanja na molekularnoj razini. <sup>[19]</sup>

Hitin se također primjenjuje i u poljoprivredi. Kemijski pesticidi koji se najviše koriste su toksični i s vremenom dođe do navikavanja i prestaju biti djelotvorni. Alternativa pesticidima su hitin i njegovi derivati koji zbog obrambenog mehanizma mogu zaštititi biljke od bolesti uzrokovanih virusima, gljivicama i bakterijama. <sup>[10]</sup> Hitin i hitozan mogu učinkovito smanjiti bolesti tla. Pored toga hitin pokazuje nekoliko funkcija uključujući zadržavanje hranjivih sastojaka u tlu i doprinos ciklusu ugljika. Zbog takvih svojstva imaju svestranu primjenu u poljoprivredi. <sup>[19]</sup>

Hitin se koristi i kod tretmana otpadnih voda. Hitin i hitozan adsorbiraju teške metale i boje. Hitozan je polikationski polimer učinkovit za koagulaciju, flokulaciju i dehidraciju aktivnog mulja i stoga se koristi kod tretmana otpadnih voda. Druga primjena je imobilizacija mikroorganizama ili mulja u matricama hitozana za pročišćavanje otpadnih voda u ekstremnim uvjetima (jako visok ili nizak pH, prisutnost organskih otapala), koja omogućuje ponovnu upotrebu stanica te se zato primjenjuju u kontinuiranim procesima. <sup>[19]</sup>

Tržište hitina se pomalo širi i očekuje se da će u budućnosti sve više rasti. Dok je hitozan jako istražen i koristi se hitin još nije dostigao svoj puni potencijal. Razlog tome je što je teško topiv u uobičajenim otapalima i nedostaci kod njegove proizvodnje. Upotreba hitina je ograničena zbog malih zaliha stabilnog hitina velike molarne mase. Zbog istog razloga kompanije koje proizvode hitin i hitozan pate od nedosljednosti njegove čistoće i kvalitete, jer se mnogi biomaterijali ne mogu napraviti od komercijalnog hitina koji dobivamo. Kako bi komercijalizirali materijale koji sadrže hitin treba velika konstantna zaliha novog hitina velike molekulske mase koje za sad nema. <sup>[2]</sup>

## 6. ZAKLJUČAK

Kako raste svijest o zaštiti okoliša tako se sve više okrećemo prema upotrebi biopolimera i biomaterijala koji ne zagađuju okoliš, a jedan od takvih materijala je hitin.

Ekstrakcija hitina iz morskog otpada rakova se provodi ili biološki ili kemijski. Iako je trenutno zastupljenija kemijska priprema hitina ona za sobom ostavlja velike količine otpadne vode nastale uslijed tretmana jakim kiselinama i lužinama što podiže cijenu proizvodnje. Biološki proces je s druge strane inovativan i čišći no nakon njega je dio proteina i dalje vezan na hitin i potrebno je provesti kemijski tretman kako bi se uklonio. Druga mana ovog procesa je što još nije dovoljno istražen i ne primjenjuje se na industrijske procese. No rezultati laboratorijskih istraživanja pokazuju da ekstrakcija hitina mikrobiološkim kokulturama ima velik potencijal da postane ekološka alternativa kemijskoj metodi proizvodnje hitina.

Pročišćeni hitin bez obzira kojim procesom nastao i njegovi derivati se mogu primijeniti na mnoga polja kao što su prehrambena industrija, poljoprivreda, biomedicina, kozmetika, tekstilna industrija i druge. Što povećava tržišnu vrijednost morskog otpada rakova.

Iako primjena i priprema hitina još nisu postigle svoj puni potencijal s napretkom istraživanja to bi mogle postići u bliskoj budućnosti.

## 7. LITERATURA

1. Casadidio, C.; Peregrina, D.V.; Gigliobianco, M.R.; Deng, S.; Censi, R.; Di Martino, P. (2019.), Chitin and Chitosans: Characteristics, Eco-Friendly Processes, and Applications in Cosmetic Science. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 369
2. Shamshina J.L., Berton P., Rogers R.D., (2019.), Advances in Functional Chitin Materials: A Review, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **2019** 7 (7), 6444-6457
3. Branka Andričić (Split, 2009.) Prirodni polimerni materijali, priručnik
4. Leja K., Lewandowicz G., Polymer Biodegradation and Biodegradable Polymers – a Review, *Polish J. of Environ. Stud.* 19 (2) (2010) 255-266
5. <https://tehnika.lzmk.hr/tehnickaenciklopedija/polimeri.pdf> (2.9.2020.)
6. [https://www.wikiwand.com/en/Crystallization\\_of\\_polymers](https://www.wikiwand.com/en/Crystallization_of_polymers) (2.9.2020.)
7. Suriani I., Oussama R., Suhana M., Said M. Shaifulazuar R. in *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, 2019. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/biopolymer/pdf> (19.8.2020.)
8. Dr.sc. Zlata Hrnjak – Murgić (Zagreb, 2004) Prirodni i sintetski polimeri, interna skripta
9. <https://www.scribd.com/document/376644663/celuloza> (15.8.2020.)
10. <https://bs.wikipedia.org/wiki/%C5%A0krob#/media/Datoteka:Amylose2.svg> (15.8.2020.)
11. Grégorio C. (2019.) Historical review on chitin and chitosan biopolymers, *Environmental Chemistry Letters* (2019) 17:1623–1643
12. <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=hitin> (16.8.2020.)
13. Younes, I.; Rinaudo M.; (2015.), Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 1133-1174
14. Suryawanshi N., Jujjavarapu S.E., Ayothiraman S. (2019.) Marine shell industrial wastes—an abundant source of chitin and its derivatives: constituents, pretreatment, fermentation, and pleiotropic applications—a revisit, *International Journal of Environmental Science and Technology* (2019.) 16:3877–3898
15. Jones, M.; Kujundzic, M.; John, S.; Bismarck, A. Crab vs. Mushroom: A Review of Crustacean and Fungal Chitin in Wound Treatment. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 64.

16. Surinder Kaur, Gurpreet Singh Dhillon (2015.), Recent trends in biological extraction of chitin from marine shell wastes: a review, *Critical Reviews in Biotechnology*, 35:1, 44-61
17. Youngju K., . Ro-Dong P., (2015.), Progress in bioextraction processes of chitin from crustacean biowastes, *J Korean Soc Appl Biol Chem* (2015) 58(4):545–554
18. Chakravarty J., Yang C., Palmer J., Brigham C., Chitin Extraction from Lobster Shell Waste using Microbial Culture-based Methods, *Applied food biotechnology* 2018, 5 (3):141-154
19. Arabia W., Arabia L, Adour L, Amran A.,(2013.) Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods – A Review, *Food Technol. Biotechnol.* 51 (1) 12–25 (2013)

## 8. ŽIVOTOPIS

Lucija Terihaj [REDACTED] Odrasla je u Samoboru gdje završava OŠ Bogumila Tonija. 2011. godine upisuje Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga gdje 2015. godine obranom maturalnog rada stječe zvanje Kemijskog tehničara. Iste godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije studij Primijenjena kemija koji 2017. godine mijenja u studij Kemija i inženjerstvo materijala. Članica je studentske sekcije hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa unutar kojeg sudjeluje na raznim projektima. Stručnu praksu odrađuje 2019. godine u Glavnom vodoopskrbnom laboratoriju hrvatskih voda na odjelu za ispitivanje metala.