

УДК 547.541.64.995.12

Ф. Ф. Шарнина**F. F. Sharnina***Марийский государственный университет, г. Йошкар-Ола**Mari State University, Yoshkar-Ola***ХИТИН ПОДМОРА ПЧЕЛ И ХИТИН-ГЛЮКАНОВЫЙ КОМПЛЕКС ВЫСШИХ ГРИБОВ,
ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В РЕСПУБЛИКЕ МАРИЙ ЭЛ —
КАК ВОЗМОЖНЫЙ ИСТОЧНИК ПОЛУЧЕНИЯ D(+)-ГЛЮКОЗАМИНА ГИДРОХЛОРИДА****DEAD BEE CHITIN AND CHITIN-GLUCAN COMPLEX OF HIGHER FUNGI GROWING
IN MAR EL AS THE POSSIBLE SOURCE OF D(+) GLUCOSAMINE HYDROCHLORIDE**

Изучены особенности кислотного гидролиза хитин-глюкановых комплексов высших грибов и подмора пчел. Разработана технология выделения и очистки из гидролизата *D(+)*-глюкозамина гидрохлорида высокого качества. Состав, свойства и чистота продукта проанализированы с использованием комплекса физико-химических методов. Выход конечного продукта составил 20–60 % в зависимости от содержания хитина в образцах ХГК. Полученный аminosахар представлял собой белый кристаллический порошок без запаха, легко растворимый в воде, малорастворимый в спирте и нерастворимый в хлороформе и в других органических растворителях и по основным показателям соответствовал качеству стандартного *D(+)*-глюкозамина гидрохлорида.

Acid hydrolysis peculiarities of chitin-glucan complexes of higher fungi and dead bee chitin have been studied. The technology of extraction and purification of high quality *D (+)*-Glucosamine hydrochloride from hydrolyzate was developed. The composition, properties, and purity of the product were analyzed using a complex of physical and chemical methods. The yield of final purified product was 20–60 % depending on the content of chitin in the samples of CGC. As a result we had amino sugar which was white crystalline powder, odorless, readily soluble in water, slightly soluble in alcohol and insoluble in chloroform and in other types of organic solvents, which corresponds to the quality of standard *D (+)*-Glucosamine hydrochloride.

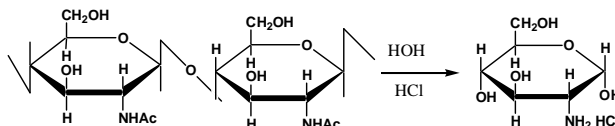
Ключевые слова: грибы, подмор пчел, хитин, хитин-глюкановый комплекс, глюкозамин.

Key words: higher fungi, dead bees, chitin, chitin-glucan complex, Glucosamine.

Аминосахар *D*-глюкозамин (ДГА) является строительным материалом практически всех суставных смазок и тканей амортизаторов человека, которые известны как гликозаминогликаны, включающие гиалуроновые кислоты, хондроитин сульфаты и др., и протеогликаны, образующиеся из них. Поскольку ДГА при хранении на воздухе и даже в плотно закрытом сосуде быстро окисляется и разлагается, на практике обычно используют его хлоргидрат, 2-дезоксид-2-амино-β-*D*-глюкоза гидрохлорид [6; 7].

Солянокислый *D*-глюкозамин (ДГА·НСl) является основной субстанцией ценных лекарственных препаратов, используется для лечения артритов, артрозов, инфекционных и онкологических заболеваний, применяется в качестве иммуностимуляторов и компонентов пищевых добавок. Поэтому на сегодняшний день актуальными задачами являются как поиск новых источников получения ДГА, так и совершенствование способов выделения ДГА·НСl.

Технология репаративного выделения *D(+)*-глюкозамина гидрохлорида основана на полном кислотном гидролизе природного полисахарида хитина в концентрированной соляной кислоте с последующей очисткой гидролизата и перекристаллизацией продукта [1; 7]. При гидролизе происходит расщепление ацетамидных и гликозидных связей, что приводит к процессам деацетилирования и деполимеризации [6]:



В настоящее время основным сырьем для получения ДГА·НСl служит хитин ракообразных (креветка, краб, криль). В клеточной стенке грибов хитин содержится в виде хитин-глюканового комплекса (ХГК), который по своим показателям ни в чем не уступает хитину и является более дешевым и доступным сырьем для получения ДГА·НСl [3; 8; 9].

Данная работа посвящена разработке способа выделения ДГА·НСl из ХГК высших грибов и хитина подмора пчел. С этой целью проведено исследование процесса кислотного гидролиза ХГК, выделения и очистки из гидролизата целевого продукта. Варьировались температурный режим, кислотность, продолжительность гидролиза и приемы отмывки от побочных продуктов кислотного гидролиза. На основании полученных результатов был разработан способ выделения ДГА·НСl из ХГК. Промывание целевого продукта проводилось холодной концентрированной соляной кислотой (от -10 °С до -15 °С). Выход аminosахара составил 20–60 % (от ХГК) в зависимости от класса, вида и формы плодового тела высших грибов из которого был выделен ХГК. Состав продукта

и его химическая чистота исследовались методами элементного анализа, ТСХ, ИКС, ПМР, определением удельного угла вращения, температуры плавления и доли основного вещества.

Методика. Материалы. В качестве сырья для выделения D(+)-глюкозамин гидрохлорида использовали ХГК из высших грибов (Марий Эл), *Armilariella mellea* (опенок настоящий), *Morchella esculenta* (сморчок настоящий), *Cantharellus cibarius* (лисичка настоящая), *Lactarius rufus* (груздь горький), *Amanita muscaria* (мухомор красный), *Macrolepiota excoriata* (гриб-зонтик белый), *Suillus bovinus* (козляк, решетник). Также для получения ДГА·НСІ были использованы хитин ракообразных (*Arthropoda*) и хитин подмора пчел (*Apis Mellifera*), для сравнения процентного выхода и качества ДГА·НСІ, выделенного из хитина различного происхождения. Выделение ХГК из высших грибов и хитина из подмора пчел проводили по четырехстадийной методике, разработанной ранее автором данного сообщения и описанной в работах [2; 3]. Данная методика выделения хитина предусматривает поэтапное удаление из хитинсодержащей биомассы (плодовые тела некоторых видов высших грибов и подмор пчел), сопутствующих хитину веществ: протеинов, липидов, пигментов (в том числе и меланинов), жиров, минеральных веществ [2; 3]. В ходе последовательного проведения четырехстадийной реакции из хитинсодержащей биомассы выделяются чистые образцы в виде порошка (ХГК грибов) или хлопьев (хитин подмора пчел), имеющие цвет от светло-бежевого до белого, нерастворимые в щелочах, разбавленных кислотах, в органических растворителях, в воде и сильно набухающий в ней, сопоставимые с характеристиками стандартного хитина из ракообразных (*Arthropoda*), и отвечающие техническим требованиям (ТУ 15-02-538-89 и 15-01-472-87).

Получение D(+)-глюкозамина гидрохлорида. В трехгорловую колбу, снабженную электромешалкой, обратным холодильником и термометром, помещали 10 г сухого (с учетом влажности) измельченного ХГК, добавляли 100 мл концентрированной HCl ($\rho = 1,19 \text{ г/см}^3$) и при непрерывном перемешивании нагревали на водяной бане при 70–75 °С в течение 3,5–4 ч. Затем колбу с реакционной смесью охлаждали, добавляли 100 мл дистиллированной воды и 2,5–3 г активированного угля. Реакционную массу продолжали нагревать при температуре 50 °С еще в течение 1–1,5 ч при непрерывном перемешивании. Охлажденную реакционную смесь черного цвета отфильтровывали на воронке Шотта или на воронке Бюхнера через плотный капрон в четыре слоя. Фильтрат светло-желтого оттенка упаривали в вакууме водоструйного насоса или на водяной бане при 40 °С до объема 10–15 мл. После охлаждения выпавшие кристаллы ДГА·НСІ отделяли от жидкости с помощью стеклянного фильтра или воронки Бюхнера через капроновую ткань в четыре слоя. Кристаллы промывали на воронке Бюхнера холодной концентрированной HCl (от -10 °С до -15 °С),

далее поочередно этиловым спиртом и диэтиловым эфиром. Полученные белого цвета кристаллы ДГА·НСІ сушили на воздухе до постоянной массы.

Методы исследования. В качестве стандартных образцов сравнения применяли: D(+)-глюкозамин гидрохлорид субстанция (ФСП 42-0314-1478-01, Научно-технический центр ЭКОБИОТЕК, г. Мурманск), D(+)-глюкозу (ч. д. а., ГОСТ 6038-74), D(-)-фруктозу (ч., ТУ 6-09-1979-77) и D(+)-маннозу (ч., ТУ 6-09-07-666-76), технический хитин ракообразных — *Arthropoda* (ГОСТ 7630-87, г. Владивосток).

Анализ и степень чистоты ДГА·НСІ из ХГК высших грибов проводили методом тонкослойной хроматографией (ТСХ) на силикагельсодержащих пластинках «Silufol-R» и «Silufol-UV 254» (Avalier, Czechoslovakia) в сравнении со стандартами (D(+)-глюкозамин гидрохлорид субстанция, глюкоза, фруктоза, манноза). С целью исключения ошибок, контроль процесса отделения ДГА·НСІ от нейтральных сахаров осуществляли методом ТСХ в нескольких подобранных нами системах растворителей: 1) этанол/ацетон (3 : 2); 2) изопропанол / ацетон/ 0,2 М молочная кислота (6 : 3 : 1); 3) этанол / ацетон / гексан (2 : 2 : 1), и по данным эксперимента определяли R_f (Ratio of Fronts, отношение фронтов или фактор замедления).

Проявление хроматограмм осуществляли в парах йода или путем опрыскивания (0,25 мл свежеперегнанного анилина + 0,25 г дифениламина в 25 мл ацетона + 1 мл ортофосфорной кислоты) с дальнейшим нагреванием хроматографических пластинок в сушильном шкафу при температуре не более 70 °С.

Количество доли основного вещества в ДГА·НСІ определяли фотометрическим методом по Эльсону – Моргану [5; 8]. Элементный анализ по азоту, углероду и водороду проводили на автоматическом анализаторе (Perkin Elmer C H N S/O Analyzer 2400). Удельное вращение образцов солянокислого глюкозамина определяли на поляриметре СМ-3 УХЛ 4.2 до и после установления равновесия α - и β -форм в течение суток. ИК-спектры снимали на ИК-фурье-спектрофотометре «VECTOR 22» фирмы «Bruker», ПМР-спектры снимали в Институте органической химии им. Зелинского (г. Москва). Температуру плавления образцов ДГА·НСІ и смешанного плавления определяли на столике Кофлера («Voëtius», Германия). Влажность и зольность образцов определяли гравиметрическим методом по ТУ 15-02 538-89. Подлинность продуктов определяли по качественной реакции с реактивом Эрлиха [5; 8].

Результаты и их обсуждение. Для получения ДГА·НСІ детально исследовались условия кислотного гидролиза ХГК гриба вида *A. mellea* (кислотность, соотношение хитин/кислота, время, температура) и способы очистки материала от побочных продуктов. На основании результатов исследования различных факторов была разработана технология получения солянокислой соли природного аминсахара.

Трудность выделения ДГА·НСІ из ХГК заключалась в том, что в гидролизате ХГК присутствовал

не только ДГА•НСІ, но и достаточное количество глюкозы, фруктозы и даже маннозы, хорошо растворимых в воде и нерастворимых ни в одном из органических растворителей, что затрудняло их разделение. Большая часть примесей оставалась в растворе, а часть выпадала в осадок вместе с целевым продуктом. Данные сахара можно разделить методом перекристаллизации в разбавленном растворе спирта, но это приводит к сильному снижению выхода целевого продукта. Применение для этой цели разных хроматографических колонок не перспективно, так как в случае промышленного синтеза препарата можно столкнуться как с проблемами материального характера, так и с трудностями в подборе оборудования. Было установлено, что солянокислый D-глюкозамин плохо растворим, а нейтральные сахара (глюкоза, фруктоза, манноза) прекрасно растворяются в холодной концентрированной соляной кислоте. Поэтому данная проблема была решена путем промывания осадка ДГА•НСІ холодной (от -10 °С до -15 °С) концентрированной НСІ (контроль осуществляли методом ТСХ).

Таким образом, из гидролизата ХГК гриба вида *A. mellea* препаративно был выделен ДГА•НСІ с использованием описанного выше метода. Выход целевого продукта составил 50 % от ХГК (табл. 1).

Полученный ДГА•НСІ гриба *A. mellea* по основным показателям качества соответствовал качеству стандартного ДГА•НСІ субстанции (ФСП 42-0314-1478-01) и представлял собой белый кристаллический порошок без запаха, легко растворимый в воде, малорастворимый в спирте и нерастворимый в хлороформе и в других органических растворителях. Реакция с реактивом Эрлиха была положительной, температура плавления 210 °С с разложением, значение удельного вращения после установления равновесия α - и β -форм в течение суток $[\alpha_D^{20}] = 72,5^\circ$ (табл. 1), что соответствует литературным данным [1; 7].

Таблица 1 — Характеристики образцов солянокислого D-глюкозамина различного происхождения

DGA • HCl хитина различного происхождения	Наименование показателей				Доля основного вещества, %
	DGA • HCl (выход), %	температура плавления, T °С	$[\alpha_D^{20}]$, ° в воде	R_f	
DGA • HCl(станд.)	–	210–211	+72,5	0,52	98,0
Arthropoda	68,5	209–210	+72,5	0,53	97,8
Cantharellus cibarius	57,8	210	+72,5	0,52	97,9
Armillariella mellea	50,5	210	+72,5	0,52	97,8
Macrolepiot. exco-riate	46,8	210–211	+72,0	0,53	97,6
Lactarius rufus	42,4	210–211	+72,5	0,52	97,5
Amanita muscaria	43,7	209–210	+72,0	0,51	97,5
Suillus bovinus	40,3	210–212	+72,0	0,51	97,2
Morchella esculenta	23,8	209–210	+72,5	0,52	97,9
Apis mellifica	71,3	210	+72,5	0,52	98,1

Результаты ТСХ во всех трех системах растворителей свидетельствовали о наличии в полученном продукте одного вещества — ДГА•НСІ. На хроматографических пластинках наблюдалось по одному пятну красно-бурого цвета, что подтверждает достаточную степень чистоты соли глюкозамина. Факторы замедления (R_f) ДГА•НСІ гриба *A. mellea* во всех трех системах растворителей идентичны с R_f стандартного образца ДГА•НСІ (ФСП 42-0314-1478-01) и равны — 0,52 (табл. 1).

Данные элементного анализа по азоту, углероду и водороду ДГА•НСІ гриба *A. mellea* и стандартного образца одного порядка и показывают достаточно хорошую сходимость с теоретически рассчитанными значениями (табл. 2).

Таблица 2 — Элементный анализ образцов солянокислого D-глюкозамина различного происхождения

DGA • HCl хитина различного происхождения	Содержание, %		
	углерода	водорода	азота
DGA • HCl (теор. расч.)	33,41	6,49	6,49
DGA • HCl (стандарт)	33,44	6,96	6,39
Cantharellus cibarius	33,40	6,67	6,39
Armillariella mellea	33,42	6,83	6,39
Amanita muscaria	33,44	6,82	6,47
Morchella esculenta	33,43	6,67	6,45

Строение ДГА•НСІ гриба *A. mellea* подтверждено методом ИК-спектроскопии в сравнении с ИК-спектром стандартного ДГА•НСІ (табл. 3, рис. 1 и 2). Сравнение основных характеристических полос поглощения образца ДГА•НСІ гриба *A. mellea* и стандартного образца показало идентичность препаратов (табл. 3).

Таблица 3 — Данные ИК-спектра D-глюкозамина хлоргидрата, полученного из хитина различного происхождения

Характеристические полосы поглощения	Литератур. данные, см ⁻¹	ν , см ⁻¹		
		Arthropoda	<i>A. mellea</i>	<i>Apis Mellifera</i>
ОН...О (связ.)	3300 ш.	3297 ш.	3301 ш.	3300
NH (связ.)	3041 сл.	3040 сл.	3042 сл.	3041
NH (дефор.)	1583 с.	1584 с.	1583 с.	1583
С-О-Н	1419 ср.	1421 ср.	1418 ср.	1419
С-N (вал.)	1247 с.	1248 с.	1247 с.	1247
С-О	1094	1094	1094	1094
С-О-С	1066	1066	1066	1066

Разработанная методика выделения ДГА•НСІ из ХГК *A. mellea* была применена для кислотного гидролиза ХГК ряда видов высших грибов, хитина из подмора пчел (*Apis Mellifera*) и ракообразных (*Arthropoda*).

Характеристики и элементный состав солянокислого D-глюкозамина, выделенного из хитина различного происхождения, представлены в таблице 1 и 2.

Выход конечного продукта составляет 20–60 % в зависимости от вида, класса и формы плодового тела высших грибов, что связано с различным содержанием хитина в ХГК. В то же время процентный выход образцов ДГА·НСІ хитина ракообразных (*Arthropoda*) и подмора пчел (*Apis Mellifera*) на порядок выше, и составляет 68,5 и 71,3 % соответственно. Данный факт можно объяснить тем, что из хитинсодержащей биомассы *Arthropoda* и *Apis Mellifera* выделяется чистый хитин, который не связан ковалентной связью с глюкозами как в ХГК, выделяемый из биомассы высших грибов.

Обращает на себя внимание наименьший процентный выход (23,8 %) солянокислого D-глюкозамина из ХГК гриба вида *Morchella esculenta* (сморчок настоящий). Это можно объяснить тем, что данный вид гриба относится к классу *Ascomycetes*, тогда как остальные вышеприведенные виды грибов относятся к классу *Basidiomycetes*.

Исследования показали, что температура плавления с разложением, удельное вращение и содержание основного вещества в образцах соответствует литературным данным [1; 7].

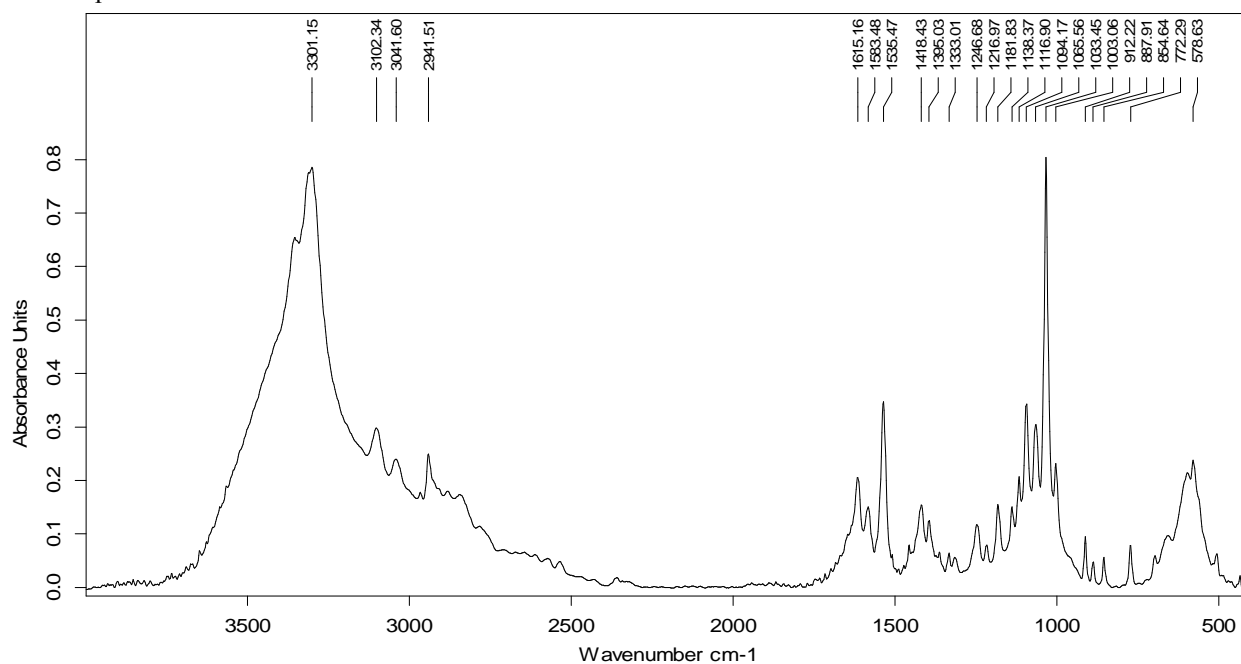


Рис. 1 — ИК-спектр ДГА·НСІ *Armillariella mellea*

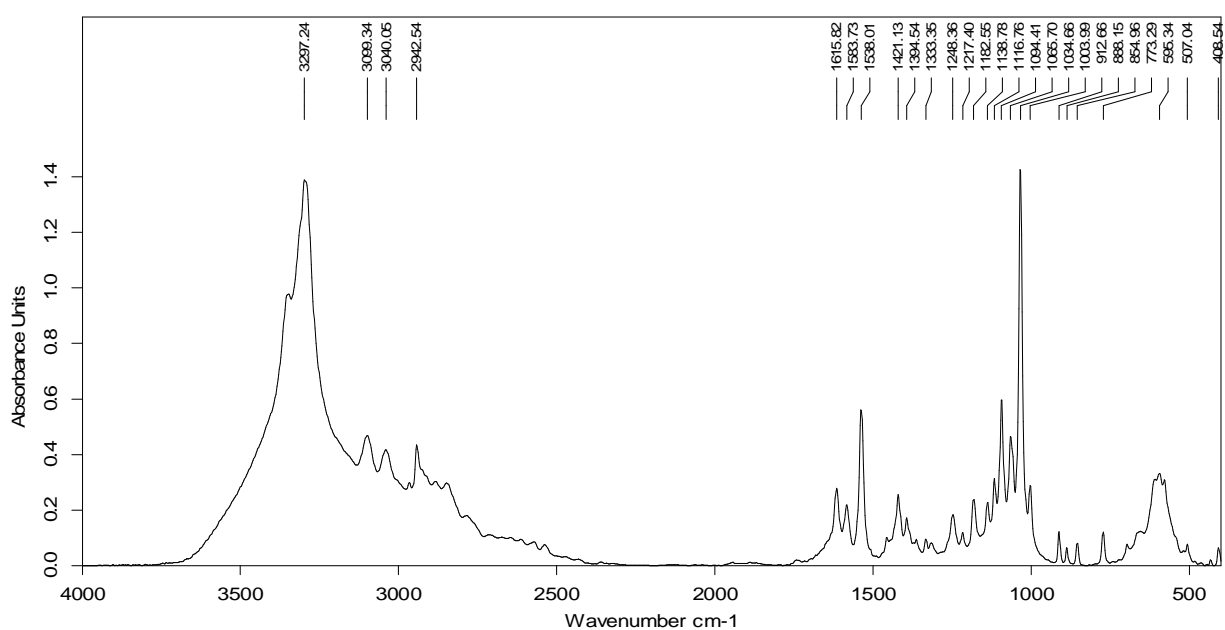


Рис. 2 — ИК-спектр ДГА·НСІ (стандарт)

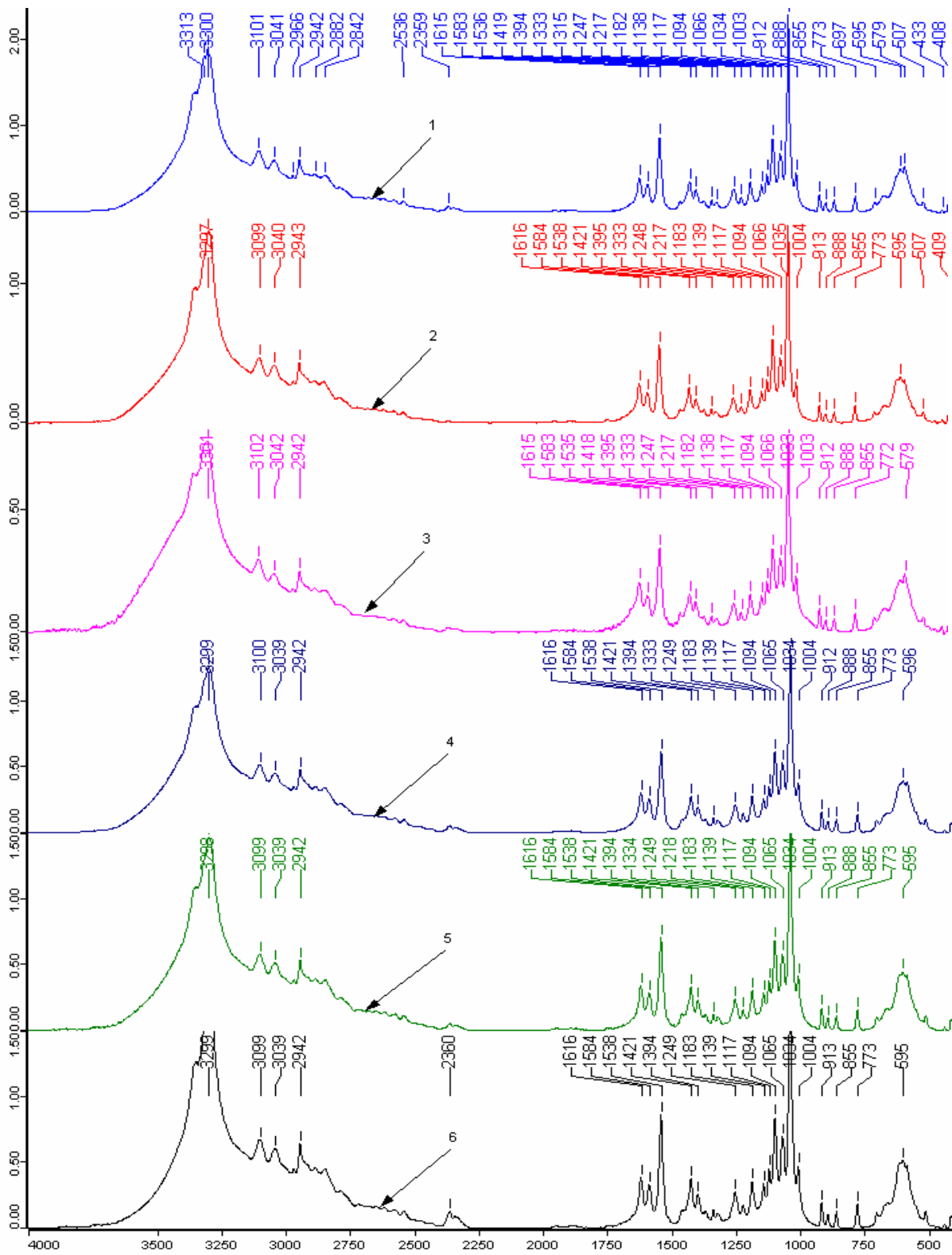
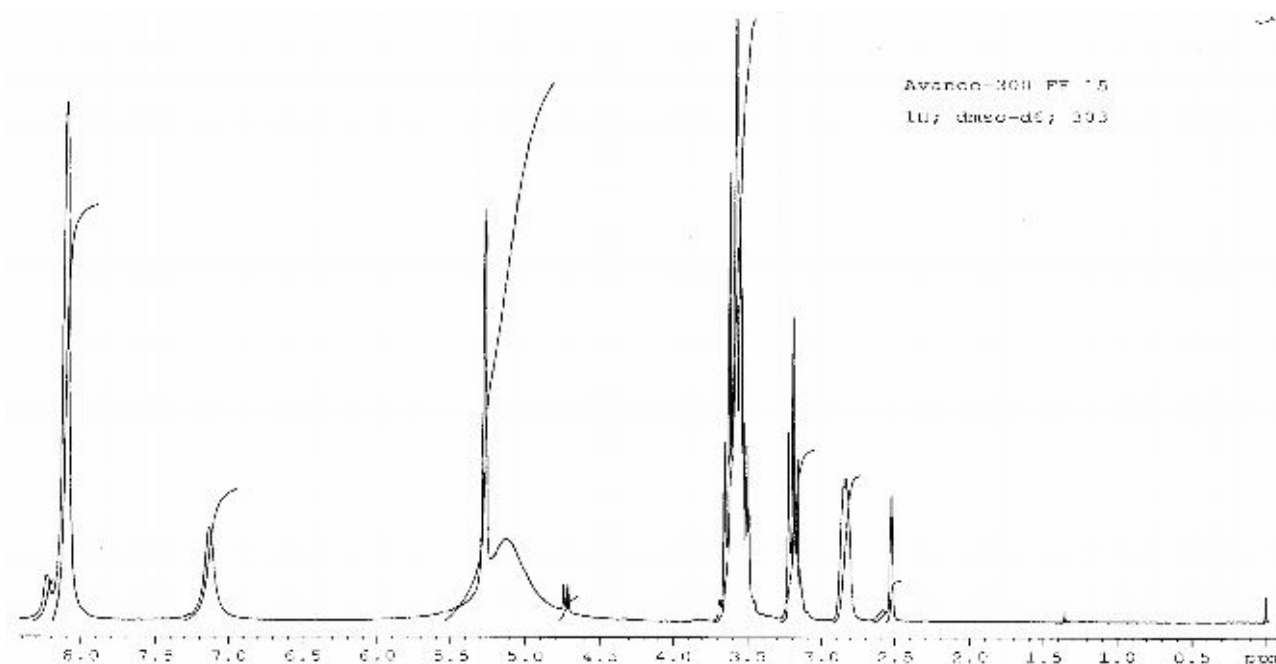
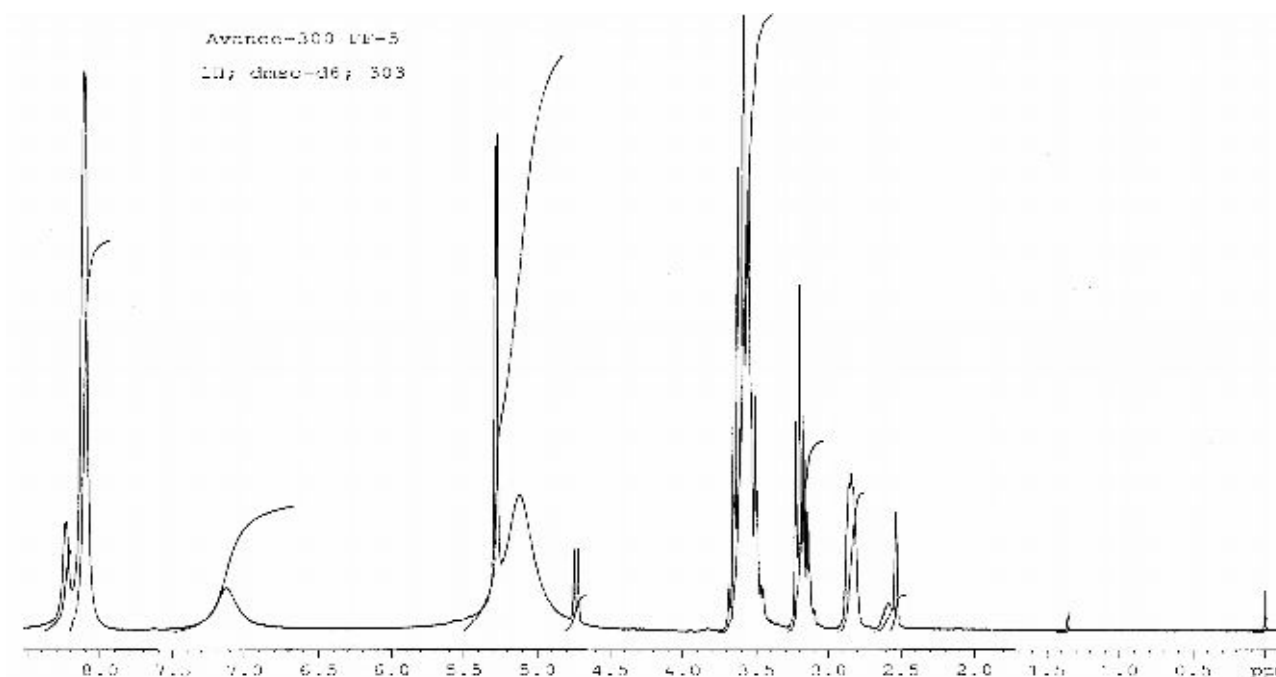


Рис. 3 — ИК-спектры ДГА • НС1 из хитина различного происхождения:
 1 — *Arthropoda*; 2 — *Apis mellifica*; 3 — *Cantharellus cibarius*; 4 — *Armillariella mellea*; 5 — *Suillus bovinus*; 6 — *Morchella esculenta*

Рис. 4 — ^1H -спектр ДГА·НСІ из ХГК гриба вида *Amanita muscaria* (мухомор настоящий)Рис. 5 — ^1H -спектр ДГА·НСІ из ХГК гриба вида *Morchel. esculenta* (сморчок настоящий)

Степень чистоты образцов ДГА·НСІ различного происхождения также контролировалась методом ТСХ на пластинках «Silufol-UV 254» в элюенте изопропанол/ацетон/0,2 М молочная кислота (6:3:1). Результаты анализа свидетельствуют о наличии в хроматографических пластинках по одному пятну для каждого образца ДГА·НСІ, выделенных из ХГК различных видов грибов, хитина ракообразных (*Arthropoda*) и подмора пчел (*Apis Mellifera*). R_f для всех образцов практически одинаков и колеблется в пределах нормы (от 0,51 до 0,53), что указывает на

нормы (от 0,51 до 0,53), что указывает на высокую степень чистоты и качества ДГА·НСІ различного происхождения (табл. 1).

Из анализа ИК-спектров образцов ДГА·НСІ, полученных из ХГК различных видов грибов (рис. 3, табл. 3) видно, что полосы поглощения полученных целевых продуктов идентичны полосам поглощения ДГА·НСІ хитина ракообразных (*Arthropoda*) и подмора пчел (*Apis Mellifera*) и соответствуют литературным данным [4]. Полоса в области 3300 см^{-1} для

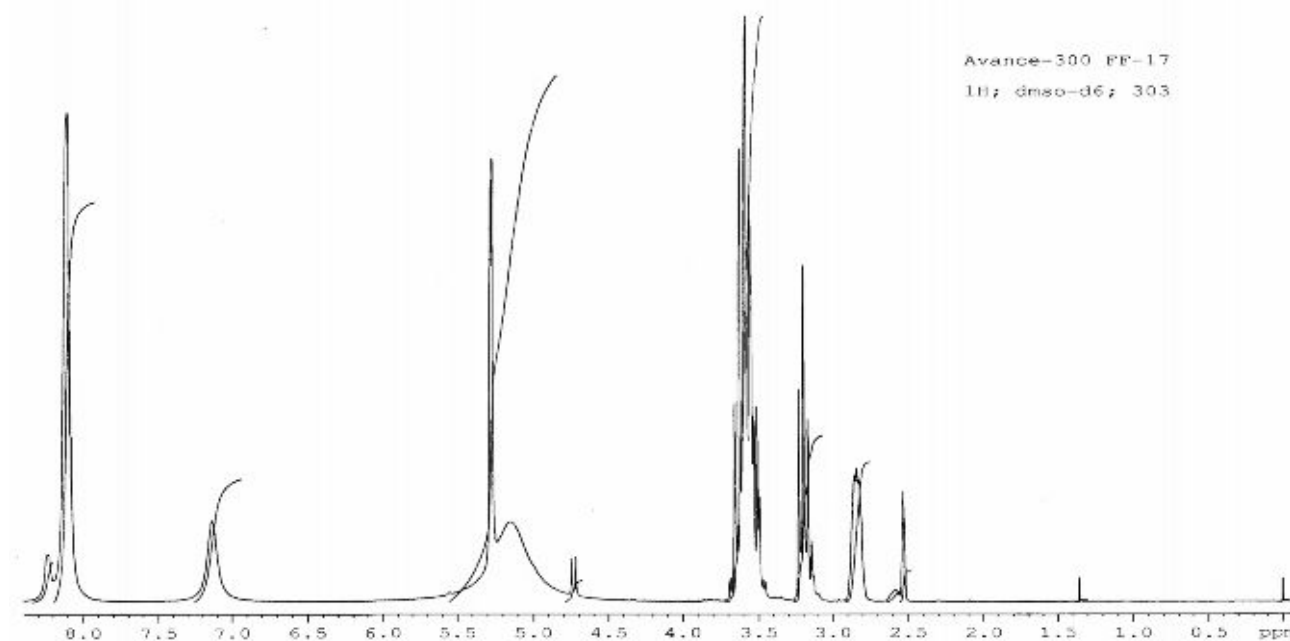


Рис. 6 — ПМР-спектр стандартного ДГА·НСІ

ДГА·НСІ относится к валентным колебаниям ОН (межмолекулярные водородные связи полиассоциатов). В ИК-спектрах соединений обнаружены полосы сильной интенсивности в областях $3080\text{--}3010\text{ см}^{-1}$, $1690\text{--}1640\text{ см}^{-1}$, $1590\text{--}1520\text{ см}^{-1}$, относящиеся к различным колебаниям группы NH.

Спектры содержат также полосы поглощения, относящиеся к группам С–О–Н и С–О–С, что также подтверждает структуру соединения [4].

Также для подтверждения чистоты и качества продуктов были сняты ПМР-спектры всех образцов ДГА·НСІ, выделенных из хитина различного происхождения, некоторые из которых представлены на рисунках 4 и 5.

Сопоставление ПМР-спектров ДГА·НСІ, выделенных из хитина различного происхождения со спектром стандартного образца ДГА·НСІ (рис. 6), также показало полную их идентичность.

Однако, ЯМР-спектры ^{13}C фиксируют незначительные отличия, и, на наш взгляд, могут быть использованы, в дальнейшем, для детального изучения образцов солянокислого D-глюкозамина, полученных из хитина разного происхождения.

Таким образом, учитывая химические и физико-химические подтверждения достоверности полученных нами образцов солянокислого D-глюкозамина, с выходами конечных продуктов, которые находятся на высоком уровне, можно сказать, что получение этого моносахарида из хитина высших грибов и подмора пчел имеет место, наряду с другими хитинсодержащими материалами.

Полученные результаты показывают принципиальную возможность препаративного получения солянокислого D-глюкозамина высокого качества с дос-

таточно высоким выходом из хитина высших грибов и подмора пчел с применением нами разработанной методики выделения и очистки ДГА·НСІ.

Работа выполнена по гранту МарГУ, по заданию Федерального агентства по образованию (по разделу «Исследование состояния и динамики популяции растений и животных»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаттерман Л., Виланд Г. Практические работы по органической химии / пер. с нем. под ред. В. М. Родионова. — М.; Л.: Госхимиздат., 1948.
2. Ившин В. П., Артамонова С. Д., Ившина Т. Н., Шарнина Ф. Ф. Методы выделения хитин-глюкоанового комплекса из нативной биомассы высших грибов // Высокомолек. соед. Б. — 2007. — Т. 49. — № 12. — С. 2215.
3. Ившина Т. Н., Артамонова С. Д., Ившин В. П., Шарнина Ф. Ф. Выделение хитин-глюкоанового комплекса из плодовых тел шляпочных грибов // Прикл. биохимия и микробиология. — 2009. — Т. 45. — № 3. — С. 1.
4. Казыцына Л. А., Куплетская Н. Б. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии. — М.: Высшая школа, 1971.
5. Костина, А. М., Бабицкая В. Г., Лобанок А. Г. Хитин мицелиальных грибов рода *Penicillium* // Прикладная биохимия и микробиология. — 1978. — Т. 14. — № 4. — С. 586–593.
6. Кочетков Н. К., Бочков А. Ф., Дмитриев Б. А. Химия углеводов. — М.: Химия, 1967.
7. Лазурьевский Г. В., Терентьева И. В., Шамигулин А. А. Практические работы по химии природных соединений. — М.: Высшая школа. 1961.
8. Максимов В. И., Родоман В. Е. Колориметрический анализ гидролизатов хитина для химической характеристики их качества // Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана: материалы пятой конференции. — М.; Щелково: Изд-во ВНИРО, 1999. — С. 239–241.
9. Феофилова Е. П., Терещина В. М., Меморская А. С. Хитин мицелиальных грибов: методы выделения, идентификация и физико-химические свойства // Микробиология. — 1995. — Т. 64. — № 1. — С. 27.