

УДК 579.61+577.114.7

**ХИТИН-ГЛЮКАНОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ
МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ *PENICILLIUM SOLITUM*
И *ASPERGILLUS NIGER*: ПОЛУЧЕНИЕ
И ХАРАКТЕРИСТИКА**

И. С. СУРДОЛ¹, К. А. ГУБЧИК¹, А. А. КОСТЕНЕВИЧ^{1, 2},
Р. Н. БИРЮКОВ¹, М. А. КАПУСТИН¹

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

²Белорусский государственный технологический университет,
Минск, Беларусь, Gubchikk@gmail.com

Выделены хитин-глюкановые комплексы из мицелиальных грибов *Penicillium solitum* и *Aspergillus niger*, определен выход и зольность полученных образцов. Получены и проанализированы спектры поглощения образцов хитин-глюкановых комплексов и коммерческих хитозанов в УФ / видимом диапазонах.

Введение. Хитин – второй по распространенности полисахарид после целлюлозы – является основным компонентом структуры наружного скелета насекомых, панцирей ракообразных и клеточных стенок грибов. Главным источником хитина в промышленности по-прежнему остаются панцири крабов и креветок, сезонность и различный состав которых делает производство дорогим и малопродуктивным [1]. В последнее время появился интерес к хитину грибов, для выделения которого можно использовать кислоты и щелочи в меньших концентрациях, чем для добычи хитина ракообразных [2]. К тому же грибы гораздо проще культивировать. Однако хитин грибов, в отличие от хитина ракообразных, находится в составе хитин-глюкановых комплексов (ХГК) [1].

Хитин-глюкановый комплекс – нерастворимый в воде биополимер, содержащий в себе ковалентно связанные между собой хитин (мономер состоит из остатков N-ацетил-(1,4)-D-глюкозамина) и β-глюкан [3]. Однозначно ХГК нельзя рассматривать как смесь хитина и глюкана или хитозана и глюкана, поскольку они связаны между собой ковалентно. Существование ковалентной

связи в ХГК доказано введением дейтериевой метки [2]. Хитин растворяется лишь в некоторых растворителях, большая часть которых разрушает полимер и затрудняет определение молекулярной массы и молекулярно-массового распределения. Молекулярная масса полимера составляет 2,0–2,5 млн Да, степень полимеризации – 10–14 тыс. [2, 4].

Хитин грибов в сравнении с хитином ракообразных или насекомых более привлекателен с медицинской точки зрения, поскольку в клеточной стенке грибов также содержатся меланин, белки, липиды и другие вещества, обладающие доказанными антиоксидантным и противоопухолевым свойствами и которые при мягких условиях обработки остаются в составе ХГК. К тому же биомасса грибов является отходом производства ферментных препаратов, органических кислот, антибиотиков, и ее можно использовать в качестве дешевого сырья для производства медицинских препаратов на основе ХГК [5]. По литературным данным, ХГК выделяли из дрожжей *Pichia pastoris*, выращенных на среде с глицерином – побочным продуктом биодизельной промышленности [1].

В промышленности получение хитина из панцирей ракообразных осуществляется химическим либо ферментативным методом путем последовательного отделения белковой и минеральной составляющих панциря, т. е. посредством проведения деминерализации и депротеинизации. Химический метод предусматривает одно- или двухстадийную многочасовую обработку концентрированными кислотами и щелочами при высоких температурах. Кроме депротеинизации, деминерализации и депигментации происходят также деацетилирование и частичный гидролиз хитина, что приводит к снижению молекулярной массы и повышению степени деацетилирования – превращения хитина в хитозан [6].

В результате отщепления ацетильного компонента от ХГК остается свободная амидная группа, с которой могут связываться другие функциональные группы, что влияет на физическо-химические и биологические свойства полученных комплексов [7].

Хитин-глюкановые комплексы обладают антибактериальными свойствами по отношению к патогенным и условно-патогенным

бактериям: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus*. Протестированный на крысах перевязочный материал, разработанный на основе хитин-глюканового комплекса в Чешском технологическом университете в Брно, показал высокую заживляющую способность [8]. Было обнаружено, что хитин-глюкановые комплексы, выделенные из различных грибов, более эффективны с точки зрения селективной адсорбции металлов, чем выделенные из панцирей ракообразных [2].

Цель исследования – получение и характеристика хитин-глюкановых комплексов из мицелиальных грибов *P. solitum* и *A. niger*.

Материалы и методы. В качестве источников хитин-глюканового комплекса использовали грибы *A. niger* БИМ F-183, *P. solitum* БИМ F-312 из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси. Культивирование грибов осуществляли в качалочных колбах объемом 1 л на шейкер-инкубаторе при температуре 30 °С и частоте вращения 100 мин⁻¹ в течение 48 ч. Были использованы питательные среды следующего состава: пивное сусло 8 °Б (рН 6,8), среда Чапека-Докса (сахароза – 30,0 г/л; NaNO₃ – 2,0 г/л; K₂HPO₄ – 1,0 г/л; MgSO₄ – 0,5 г/л; KCl – 0,5 г/л; FeSO₄ – 0,01 г/л; рН 6,8).

После культивирования исследуемых грибов отделение мицелия, необходимого для выделения хитин-глюканового комплекса, от культуральной жидкости проводили через ватно-марлевый фильтр. Для определения выхода сухой биомассы 100 мг мицелия высушивали в сухо-жаровом шкафу при температуре 105 °С до достижения постоянной массы. Разрушение клеток полученного мицелия, депротеинизацию, деминерализацию и частичную депигментацию проводили обработкой 6,25 М NaOH (50 мл раствора на 1 г биомассы) при температуре 90 °С и постоянном перемешивании в течение 3 ч. Хитин-глюкановый комплекс отделяли от примесей центрифугированием при 5000 мин⁻¹ на протяжении 15 мин. Для последующих стадий выделения ХГК использовали осадок, полученный в результате центрифугирования, который ресуспендировали в дистиллированной воде и подвергали ультразвуковой обработке в течение 2 ч. Поскольку гидролиз осуществ-

вляли высококонцентрированной щелочью, полученный ХГК промывали несколько раз дистиллированной водой до pH 7,0 и высушивали способом лиофилизации на приборе Martin Christ Gamma 2-16 LSD plus (Германия) при следующих условиях: 20 мин – предварительная заморозка при температуре конденсатора 85 °С; 24 ч – основная сушка при температуре полок 10 °С, вакуум 0,03 мбар; 12 ч – дополнительная сушка при температуре полок 15 °С, вакуум 0,01 мбар.

Для сравнения образцов ХГК и коммерческого хитозана (производства ЗАО «Биопрогресс», Россия) с известными молекулярными массами (38,7, 200 и 550 кДа) и степенью деацетилирования (79, 82 и 87 % соответственно) проводили спектроскопию в диапазоне измерения 190–1000 нм с интервалом 5 нм с использованием спектрофотометра РВ 2201 («СОЛАР», Минск) и прилагаемым к нему программным обеспечением Спектр UV-VIS. В качестве растворителя для ХГК применяли 0,2 М ацетатный буфер (pH 4,3).

Для определения содержания неорганических солей (зольности) образцы ХГК сжигались в муфельной электропечи SNOL 8,2/1100 LSM 01 (Литва) в течение 8 ч при температуре 500 °С. Массу образцов и пепла измеряли на аналитических весах Sartorius CPA225D-0CE (Германия).

Результаты и обсуждение. Чтобы определить выход хитин-глюканового комплекса на единицу массы сухого мицелия микромицетов сперва была определена влажность биомассы (табл. 1). Выделение хитин-глюкановых комплексов из грибного мицелия осуществляли аналогично промышленному методу получения хитина из панцирей ракообразных – одностадийная обработка мицелия концентрированной щелочью при высокой температуре, что приводит к разрушению клеток, деминерализации, депротеинизации и гидролизу клеточных стенок.

Т а б л и ц а 1. **Определение влажности мицелия**

Штамм гриба	Масса влажного мицелия, мг	Масса высушенного мицелия, мг	Влажность, %
<i>A. niger</i> БИМ F-183	100	17 ± 1,5	80 ± 1,5
<i>P. solitum</i> БИМ F-312	100	30 ± 0	70 ± 0

Также данный метод дополнили ультразвуковой обработкой образцов, которая, согласно экспериментальным данным, полученным Е. Э. Куприной и С. В. Володажской, способствует гидролизу хитина, но при этом не происходит деацетилирования хитина в образцах [7]. После получения сухих образцов определили выход ХГК с единицы массы сухого мицелия (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Выход хитин-глюканового комплекса

Штамм гриба	Масса высушенного мицелия, г	Масса ХГК, г	Выход, %
<i>P. solitum</i> БИМ F-312	8,703	1,300	14,94
<i>A. niger</i> БИМ F-183	8,362	1,933	23,12

Наибольший выход ХГК был достигнут при использовании в качестве источника мицелиальных грибов *A. niger*. Зольность в обоих образцах ХГК составила 1,45 %, что сопоставимо с данным аналитическим показателем очищенного хитина ракообразных.

По внешнему виду, в отличие от порошкообразного хитозана, высушенные образцы хитин-глюкановых комплексов из *P. solitum* представляют собой волокнистую рассыпчатую массу белого цвета, из *A. niger* – светло-серого цвета, поскольку специальных манипуляций по депигментации образцов не проводили. В ходе отмывания ХГК дистиллированной водой от щелочи были удалены белковые и минеральные примеси, но в то же время стоит учесть и вымывание растворимой фракции хитозанов и глюканов. Вследствие этого полученные образцы труднорастворимы, что создает определенные трудности в последующих анализах образцов. Для растворения ХГК использовали 0,2 М ацетатный буфер (рН 4,3), поскольку он, в отличие от 0,2 М раствора уксусной кислоты, компенсирует заряд, имеющийся на полимере, и уменьшает межмолекулярные взаимодействия [9]. Кроме того, используемый буфер наиболее инертен для применения в исследованиях биологической активности ХГК в отличие от уксусной кислоты [9] или 2 М NaOH в 0,7 М водном растворе мочевины [10].

Для сравнения полученных ХГК с коммерческими хитозанами проводили спектроскопию в диапазоне длин волн от 190 до 1000 нм. На рис. 1, а представлены графики спектров коммерческих

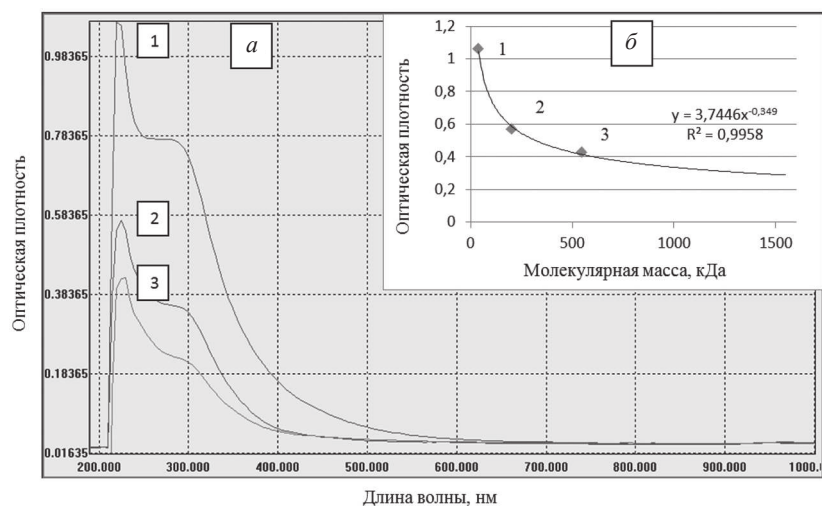


Рис. 1. Спектр коммерческих хитозанов (концентрация 0,15 мг/мл) с молекулярными массами 38,7 (1), 200 (2) и 550 кДа (3) в УФ / видимом диапазонах (а); калибровочная кривая для определения молекулярной массы ХГК (б)

хитозанов с разными молекулярными массами. На этих графиках наблюдается характерный пик при длине волны 225 нм. Кроме того, можно заметить, что величина оптической плотности обратно пропорциональна молекулярной массе, что соответствует уже полученным результатам [11]. На рис. 1, б представлен калибровочный график зависимости оптической плотности растворов хитозанов от молекулярной массы данных образцов. На спектрах с ХГК наблюдаются аналогичные пики: на рис. 2, а – спектры ХГК, выделенные из мицелия *P. solitum* БИМ F-312, а на рис. 3, а – из мицелия *A. niger* БИМ F-183, что свидетельствует о наличии хитина в этих образцах.

На рис. 2, б и 3, б показаны графики зависимости оптической плотности ХГК от концентрации. На рис. 4 представлены спектры хитозана с молекулярной массой 550 кДа и спектры обоих образцов ХГК при одинаковой концентрации.

По калибровочной кривой, полученной для коммерческих хитозанов (рис. 1, б), была косвенно определена молекулярная масса ХГК, выделенного из *P. solitum* и *A. niger*. Данные показатели составляют около 1300 и 1500 кДа соответственно.

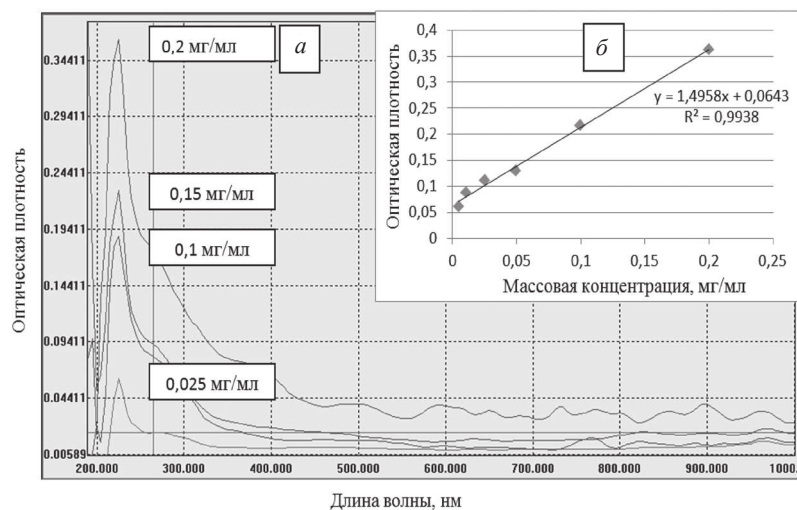


Рис. 2. Спектр хитин-глюкановых комплексов (измерены при концентрациях 0,025, 0,10, 0,15, 0,20 мг/мл), выделенных из мицелия *P. solitum* БИМ F-312 в УФ / видимом диапазонах (а); зависимость оптической плотности ХГК, выделенных из мицелия *P. solitum* БИМ F-312 (б)

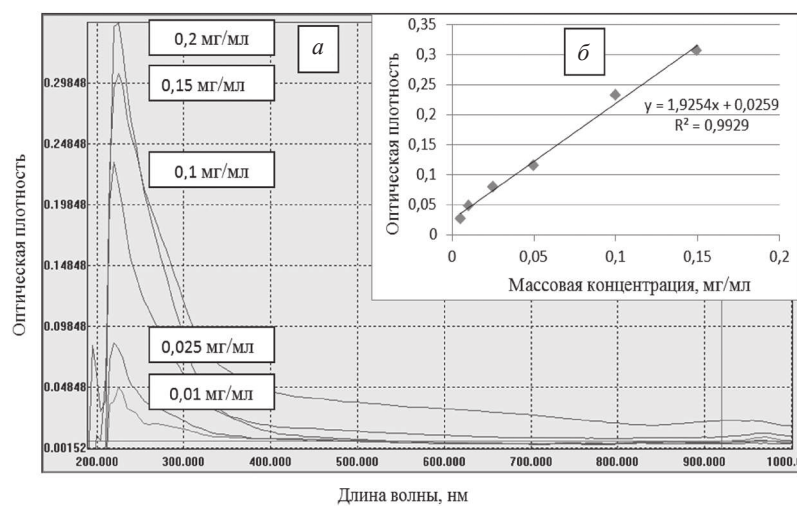


Рис. 3. Спектр хитин-глюкановых комплексов (измерены при концентрациях 0,01, 0,025, 0,10, 0,15, 0,20 мг/мл), выделенных из мицелия *A. niger* БИМ F-183 в УФ / видимом диапазонах (а); зависимость оптической плотности ХГК, выделенных из мицелия *A. niger* БИМ F-183 (б)

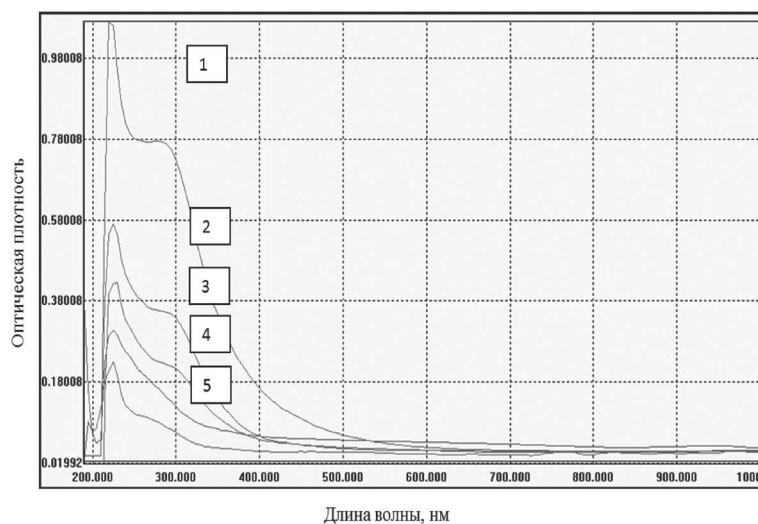


Рис. 4. Сравнение спектров (измерены при концентрациях 0,15 мг/мл) коммерческого хитозана с молекулярными массами 38,7 (1), 200 (2) и 550 кДа (3) и хитин-глюкановых комплексов, выделенных из мицелия *P. solitum* БИМ F-312 (4) и мицелия *A. niger* БИМ F-183 (5) в УФ / видимом диапазоне

В дальнейших исследованиях планируется изучить анти-микробные и антиоксидантные свойства выделенных образцов, а также продолжить выделять ХГК из других видов грибов.

Заключение. Выделены и охарактеризованы хитин-глюкановые комплексы из мицелиальных грибов *A. niger* БИМ F-183 и *P. solitum* БИМ F-312 с выходом 23,12 и 14,94 % соответственно. Содержание неорганических солей (зольность) полученных образцов составляет 1,45 %, что сопоставимо с зольностью очищенного хитина ракообразных. Исходя из анализа спектров поглощения образцов хитин-глюкановых комплексов и коммерческих хитозанов (производства ЗАО «Биопрогресс», Россия) установлено, что молекулярная масса ХГК, выделенного из *P. solitum* и *A. niger*, составляет около 1300 и 1500 кДа соответственно.

Литература

1. Production of yeast chitin-glucan complex from biodiesel industry byproduct / C. Roca [et al.] // Process Biochem. – 2012. – Vol. 47, № 11. – P. 1670–1675.

2. Унрод, В. И. Хитин- и хитозансодержащие комплексы из мицелиальных грибов: получение, свойства, применение / В. И. Унрод, Т. В. Солодовник // Биополімери і клітина. – 2001. – Т. 17, № 6. – С. 526–533.
3. Hong, Y. Characterization of a chitin-glucan complex from the fruiting body of *Termitomyces albuminosus* (Berk.) Heim / Y. Hong, T. Ying // *Int. J. Biological Macromol.* – 2019. – Vol. 134. – P. 131–138.
4. Гальбрайт, Л. С. Хитин и хитозан: строение, свойства, применение / Л. С. Гальбрайт // Соросов. образоват. журн. – 2001. – Т. 7, № 1. – С. 51–56.
5. Феофилова, Е. П. Хитин грибов: распространение, биосинтез, физико-химические свойства и перспективы использования / Е. П. Феофилова // Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. – М. : Наука, 2002. – С. 100–111.
6. Быкова, В. М. Сырьевые источники и способы получения хитина и хитозана / В. М. Быкова, С. В. Немцев // Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. – М. : Наука, 2002. – С. 7–23.
7. Куприна, Е. Э. Способы получения и активации хитина и хитозана / Е. Э. Куприна, С. В. Водолажская // Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. – М. : Наука, 2002. – С. 44–63.
8. Novel chitin/chitosan-glucan wound dressing: Isolation, characterization, antibacterial activity and wound healing properties / A. M. Abdel-Mohsen [et al.] // *Int. J. Pharmaceutics.* – 2016. – Vol. 510, № 1. – P. 86–99.
9. Чернова, В. В. Об особенностях вискозиметрического исследования хитозана в растворе уксусной кислоты / В. В. Чернова, И. Ф. Туктарова, Е. И. Кулиш // Интернет-конф. «Бутлеров. чтения». – Казань, 2013. – Т. 34. – С. 102–106.
10. Dilute solution properties of four natural chitin in NaOH/urea aqueous system / G. Li [et al.] // *Carbohydrate Polymers.* – 2010. – Vol. 80, № 3. – P. 970–976.
11. Оптическая активность и спектрофотометрические характеристики растворов хитозана, полученного из камчатского краба и арктической креветки / К. В. Реут [и др.] // *Вестн. МГТУ.* – 2013. – Т. 16, № 3. – С. 580–585.

**CHITIN-GLUCAN COMPLEXES OF MYCELIAL FUNGI
PENICILLIUM SOLITUM AND *ASPERGILLUS NIGER*:
PRODUCTION AND CHARACTERIZATION**

I. S. SURDAL¹, K. A. HUBCHYK¹, A. A. KASTSIANEVICH^{1, 2},
R. N. BIRUKOU¹, M. A. KAPUSTIN¹

¹*Institute of Microbiology, NAS of Belarus, Minsk, Belarus*

²*Belarusian State Technological University, Minsk, Belarus, Gubchikk@gmail.com*

Chitin-glucan complexes were recovered from mycelial fungi *Penicillium solitum* and *Aspergillus niger*, the yield and ash content of the derived specimens were determined. The absorbance spectra of the resulting chitin-glucan complexes and commercial chitosan in UV/visible wavelengths range were recorded and analyzed.

Поступила в редакцию 29.04.2020