

УДК 541.64:547.995.12

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ХИТИН-ГЛЮКАНОВОГО КОМПЛЕКСА ИЗ НАТИВНОЙ БИОМАССЫ ВЫСШИХ ГРИБОВ

© 2007 г. В. П. Ившин*, С. Д. Артамонова**, Т. Н. Ившина*, Ф. Ф. Шарнина**

*Марийский государственный университет
424000 Йошкар-Ола, пл. Ленина, 1

**Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук
119991 Москва, Ленинский пр., 31

Поступила в редакцию 07.12.2006 г.
Принята в печать 26.06.2007 г.

С помощью новой упрощенной методики, использующей хозяйственное мыло в качестве дегергента и мягкие реагенты, и двух общепринятых методов выделены и идентифицированы хитинсодержащие материалы из биомассы природных высших грибов вида *Armillariella mellea* Республики Марий Эл. Проведено сравнение их свойств со свойствами чистого хитина ракообразных. Прослежено изменение состава полупродуктов (содержание воды, минеральных, органических веществ, общего азота и D-глюкозамина) в процессе обработки. Продемонстрированы преимущества новой методики, позволяющей сохранять нативные свойства материала при выделении хитина. Показано, что гриб вида *Armillariella mellea* может быть потенциальным сырьем для получения хитина.

Хитин является основой скелетной системы, поддерживающей клеточную структуру насекомых, ракообразных, грибов, бактерий, дрожжей, диатомовых водорослей. Уникальность хитина заключается прежде всего в физиологической и биологической активности при отсутствии токсичности, способности к ионному обмену, волокно- и пленкообразованию, набуханию, селективной сорбции тяжелых металлов, радионуклидов и канцерогенных веществ из организма. Он представляет несомненный интерес для медицинской химии и является ценным сырьем для дальнейшего синтеза биологически активных веществ благодаря биосовместимости и биоразрушаемости с образованием N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкозамина. Кроме того, его применяют в качестве иммунностимулятора и компонента пищевых добавок. Поэтому выделение, идентификация и изучение физико-химических свойств природного полисахарида хитина – одно из приоритетных направлений исследований природных соединений.

E-mail: svetlana.artamonova@gmail.com (Артамонова Светлана Дмитриевна).

На сегодняшний день общепризнанным объектом для получения хитина и разработок новых методик выделения являются ракообразные. В то же время грибы как источник хитина обладают рядом преимуществ: высокой скоростью роста, минимальным содержанием минеральных веществ, возможностью использования отходов пищевой и целлюлозно-бумажной промышленности. А с учетом того, что хитин играет доминирующую роль в морфогенезе грибов, разработка методик выделения и изучение хитинсодержащих материалов приобретают большое значение. Молекула чистого хитина состоит из фрагментов N-ацетил-D-глюкозамина, соединенных между собой β -(1-4)-гликозидной связью. В клеточной стенке грибов хитин находится в виде хитин-глюканового комплекса (ХГК), который еще недостаточно изучен в отношении как химической структуры, так и физико-химических свойств. В общем виде строение ХГК может быть представлено формулой



Вопрос о характере связей хитина и глюканов в ХГК остается спорным. Согласно существующим в настоящее время данным [1, 2], ХГК – сложная система, в которой хитин связан с различными формами глюкана, причем основной цепью является хитин, а боковыми цепями – глюкан, если содержание хитина больше, и наоборот, основная цепь – глюкан, а боковые – хитин, если в составе превалирует глюкан. Не исключено также наличие в нативном комплексе свободного глюкана. Химический состав клеточной стенки грибов и соотношение между хитином и глюканом изменяются не только в зависимости от вида гриба, но и в зависимости от состава почвы, климатических условий, экологической обстановки местности, в которой данный вид произрастает, условий культивирования, что создает определенные трудности при выделении ХГК. Именно поэтому разработка методов получения хитина из высших грибов продолжает оставаться актуальной задачей.

Существующие в настоящее время методы выделения ХГК из грибов подразделяются на физико-химические и ферментативные [3], использующие неорганические реагенты достаточно высокой концентрации [4, 5] и реагенты средней концентрации совместно с синтетическими моющими средствами (стиральный порошок “Лотос”) [6], а также методы, в которых применяют органические растворители и детергенты [7]. Все указанные способы выделения хитина из грибной биомассы (кроме метода [4]) разработаны для выделения ХГК из микроскопических низших грибов и обладают определенными недостатками (трудоемкость процесса, применение концентрированных реагентов, приводящих к потере нативных свойств продукта, и т.д.). Также надо отметить, что для выделения хитина из грибов многие исследователи применяют в качестве исходного сырья искусственно культивированные грибы с заранее заданными параметрами состава питательной среды для выращивания мицелия.

В настоящей работе проведено сравнение физико-химических свойств хитинсодержащих ма-

териалов, выделенных из грибов вида *Armillariella mellea*, произрастающих в естественных условиях на территории Республики Марий Эл, с помощью разработанной нами методики [8], использующей хозяйственное мыло в качестве детергента и мягкие реагенты, а также двух общепринятых методов [4, 7]. Прослежено изменение состава полупродуктов (содержание воды, минеральных, органических веществ, общего азота и D-глюкозамина) в процессе обработки. Полученные комплексы биополимеров исследованы методами гравиметрии, пиролизной газовой хроматографии, ИК-Фурье спектроскопии и дифракции рентгеновских лучей в больших углах в сравнении с хитином животного происхождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве сырья для получения ХГК в настоящей работе использовали грибы вида *Armillariella mellea* (“опенок настоящий”) класса Basidiomycetes, собранные в Медведевском районе Республики Марий Эл осенью 2005 г. Выбор обусловлен широким распространением этого вида гриба. Биомассу грибов высушили на воздухе в тени в хорошо проветриваемом помещении, а затем измельчили на лабораторной мельнице. Объектом исследования служили образцы ХГК, выделенные по разработанной нами [8] четырехстадийной схеме последовательной экстракции ($\text{NaOH} \longrightarrow \text{HCl} \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{NaOH}$) и по общизвестным классическим методикам [4, 7].

Количество основного вещества, минеральных веществ и влагосодержание образцов определяли гравиметрическим методом. Качественный анализ на белок проводили с помощью чувствительных реакций: биуретовой реакции, кипячением пробы с разбавленной уксусной кислотой в присутствии хлорида натрия и с сульфасалициловой кислотой. Для определения общего количества азота $N_{\text{общ}}$ применяли метод фотоэлектроколориметрии с использованием реактива Несслера и метод Кильдаля. Содержание D-глюкозамина в гидролизате определяли фот-

Таблица 1. Характеристики ХГК гриба *Armillariella mellea*, выделенного по лабораторной методике [8]

ХГК	Цвет	Влажность, %	Зольность, %	N _{общ} , %	DGA, %	Хитин, %	N _x , %	N _{cb} , %	Белковые вещества, %	Выход, %
Норма	Бежево-розовый	8.0<	2.0<	7.0<	>15.0		6.89<	0.3≤	2.0≤	—
Исходная биомасса	Коричневый	12.30	7.80	3.94	8.20	9.30	0.64	3.30	20.63	—
Стадия 1	»	8.0	3.50	2.31	20.10	22.80	1.57	0.74	4.63	23.50
Стадия 2	»	6.50	0.70	2.48	22.50	25.50	1.76	0.72	4.50	18.80
Стадия 3	Светло-бежевый	7.60	0.80	2.38	27.80	31.50	2.17	0.21	1.31	11.70
Стадия 4	Белый	7.50	1.10	5.51	70.40	79.80	5.50	0.01	0.43	4.50

метрическим методом по Эльсону–Моргану. Содержание хитина X (%) в ХГК рассчитывали по формуле $X = DGA \times 1.13$ ($DGA - D$ -глюкозамин, 1.13 – коэффициент пересчета DGA на хитин) и находили с помощью пиролизной газовой хроматографии. Содержание азота хитина N_x в ХГК рассчитывали по формуле $N_x = x \times 6.89/100$ (коэффициент 6.89 – содержание азота в молекуле хитина, %). Количество азота в сопутствующих веществах N_{cb} вычисляли по формуле $N_{cb} = N_{общ} - N_x$. Количество остаточных белковых веществ $c_{бв}$ определяли по формуле $c_{бв} = N_{cb} \times 6.25$ (6.25 – коэффициент пересчета на содержание белка). Элементный анализ по азоту, углероду и водороду проводили на автоматическом анализаторе “Perkin-Elmer”.

Строение ХГК идентифицировали методами ИК-Фурье спектроскопии, дифракции рентгеновских лучей и пиролитической газовой хроматографии, сравнивая с хитином ракообразных. ИК-спектры регистрировали на ИК-Фурье спектрофотометре “VECTOR 22” фирмы “Bruker” в таблетках с КBr при 20°C. В качестве аналитических выбрали полосы 1650 cm^{-1} , соответствующую валентным колебаниям связи C=O карбонильной группы в амидах кислот (полоса Амид I), и полосу в области 1550 cm^{-1} , отвечающую сумме колебаний связей N–H и C–N в амидах (полоса Амид II).

Спектры ПГХ снимали на хроматографах “Кристалл 5000.2” и “Кристалл 2000М” с пиролитической ячейкой, адаптированной для исследования данных объектов. Пиролиз проводили в среде щавелевой кислоты при 600°C. Разделение вели на кварцевой капиллярной колонке ZB WAX (100% ПЭГ) размером 30 × 0.25 × 0.52. Идентификацию полимеров и количественный расчет содержания ацетамидных групп осуществляли по характеристическим пикам уксусной кислоты, ацетонитрила и ацетамида.

Рентгеновские дифрактограммы образцов получали на дифрактометре ДРОН-3М методом съемки “на просвет” в диапазоне углов $2\theta = 5^\circ - 50^\circ$ с использованием CuK_α -излучения, фильтрованного никелем. Образцы исследовали в виде порошков, помещенных в кювету с окошками из тонких пленок ПЭТФ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение ХГК из плодовых тел шляпочного гриба вида *Armillariella mellea* проводили посредством разработанной нами универсальной методики [8], основанной на методике Феофиловой [7] для мицелиальных грибов и модифицированной с учетом особенностей высших грибов, произрастающих в естественных условиях. Отличие данной методики от указанных выше методов [4, 7]

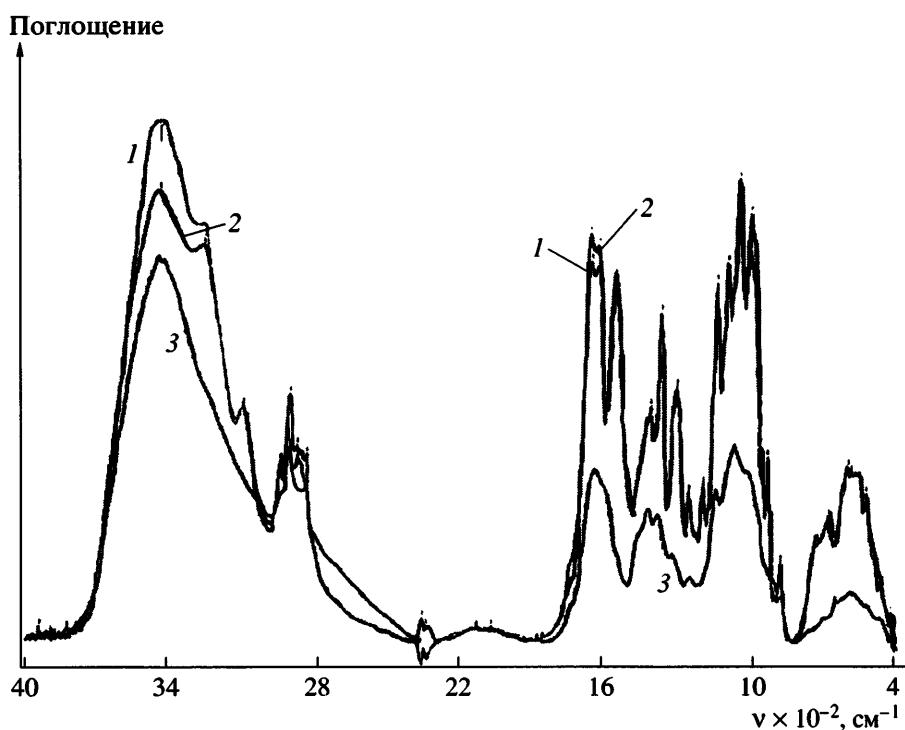


Рис. 1. ИК-спектры образцов хитина *Arthropoda* (1), ХГК *Armillariella mellea*, выделенного по лабораторной методике [8], (2) и хитозана рака (3).

состоит в том, что в ней используют неорганические реагенты довольно низкой концентрации (1–2%) и хозяйственное мыло в качестве детергента. Нами был получен ХГК с достаточно высоким выходом (4.5%), свойства которого сопоставимы со свойствами технического хитина ракообраз-

ных. Как видно из табл. 1, содержание хитина в ХГК резко увеличивается после четвертой стадии обработки, что связано, видимо, с протекающими на предыдущих стадиях процессами гидролиза и удаления сопутствующих веществ, которые способствуют доступу реагента к скелету ХГК. На

Таблица 2. Характеристики ХГК, полученных разными методами

Методика	Цвет	Зольность, %	N _{общ} , %	c, %	H, %	Хитин, %	N _x , %	N _{хитозан} , %	N _{св} , %	Хитозан, %	Глюкан, %	K*, %	Выход, %
ХГК													
Лабораторная	Белый	1.10	5.51	44.36	6.94	80.1	5.52	0	0	0	18.8	60	4.5
Шолля	Светло-серый	2.90	6.31	43.91	6.91	66.0	4.55	1.76	0	20.3	10.8	60	2.1
Феофиловой	Коричневый	1.00	3.15			37.1	2.63	0	0.52	0	62	57	9.3
Хитин Antrhopoda													
	Бежевый	1.80	6.71	44.67	7.29	52.0	4.62	2.09	0	24	–	67	–

* Степень кристалличности.

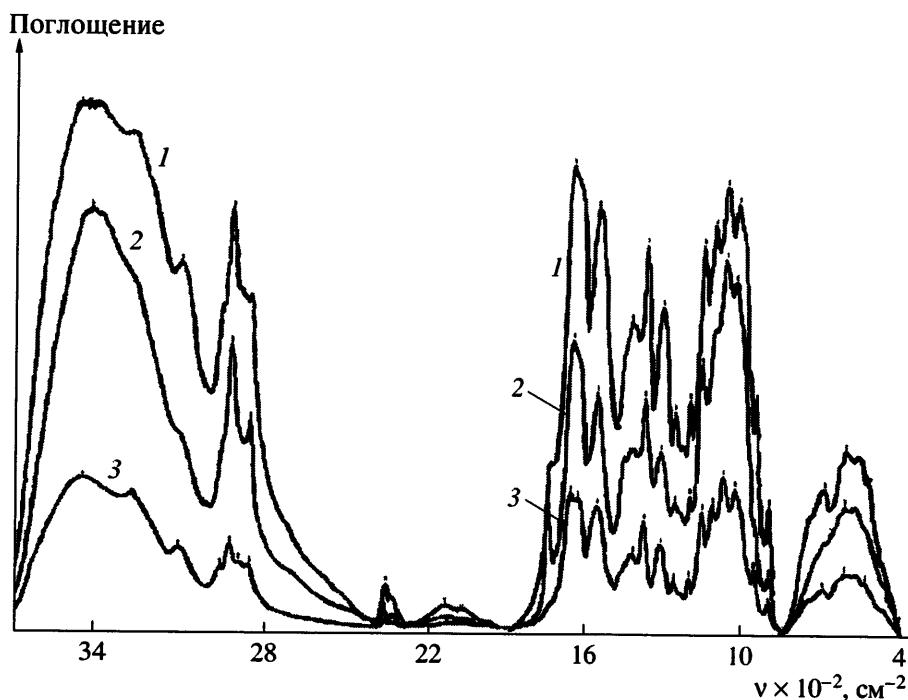


Рис. 2. ИК-спектры образцов ХГК *Armillariella mellea*, полученных по методикам Шолля [4] (1), Феофиловой [7] (2) и лабораторной методике [8] (3).

последней стадии удаляются остатки сложных трудно гидролизуемых природных соединений (протеинов, липидов, пигментов и т.д.) и растворимые в щелочах α -глюканы. Об этом свидетельствует и изменение содержания азота в системе: с повышением общего количества азота увеличивается количество азота хитина (особенно на последней стадии) и уменьшается количество азота сопутствующих белковых соединений. Существенного различия в ИК-спектрах образцов хитина Arthropoda и ХГК по основным характеристическим полосам хитиновых фрагментов не обнаружено (рис. 1).

С целью выделения ХГК из данного вида гриба была опробована разработанная Шоллем методика [4] извлечения хитина из высших грибов. Характеристики конечного продукта представлены в табл. 2. Недостатком этого метода является длительность процесса (60–80 ч). Кроме того, агрессивный характер обработки грибов приводит к значительной деструкции получаемого полимера. Несмотря на жесткие условия обработки, в образцах обнаружено повышенное со-

держание минеральных веществ. ИК-спектр образца (рис. 2, кривая 1) содержит характеристические пики при 1640 – 1550 см^{-1} , указывающие на ацетилирование хитина, и новый пик при 1590 см^{-1} , свидетельствующий о деацетилировании получаемого продукта. На это указывают также завышенное общее количество азота и достаточно большое содержание хитозана (20.3%) в ХГК. Несомненно, что взаимодействие грибной биомассы с концентрированными реагентами при высокой температуре приводит к нарушению нативных свойств хитиновых фрагментов. Происходит деструкция полимера за счет деацетилирования и, возможно, за счет дезаминирования. Содержание ацетамидных групп относительно невысокое (66.0%), а степень ацетилирования хитин-хитозановых фрагментов достигает 76.5%. Поэтому с полной уверенностью можно утверждать, что по методике [4] мы получаем хитин-хитозан-глюкановый комплекс, а не ХГК. Нужно заметить, что после депигментации перманганатом калия резко повышается содержание минеральных веществ. Это подтверждают литературные данные [3], которые свиде-

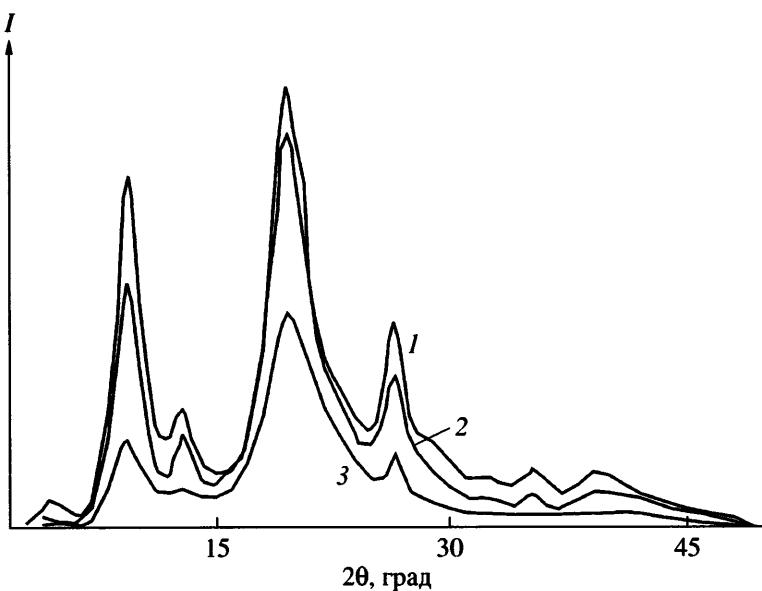


Рис. 3. Дифрактограммы образцов ХГК *Armillariella mellea*, полученных по методике Шолля [4] (1), лабораторной методике [8] (2) и методике Феофиловой [7] (3).

тельствуют о том, что ХГК является более эффективным сорбентом по отношению к ионам марганца Mn^{2+} (85%) по сравнению с хитином животного происхождения (5–10%).

При использовании методики Феофиловой [7], разработанной на основе общепринятых способов получения хитина из грибов, был получен ХГК коричневого цвета (табл. 2) с достаточно большим выходом (9.3%). Данный метод достаточно быстрый (~4 ч), однако включает обработку большим количеством спирта. Поэтому хитин-содержащий материал при сушке на воздухе быстро окисляется, приобретая темно-коричневую окраску, а слишком мягкие условия выделения не позволяют максимально полно отделить хитин от протеинов, что подтверждает положительная проба на белок. Поскольку данная методика была разработана для получения хитина из низших грибов, в ней не уделяется достаточного внимания депигментации и не учитывается высокое содержание меланина в высших грибах. В результате конечный продукт представляет собой не ХГК, а комплекс хитина с пигментами, называемый хитин-глюкан-пигментным комплексом. Характеристические пики в ИК-спектре образца имеют небольшую интенсивность, что свидетель-

ствует о малом содержании хитина. Это обусловлено недостаточно полным удалением белков и пигментов и может приводить к завышенному содержанию $N_{общ}$ в ХГК, которое приходится на долю сопутствующих веществ и составляет 0.52%. Тем не менее, несмотря на небольшое содержание ацетамидных групп в целевом продукте (37.1%), хитин-хитозановые фрагменты максимально ацетилированы (100%) и сохраняют-native свойства полимера. В то же время полярные органические растворители, применяемые при выделении полимера, негативно действуют на хитин, адсорбируясь на нем. Полное удаление из полимера связанных с ним водородными связями полярных органических молекул осуществимо лишь из тонких пленок в высоком вакууме и при повышенных температурах.

Сравнительные свойства конечных целевых продуктов, полученных различными методами с применением химических реагентов разной концентрации, представлены в табл. 2. Видно, что конечные продукты содержат различное количество хитина, хитозана, глюкана и минеральных веществ, причем лучшими характеристиками обладает материал, полученный по разработанной нами методике [8]. При этом наибольшее сход-

ство с хитином *Arthropoda* имеет образец, выделенный по жесткой методике [4]. При извлечении хитина из панциря ракообразных также применяют очень жесткие концентрированные реагенты из-за наличия в его составе достаточно большого количества белков, жиров и минеральных веществ. Видимо, при применении концентрированных кислот и щелочей идет процесс деацетилирования, на что указывают низкое количество хитина в образце (67%) и достаточно высокое содержание хитозана (24%). Определение по ГОСТу доли основного вещества (нерасторимый остаток в щелочи) в хитине указывает на высокое качество хитина краба. Но в то же время видно, что в сумме хитин и хитозан составляют 91%. Такое расхождение может быть объяснено наличием остаточных примесей в материале.

Надо отметить, что все хитинсодержащие образцы и хитин краба имеют аналогичные ИК-спектры, пиrogramмы и дифрактограммы (рис. 3), которые отличаются величиной относительной интенсивности, площадью и шириной пиков. Образцы ХГК, выделенные из грибов разными методами, характеризуются более низкой степенью кристалличности, чем хитин краба, для которого она составляет 67%. Сравнение показывает, что хитин, полученный в мягких условиях, имеет наименее упорядоченную структуру и большую долю аморфных областей. Хитинсодержащие материалы различаются и по степени ацетилирования хитин-хитозановых фрагментов. Полностью ацетилированы образцы, выделенные в щадящих условиях (по универсальной и мягкой методикам). Наименьшее число ацетильных групп у хитина краба. Элементный анализ указывает на повышенное содержание углерода и водорода в образцах хитина краба и ХГК, полученного в жестких условиях. И наоборот, ХГК, выделенный по универсальной методике, по содержанию этих элементов напоминает чистый хитин.

Таким образом, в работе по трем различным методикам выделены и идентифицированы образцы ХГК из гриба вида *Armillariella mellea*. Приведенные результаты свидетельствуют о преимуществах универсальной методики, позволяющей сохранить нативные свойства материала при выделении хитина. Использование хозяйственного мыла в качестве детергента дает возможность значительно сократить число обработок кислотами и щелочами и в достаточной степени снизить их концентрацию. Установлено, что в хитинсодержащих образцах, полученных с применением различных методик, имеются заметные различия в физико-химических свойствах. Обнаружено, что хитин *Arthropoda* при извлечении не только деацетилируется, но и дезаминируется. Показано, что гриб вида *Armillariella mellea*, произрастающий в природных условиях на территории Республики Марий Эл, может служить в качестве сырья для получения хитинсодержащего материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Siestma J.H., Wessels J.G.H.* // *J. Gen. Microbiolog.* 1979. V. 114. P. 95.
2. *Kollar R., Petracova E., Ashwell G., Robbins P.W., Cabit E.* // *J. Biolog. Chem.* 1995. V. 270. № 3. P. 1170.
3. Феофилова Е.П. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / Под ред. Скрябина К.Г., Вихоревой Г.А., Варламова В.П. М.: Наука, 2002. С. 368.
4. Губен И. Методы органического синтеза. М.: Госхимиздат, 1934. Т. 3.
5. Канарская З.А. Автореф. дис. ... канд. техн. наук. Казань: Марийский гос. техн. ун-т, 2000.
6. Котляр М.Н. Автореф. дис. ... канд. техн. наук. Казань: Марийский гос. техн. ун-т, 2001.
7. Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С. // Микробиология. 1995. Т. 64. № 1. С. 27.
8. Алексеева И.В., Ившина Т.Н., Шарнина Ф.Ф. // Матер. науч.-практич. конф. "Студенческая наука и XXI век". Йошкар-Ола, 2005. С. 219.

Methods for Isolation of Chitin–Glucan Complexes from Higher Fungi Native Biomass

V. P. Ivshin^a, S. D. Artamonova^b, T. N. Ivshina^a, and F. F. Sharnina^b

^a Mari State University,
pl. Lenina 1, Ioshkar Ola, 424000 Russia

^b Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences,
Leninskii pr. 31, Moscow, 119991 Russia
e-mail: svetlana.artamonova@gmail.com

Abstract—Chitin-containing materials have been isolated from the biomass of *Armillariella mellea* natural higher fungi (the Mari El republic) and have been identified with the use of a new simplified procedure based on a domestic detergent and soft reagents and two standard methods. The properties of the materials are compared with those of pure chitin isolated from Crustacea. Variations in the semiproduct composition (the content of water; mineral and organic substances; total nitrogen; and *D*-glucosamine) during the isolation process are monitored. The advantages of the new procedure are demonstrated; it enables one to preserve the native properties of the material in the course of chitin isolation. It has been shown that *Armillariella mellea* fungus may be used as a potential raw material for chitin production.