

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ХИТОЗАНА ИЗ МИКРОМИЦЕТОВ

Липай Е. В., Капустин М. А., Чубарова А. С.

Кафедра иммунологии и экологической эпидемиологии
Международный государственный экологический институт имени
А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета,
г. Минск, Республика Беларусь

Актуальность. Микромицет *Aspergillus niger* является признанным продуцентом лимонной кислоты и широко используется при ее промышленном производстве. Однако в процессе получения кислоты побочным продуктом является мицелий этого гриба. С другой стороны, мицелий гриба является богатым источником хитозана – природного биополимера, который, обладая уникальными химическим составом и биологическими свойствами, такими как биосовместимость, нетоксичность, биodeградируемость, сорбционность и прочее, широко используются в медицине. Самым распространенным источником получения хитозана в мире является хитиновый панцирь ракообразных, но в Республике Беларусь этот источник не распространен. В связи с этим, актуальным является разработка способа получения хитозана из мицелия микромицета *Aspergillus niger*, в виду дешевизны сырья и с целью его вторичной переработки.

Цель. Отработка способа комплексной переработки мицелия *Aspergillus niger* с получением препарата хитозана и меланина.

Материалы и методы исследования. Источником получения хитозана служил мицелий *Aspergillus niger* в культуральной среде, который был предоставлен Скидельским сахарным комбинатом, после выделения лимонной кислоты. Реагенты: 2% раствор гидроксида натрия, 50% раствор гидроксида натрия, 2% раствор уксусной кислоты.

Предварительно мицелий вместе с культуральной средой лиофильно высушивали и получение хитозана осуществляли из лиофилизированной биомассы мицелия в три стадии.

Для расчёта выхода хитозана из биомассы *Aspergillus niger*, полученный препарат хитозана многократно промывали на фильтре дистиллированной водой до достижения нейтральных

значений pH. Избыток влаги удаляли на фильтре Шотта. После этого препарат хитозана замораживали и лиофильно высушивали в течение 12 часов. Полученный сухой продукт растирали в ступке до получения однородного порошка и проводили определения количества влаги в полученном продукте, гравиметрическим методом. Для чего взвешивали лиофильно высушенный препарат хитозана и выдерживали навеску в сушильном шкафу при температуре 105 °С до постоянного веса.

Качество полученного хитозана подтверждали путём растворения навески препарата в 2% уксусной кислоте. При растворении образовывался однородный слабо-жёлтый раствор, без примесей и нерастворимых частиц.

Результаты и их обсуждение. В ходе работы была проведена комплексная переработка отходов производства лимонной кислоты Скидельского сахарного комбината, включавшая получение меланина и препарата хитозана в три стадии. На первом этапе работы был отработан способ получения меланина и хитозана, с последующей характеристикой полученного препарата хитозана. В дальнейшем планируется изучение физико-химических свойств полученного меланина.

Первая стадия получения хитозана – депигментация мицелля. Для этого 10 г лиофилизированного мицелля помещали в стеклянный стакан объемом 500 мл и добавляли 0,5% раствор аммиака. Обработку мицелля проводили при объемных соотношениях сырья: аммиак – 1:10. Экстракцию меланинов из мицелля (депигментация) проводили в течение 12 часов при 37°С в термостатируемых условиях. Так как меланины растворимы в щелочной среде, то данного времени было достаточно для полной депигментации мицелля *Aspergillusniger*. Следует отметить, что депигментацию проводили в мягких условиях, с использованием раствора аммиака. Эти условия были подобраны для дополнительного получения нативных меланинов с целью дальнейшего их исследования, так как известно, что экстрагент и условия экстракции сильно влияют на физико-химические свойства полученных меланинов [1]. После депигментации мицеллий отфильтровывали на бумажном фильтре, промывали водой до нейтральных значений pH, и переходили ко второй стадии получения хитозана.

Вторая стадия включала: обработку депигментированного мицелия 2% раствором гидроксида натрия в течение 1 часа, при температуре 90°C. В процессе обработки проходил щелочной гидролиз белков мицелия и получение хитина из клеточной стенки микромицетов.

Затем проводили третью стадию получения хитозана – деацетилирование полученного в результате второй стадии хитина из клеточной стенки микромицетов. Реакцию деацетилирования проводили 50% раствором гидроксида натрия, при температуре 95–100°C, в течение 4 часов. Деацетилирование позволяет получить растворимый полимер D-глюкозамина – хитозан. Реакция деацетилирования сопровождается одновременным разрывом гликозидных связей полимера. Таким образом, хитозан представляет собой полидисперсные по молекулярной массе полимер D-глюкозамина, содержащий 5–15% ацетамидных групп, а также до 1% групп, соединённых с аминокислотами и пептидами.

Предложенный метод получения хитозана является эффективным и позволяет получить из мицелия *Aspergillus niger* целевую субстанцию с выходом 25% от массы сухого мицелия. Содержание влаги в конечном препарате хитозана составило не более 0,5%.

Важнейшей характеристикой хитозана является степень деацетилирования, определяемая как отношение количества звеньев D-глюкозамина к N-ацетил-D-глюкозамина. Степень деацетилирования влияет на физико-химические свойства хитозана, в частности на его растворимость в кислоте. При степени деацетилирования 70% хитозан становится растворимым в кислотах.

Было показано, что при растворении 2 граммов полученного препарата хитозана в 2% уксусной кислоте образуется прозрачный раствор, без видимого присутствия нерастворимых частиц, что свидетельствует о степени деацетилирования полученного хитозана – не менее 70%.

Выводы. Предложенная комплексная переработка мицелия *Aspergillus niger* позволяет получить препарат хитозана с достаточно высоким выходом – 25% от массы сухого мицелия и меланина. Содержание влаги в конечном препарате хитозана составляет не более 0,5%. В полученном препарате хитозан обладает

степенью деацетилирования не менее 70%. Полученные препарат хитозана хорошо растворяется в 2% уксусной кислоте с образованием прозрачного светло-желтого раствора, без видимого присутствия нерастворимых частиц.

Таким образом, отработанная технология обеспечивает получение хитозана высокого качества из доступного и дешевого местного сырья, который способен составить конкуренцию аналогичным продуктам на современном рынке. А также позволит осуществить комплексную вторичную переработку отходов производства лимонной кислоты.

Литература

1. Кузнецова, О. Ю. Сорбционная способность меланинов чаги / О. Ю. Кузнецова // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. – № 23. – С. 136–138.
2. Быкова, В. М. Сырьевые источники и способы получения хитина и хитозана: Хитин, его строение и свойства / В. М. Быкова, С. В. Немцев // Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. – М.: Наука, 2013. – 23 с.
3. Гальбрайх, Л. С. Хитин и хитозан: строение, свойства, применение / Л. С. Гальбрайх // Соровский образовательный журнал. – 2010. – С. 51–56.
4. Котляр, М. Н. Метод выделения и модификации хитин-глюканового комплекса из биомассы *Aspergillus niger*. – Казань, 2008. – 20 с.
5. Опытнo-промышленная установка для получения хитин-минерального комплекса «Хизитэл» электрохимическим способом / Е. Э. Куприна и [др]. // Материалы Восьмой Международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана», Казань 12–15 июня 2006 г. – 36 с.
6. Лопатин, С. В. Хитозан в хроматографии: Хитин, его строение и свойства / С. В. Лопатин // Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. – М.: Наука, 2010. – С. 247–253.