УДК 66.096.2:582.29

СОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ХИТИН-СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКСОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТАЛЛОМОВ ЛИШАЙНИКОВ МЕТОДОМ СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ ФЛЮИДНОЙ ЭКСТРАКЦИИ

[1]Жильцов Д.В., [1]Бровко О.С., [1,2]Ивахнов А.Д., [1,2]Боголицын К.Г., [1]Бойцова Т.А., [1]Паламарчук И.А.

[1]Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. Н.П. Лаверова РАН, Архангельск, e-mail: dnorton.usa@gmail.com;

[2]Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, Архангельск

Проведены исследования по выделению хитин-содержащего комплекса из талломов лишайников родов *Peltigera* и *Cladonia* методом сверхкритической флюидной экстракции диоксидом углерода и влиянию условий экстракции (продолжительность, температура и давление) на сорбционную способность полученных комплексов по отношению к ионам ртути. Выявлена зависимость сорбционной емкости хитин-содержащего комплекса от продолжительности экстракции, при этом давление и температура не оказывают на нее значительного влияния. Показана высокая сорбционная емкость по отношению к ионам ртути и красителю метиленовому голубому и конго красному (123,6; 67,6 и 18,0 мг/г для хитин-содержащего комплекса, выделенного из таллома лишайника рода *Cladonia*; 136,5; 172,4 и 46, 0 мг/г для хитин-содержащего комплекса из лишайника рода *Peltigera* соответственно) при оптимальных условиях выделения сорбента (продолжительность экстракции 20 минут, температура 40 °С, давление 100 атм), что свидетельствует о перспективности применения хитин-содержащих комплексов из лишайников в качестве сорбентов тяжелых металлов и органических красителей. Методом ИК-спектроскопии выполнена идентификация кубового остатка после экстракции, которая показала схожесть хитин-содержащего комплекса лишайников с хитином рачка гаммаруса. Сравнение хитин-содержащего комплекса таллома лишайников рода *Peltigera* и *Cladonia* с другими сорбентами природного и полусинтетического происхождения установило высокие показатели по удельной площади поверхности первого относительно адсорбентов природного происхождения, но уступает по этому показателю полусинтетическим угольным сорбентам. Главное преимущество хитин-содержащего комплекса перед угольными сорбентами заключается в наличии групп кислотного и основного характера. Полиамфолитная природа получаемых хитин-содержащих комплексов из талломов лишайников позволяет использовать их в качестве сорбентов широкого профиля.

Ключевые слова: лишайники, сверхкритическая флюидная экстракция, сорбционные свойства, хитин-содержащий комплекс

SORPTION PROPERTIES OF CHITIN-CONTAINING COMPLEXES ISOLATED FROM THE LICHEN THALLI BY THE SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION METHOD

[1]Zhiltsov D.V., [1]Brovko O.S., [1,2]Ivakhnov A.D., [1,2]Bogolitsyn K.G., [1]Boytsova T.A., [1]Palamarchuk I.A.

[1]N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research, Arkhangelsk, e-mail: dnorton.usa@gmail.com;

[2]Northern (Arctic) Federal University named after Lomonosov, Arkhangelsk

We obtained the chitin-containing complex from the genus *Peltigera* and *Cladonia* lichens' thalli by using method of supercritical fluid extraction with carbon dioxide. We studied the effect of extraction conditions (i.e., extraction duration, temperature and pressure) on the obtained complexes' sorption capacity for mercury ions. The dependence of the chitin-containing complex sorption capacity on the extraction duration was discovered, while the pressure and temperature were revealed to not affect it significantly. High sorption capacity for mercury ions and methylene blue dye and congo red (123,6; 67,6 and 18,0 mg/g for the chitin-containing complex isolated from the *Cladonia* lichen thallus; 136,5; 172,4 and 46,0 mg/g for the chitin-containing complex isolated from *Peltigera* lichen thallus, respectively) was demonstrated under optimal sorbent release (duration of extraction – 20 minutes, temperature – 40 °C, pressure – 100 atm). These findings indicate the use of chitin-containing complexes obtained from lichens as sorbents for heavy metals and organic dyes being promising. The IR-spectroscopy was used to identify the vat residue after extraction and has shown the similarity between lichens' chitin-containing complex and crustacean Gammarus chitin. *Peltigera* and *Cladonia* chitin-containing thallus has high specific surface area in comparison with sorbents of natural origin but is inferior on this indicator when compared with semi-synthetic coal sorbents. The main advantage of the chitin-containing complex over coal sorbents is the presence of acidic and basic groups. The polyampholytic nature of chitin-containing complexes obtained from lichen thalli allows them to be used as broad profile sorbents.

Keywords: lichens, supercritical fluid extraction, sorption properties, chitin-containing complex

Лишайник – уникальный организм, сочетающий в себе два компонента: гриб (микобионт) и одноклеточную зелёную водоросль и/или цианобактерию (фикобионт), которые симбиотически зависят друг от друга. Присутствие фотосинтезирующего компонента превращает грибной гетеротрофный организм в автотрофную ассоци-

ацию, для существования которой необходимы лишь вода, воздух, минеральные соли и субстрат для прикрепления.

Физиология гриба и водоросли в талломе лишайника отличается от физиологии свободноживущих компонентов. Грибной мицелий служит для водоросли защитной оболочкой, предохраняющей ее от высыхания и позволяющей ей беспрепятственно получать необходимые для фотосинтеза воду и углекислый газ. Сам гриб, не способный синтезировать органические вещества, питается продуктами ассимиляции водоросли [1].

Компонентный состав лишайников весьма разнообразен и характеризуется наличием хитина, прочно связанного с глюканом, белковыми веществами, моносахарами (так называемый хитин-содержащий комплекс – ХСК), и специфическими лишайниковыми веществами, синтезируемыми водорослями. Показано, что ХСК проявляет себя как комплексообразователь – биодетоксикант, способный прочно связывать и легко транспортировать через мембраны экзогенные и эндогенные токсины, в том числе катионы тяжёлых металлов, радионуклиды, токсичные альдегиды и кетоны, канцерогены, шлаки. Эти свойства связаны в первую очередь с развитой поверхностью и доступностью функциональных групп ХСК (карбоксильных -COOH и OH-групп кислотного характера и ацетамидной группы $-NHCOCH_3$, NH_2-группы основного характера).

ХСК из лишайников традиционно выделяют методами кислотно-щелочного гидролиза [2], при этом извлечение комплекса проходит в жёстких условиях и часть ХСК гидролизуется из-за разрыва связей между хитином и связанными с ним компонентами. Для извлечения лишайниковых кислот из талломов лишайников применяют методы экстракции органическими растворителями, а также метод сверхкритической флюидной экстракции (СКФЭ) диоксидом углерода [3, 4], при этом ХСК остается в кубовом остатке. Метод СКФЭ, основанный на принципах «зеленой химии», позволяет извлекать ХСК из слоевищ лишайников в малоизмененном виде, не разрушая ковалентные связи и сохраняя нативную структуру комплекса. Исследования биополимеров клеточной стенки грибов, в основном хитина [2], легли в основу разработки новой отрасли биотехнологии – получение этого аминополисахарида не из панцирей ракообразных, а на основе клеточных стенок мицелиальных грибов. Поскольку в талломах лишайников клеточная стенка грибного компонента составляет основную долю (90–98 %) клеточной стенки таллома, выделение ХСК из слоевищ лишайников и исследование их сорбционных свойств является актуальным.

Целью исследования явилось изучение влияния условий сверхкритической флюидной экстракции хитин-содержащего комплекса из талломов лишайников на его сорбционные свойства.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования были выбраны наиболее распространенные в биотопах Северо-западного региона России лишайники *Peltigera* и *Cladonia*, отобранные в ходе экспедиции на о. Русский Кузов в акватории Белого моря. Эти лишайники характерны для данного региона и являются доминирующими видами и участвуют в формировании мохово-лишайникового покрова лесных сообществ.

Для выделения из них ХСК образцы подвергались СКФЭ с помощью системы MV-10ASFE (Waters, USA). Навеску образца (~2 г) помещали в автоклав объемом 10 мл и обрабатывали CO_2 при скорости потока 93,6 мг/мин в течение заданного времени (20–60 минут). В ходе эксперимента варьировали температуру (40–80 °C) и давление (100–350 атм). Выход кубового остатка (ХСК) определяли высушиванием при 50 °C до постоянной массы.

Идентификацию ХСК (таблетки в KBr) проводили методом ИК-спектроскопии, спектры регистрировали на ИК-Фурье спектрометре IRAffinity-1 («Shimadzu», Япония) в диапазоне частот 400–4000 $см^{-1}$, число сканирований 50, разрешение 4 $см^{-1}$.

В табл. 1 представлены характеристические полосы поглощения хитина животного происхождения (рачок гаммарус) и хитин-содержащего комплекса растительного происхождения, выделенного из талломов лишайников родов *Peltigera* и *Cladonia.*

Область 1700–800 $см^{-1}$ (рис. 1, спектр 1, 2), называемая «отпечатками пальцев», имеет все пики, характерные для мономера хитина, а именно: 1655 $см^{-1}$– N-H-связь (1637; 1645), 1554 $см^{-1}$– C=O связь (1560; 1566), в области 900–1100 $см^{-1}$ два пика поглощения, которые соответствуют эфирным связям в кольце и β-глюкозидной связи, соединяющей пиранозные кольца. Кроме того, присутствуют слабые полосы поглощения при 890–880 и 800–790 $см^{-1}$, ответственные за деформационные колебания группы C–H и пульсационные колебания пиранозного кольца в β-сахарах. В целом

ИК-спектроскопическое исследование образцов ХСК, полученных из лишайников родов *Peltigera* и *Cladonia,* показало схожесть их химической структуры с хитином рачка гаммаруса (табл. 1, рис. 1).

Применение диоксида углерода в сверхкритическом состоянии позволяет полностью и в щадящем режиме отделять ХСК от экстракта в противовес классическим методам, при этом выход ХСК достигает 96%. Методом сканирующей электронной микроскопии были охарактеризованы морфологические особенности ХСК, выделенного методом СКФЭ (рис. 2). На микрофотографии ХСК отчетливо видны элементы клеточной стенки лишайников.

Таблица 1

ИК-спектры хитина и ХСК, выделенных из талломов лишайников

Тип колебаний	Характеристические полосы поглощения, $см^{-1}$		
	Хитин рачка гаммаруса [5]	*Peltigera*	*Cladonia*
$-NH_2$	3447	3404	3400 сл*
OH…O (связ.)	3300	3387	3381
NH (связ.)	3041	2922	2910
NH (деформ.)	1583	1560	1566
Протонированные аминогруппы NH_3^+	1622	1629	1635
CH_2-, CH_3-	1433	1430 сл*	1429 сл*
C-O-H	1419	1425	1417
O-H (деформ.)	1373	1377	1373
O-H	1320	1319	1317
-C=O	1258	1265	1260
C-N (вал.)	1247	1207	1219
C–O	1153	1168 сл*	1168 сл*
C–O–C	1066	1072	1072
C_1-H (деформ.) в β-сахарах	893	889	891

Примечание. * – слабовыраженные полосы.

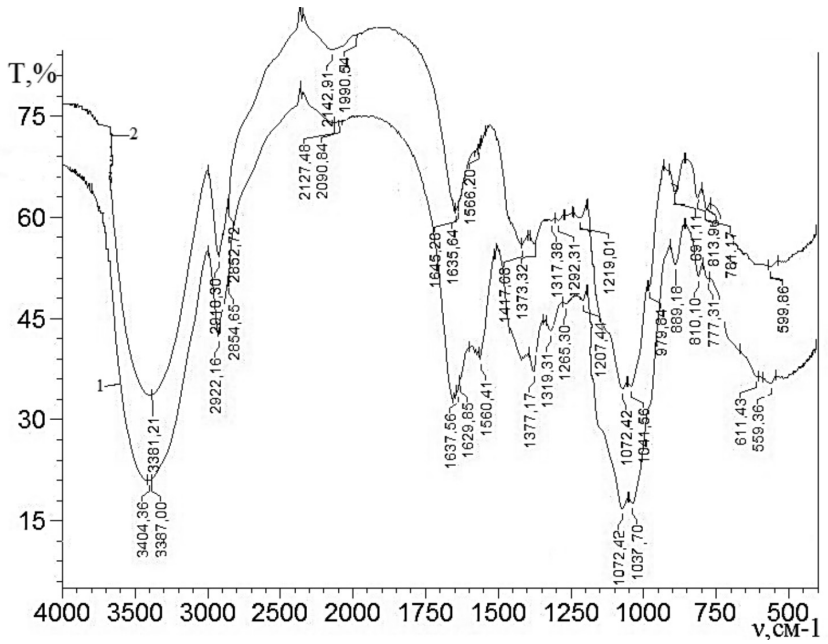
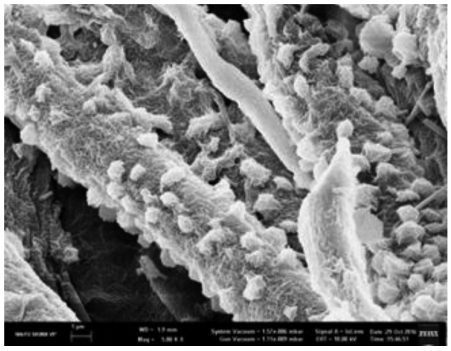
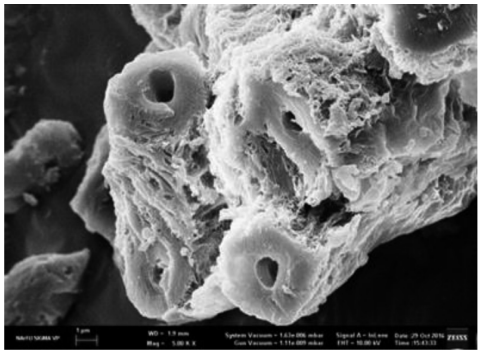


Рис. 1. ИК-спектры ХСК, выделенных из лишайников родов: 1 – Peltigera, 2 – Cladonia



а)



б)

Рис. 2. Электронные микрофотографии: а) ХСК, выделенный из лишайника Cladonia, б) ХСК, выделенный из лишайника Peltigera

Определение остаточного содержания метиленового голубого (МГ) и конго красного (КК) после их адсорбции на ХСК проводили колориметрическим методом на спектрофотометре UV-1800 Shimadzu (Япония), а катионов ртути – методом комплексонометрического титрования с роданидом калия [6]. Адсорбционную емкость ХСК (СЕ, сорбционная емкость, мг/г) находили по формуле

$$CE = \frac{(C - C_{\text{равн.}}) \cdot V}{m},$$

где C – концентрация адсорбтива в исходном растворе, мг/л;
$C_{\text{равн.}}$ – равновесная концентрация адсорбтива в растворе, мг/л;
V – объем раствора адсорбтива, взятого для контактирования с ХСК, л;
m – масса ХСК, г.

Результаты исследования и их обсуждение

Увеличение продолжительности СКФЭ с 10 до 20 мин (350 атм и 80 °С) влияет на сорбционную способность ХСК, что приводит к возрастанию СЕ комплекса на 11,4 %. Дальнейшее увеличение продолжительности экстракции до 30, 40 и 60 мин не приводит к изменению сорбционных свойств ХСК (сорбционная емкость 136–138,2 мг/г). Таким образом, для дальнейших экспериментов, в которых варьировались температура и давление СКФЭ, продолжительность процесса составляла 20 мин. Показано (рис. 3), что сорбционная емкость ХСК существенно не зависит от температуры и давления СКФЭ, сорбент с хорошими сорбционными характеристиками с экономической точки зрения целесообразно получать при температуре 40 °С и давлении 100 атм.

Установлено, что ХСК, выделенный из лишайников рода *Peltigera*, обладает более высокими сорбционными характеристиками в сравнении с выделенным из лишайника рода *Cladonia,* что, вероятно, обусловлено присутствием в его составе пигмента меланина, однако в ИК-спектре ХСК не обнаружены полосы поглощения основных групп пигмента (-COOH, -OH, N-H в гетероцикле) в области спектра от 400 до 4000 см$^{-1}$, что, возможно, связано с их перекрыванием полосами поглощения других функциональных групп ХСК.

Проведены исследования по адсорбции красителей на поверхности ХСК, выделенных СКФЭ из талломов лишайников родов *Cladonia* и *Peltigera*. Полученные комплексы проявляют высокую адсорбционную активность по отношению как МГ, так и КК. Положительно заряженный ион МГ адсорбируется на электроотрицательных (кислотного характера) адсорбентах, а КК – на электроположительных адсорбентах. Катионообменные свойства ХСК определяются присутствием двух типов функциональных групп: карбоксильных -COOH прочносвязанных аминокислот, а также OH-групп кислотного характера. Для ХСК, выделенного из таллома лишайника рода *Cladonia*, сорбционная емкость по МГ составила 67,6, а по КК – 18 мг/г. Для лишайника рода *Peltigera* эти показатели выше и составили 172,4 и 46,0 мг/г соответственно. Таким образом, ХСК имеет полиамфолитную природу. Одной из важнейших характеристик сорбента, влияющих на эффективность сорбции, является адсорбционная поверхность. В табл. 2 приведены сравнительные данные удельной поверхности различных сорбентов по отношению к МГ.

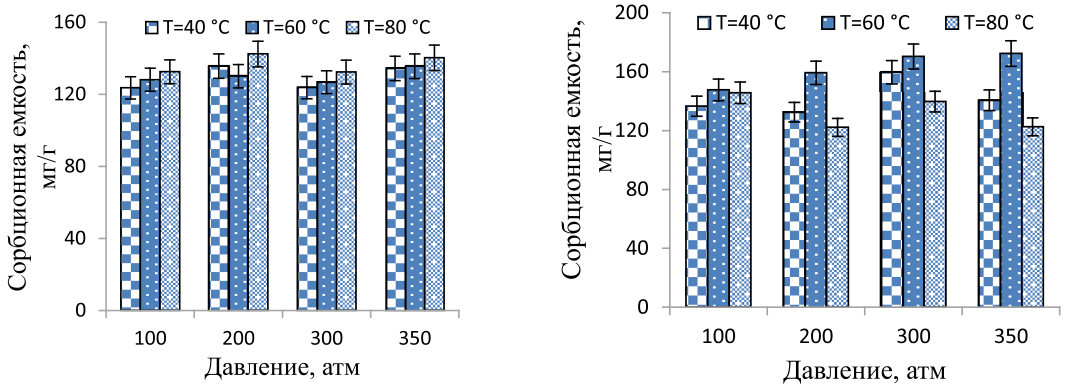


Рис. 3. Влияние давления и температуры экстракции ХСК, выделенных из лишайников родов Cladonia (а) и Peltigera (б) на их сорбционные свойства по отношению к катионам ртути (II) (продолжительность экстракции 20 мин)

Таблица 2

Удельная поверхность (м²/г) сорбентов различной природы (сорбат – МГ)

Литературные данные [7]						Экспериментальные данные	
Акт. углерод. сорбент (УВС – А)	Акт. уголь «Медисорб»	Водорослевая клетчатка		Хитин краба	МКЦ	ХСК, выделенные из лишайников	
		L. digitata	F. vesiculosus			Peltigera	Cladonia
723	160,0	50	21,0	7,23	1,4	310,3	121,0

ХСК, выделенный СКФЭ диоксидом углерода из талломов лишайников родов *Cladonia* и *Peltigera*, имеет достаточно высокую удельную поверхность в сравнении с другими сорбентами природного происхождения, но уступает по этому параметру полусинтетическим угольным сорбентам. Необходимо отметить, что ХСК имеет преимущество перед активированным углем, которое заключается в наличии дополнительных функциональных групп как кислотного, так и основного характера, следовательно, ХСК имеет полиамфолитную природу.

Заключение

Проведенное исследование показывает перспективность использования сверхкритической флюидной экстракции для выделения хитинсодержащих комплексов из талломов лишайников. Экспериментально подобраны условия экстракции ХСК из лишайников диоксидом углерода в сверхкритическом состоянии. Установлено, что продолжительность экстракции 20 мин, температура 40 °С и давление 100 атм являются оптимальными для выделения ХСК, обладающих высокими сорбционными свойствами относительно ионов ртути и органических красителей МГ и КК.

Работа выполнена в рамках научного проекта УрО РАН «Полифункциональные биологически активные материалы на основе компонентов растительного сырья» АААА-А18-118012390228-9 с использованием оборудования ЦКП НО «Арктика» САФУ и ЦКП КТ РФ-Арктика (ФИЦКИА РАН).

Список литературы / References

1. Заварзин Г.А. Эволюция прокариотной биосферы: «Микробы в круговороте жизни». 120 лет спустя: Чтение им. С.Н. Виноградского / Под ред. Н.Н. Колотилова. М.: Макс Пресс, 2011. 144 с.

Zavarzin G.A. Evolution of the prokaryotic biosphere: «Microbes in the cycle of life». 120 years later: Reading them. S.N. Vinogradsky / ed. N.N. Kolotilova. M.: Max Press, 2011. 144 p. (in Russian).

2. Ившина Т.Н., Артамонова С.Д., Ившин В.П., Шарнина Ф.Ф. Выделение хитин-глюканового комплекса из плодовых тел шляпочных грибов // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 3. С. 348–353.

Ivshina T.N., Ivshin V.P., Sharnina F.F., Artamonova S.D. Isolation of the chitin-glucan complex from the fruiting bodies of mycothallus // Applied Biochemistry and Microbiology. 2009. Т. 45. № 3. С. 313–318.

3. Бровко О.С., Ивахнов А.Д., Паламарчук И.А., Бойцова Т.А. Сверхкритическая флюидная экстракция усниновой

кислоты из лишайника рода Cladonia // Сверхкритические флюиды: Теория и практика. 2017. Т. 12. № 1. С. 41–49.

Brovko O.S., Ivakhnov A.D., Palamarchuk I.A., Boytsova T.A. Supercritical fluid extraction of usnic acid from lichen of the genus Cladonia // Supercritical fluids: Theory and Practice. 2017. Vol. 12. № 1. P. 41–49 (in Russian).

4. Бровко О.С., Паламарчук И.А., Бойцова Т.А., Боголицын К.Г., Вальчук Н.А., Ивахнов А.Д. Сравнительный анализ традиционных и современных методов экстракции усниновой кислоты из лишайникового сырья // Фундаментальные исследования. 2015. № 11–4. С. 659–663.

Brovko O.S., Palamarchuk I.A., Boitsova, T.A., Bogolitsyn K.G., Valchuk N.A., Ivakhnov A.D. Comparative analysis of traditional and modern methods of extraction of usnic acid from lichen raw materials // Fundamental research. 2015. № 11–4. P. 659–663 (in Russian).

5. Шарнина Ф.Ф. Хитин подмора пчел и хитин-глюкановый комплекс высших грибов, произрастающих в Республике Марий Эл – как возможный источник получения d(+)-глюкозамина гидрохлорида // Вестник Марийского государственного университета. 2012. № 8. С. 32–38.

Sharnina F.F. Chitin podmor bees and chitin-glucan complex of higher fungi growing in the Republic of Mari El – as a possible source of d (+) – glucosamine hydrochloride // Vestnik Marijskogo gosudarstvennogo universiteta. 2012. № 8. P. 32–38 (in Russian).

6. Пршибил Р. Аналитические применения этилендиаминтетрауксусной кислоты и родственных соединений. М.: Мир, 1975. 534 с.

Prshibil R. Analytical applications of ethylenediaminetetraacetic acid and related compounds. M.: Mir, 1975. 534 p. (in Russian).

Каплицин П.А. Особенности химического компонентного состава, структуры и свойств биомассы арктических бурых водорослей: автореф. канд. хим. наук. Архангельск, 2017. 18 с.

Kaplitsin P.A. Features of the chemical composition, structure and properties of the biomass of arctic brown algae: avtoref. kand. khim. nauk. Arkhangelsk, 2017. 18 p. (in Russian).