

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра полимеров на базе ООО «АКРИПОЛ»

**ВЛИЯНИЕ МИКРОМИЦЕТОВ НА СОСТАВ И СТРУКТУРУ
ПЛЕНОК ХИТОЗАНА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 412 группы
направления 04.03.01 «Химия»

Института химии

Черновой Дарьи Сергеевны

Научный руководитель
заведующий кафедрой
д. х. н., профессор

А. Б. Шиповская

Саратов 2023

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. В настоящее время активно разрабатываются биотехнологические методы утилизации полимерных отходов, снижающие как энергетические затраты на их переработку, так и загрязнение окружающей среды токсичными продуктами деструкции полимеров. Для решения данной задачи перспективно применение нетоксичных микромицетов, продуцирующие ферменты, способные утилизировать полимеры путем ферментативной деградации макроцепи. В частности, для решения данной задачи используются почвообитающие микромицеты *Fusarium oxysporum* (*F. oxysporum*) и *Trichoderma harzianum* (*T. harzianum*). Отмечается, что первое место по силе воздействия и количеству видов занимают именно плесневые грибы [1].

Хитозан в свою очередь являлся бы хорошей средой для культивирования микромицетов, поскольку его характеризуют как возобновляемое, нетоксичное и биоразлагаемое сырье, занимающее второе место по распространению среди полисахаридов в природе после целлюлозы [2, 3]. В литературных источниках известно большое количество работ, где хитозан в солевой форме применяют как фунгицидное средство [4-8]. Так, ацетат хитозана ингибирует и рост мицелия, и прорастание спор *F. oxysporum* [9]. Однако, практически не рассмотрено применение хитозана в его основной форме. При этом использование микромицетов *F. oxysporum* и *T. harzianum* позволит экологически чистым способом утилизировать полимеры.

Целью работы явилась оценка влияния ферментов, выделяемых культурами *F. oxysporum* и *T. harzianum*, на состав и структуру пленок хитозана.

Задачи исследования включали:

1. Получение пленок методом полива из растворов хитозана в 1.5% гликолевой кислоте;

2. Культивирование микромицетов в среде, где единственным источником С и N являются пленки хитозана, с последующим их выделением и анализом биохимических свойств;
3. Оценка влияния ферментов, выделяемых культурами *F. oxysporum* и *T. harzianum*, на изменение морфоструктуры, состава и физико-механических свойств пленок хитозана.

Научная новизна. В работе впервые:

– Пленочные образцы хитозана являлись единственным источником С и N.
– Установлено, что после роста микромицетов значительно снижается растворимость хитозана в классических растворяющих средах (ацетатный буфер, уксусная и соляная кислоты).

– Зафиксированы множественные дефекты в морфоструктуре образцов, показывающие рост грибного мицелия не только на поверхности, но и в толще пленок. Элементным анализом выявлено уменьшение количества N, что может свидетельствовать о включении хитозана в метаболизм грибов. Увеличивается степень кристалличности хитозана, а на рентгеновских дифрактограммах появляются новые рефлексы, свидетельствующие о специфичном механизме биодegradации аминополисахарида в культуре микромицетов.

– Наиболее благоприятной средой для продуцирования мицелия явился хитозан с молекулярной массой 200 кДа.

Практическая значимость работы.

Обнаружено также, что в результате жизнедеятельности *Fusarium oxysporum* и *Trichoderma harzianum*, где хитозан являлся единственным источником С и N, образуются ферменты гидролаза и пероксидаза, выполняющие ключевую роль в деструкции синтетических полимеров.

Структура и объем работы. Выпускная квалификационная работа (ВКР) состоит из раздела обозначений и сокращений, введения, трех глав («Литературный обзор», «Экспериментальная часть», «Результаты и обсуждения»), заключения, благодарностей, техники безопасности и списка

литературы, включающий 47 источников. В тексте работы содержатся таблицы, формулы и графические иллюстрации. Общий объем ВКР составляет 46 страниц, включая 12 рисунков и 5 таблиц.

Основное содержание работы.

В главе 1 представлен обзор литературы, в котором обсуждаются перспективы применения *F. oxysporum* и *T. harzianum* в переработке полимерных отходов, особенности ферментов выделяемых этими культурами, а также свойства хитозана, используемого в качестве источника питания микромицетов.

В главе 2 описаны материалы и методы, используемые в работе.

Объектами исследования явились:

- пленки хитозана, полученные методом полива на подложку из водных растворов полимера в 1.5% гликолевой кислоте (ГК): исходные и после роста *F. oxysporum* и *T. harzianum*;
- разбавленные растворы хитозана в ацетатном буфере (рН 3.9), для получения которых использовали полученные пленки хитозана, после роста *F. oxysporum* и *T. harzianum*.

Использовали аминополисахарид хитозан со средневязкостной молекулярной массой (\bar{M}_η) 200, 460 и 530 кДа, СД 80 мольн.%, производства ЗАО «Биопрогресс», водные растворы 1.5% ГК (Sigma-Aldrich, Англия), ацетатного буфера (2% CH_3COOH + 2.8% CH_3COONa , ЗАО «База №1 Химреактивов», РФ) и 5% NaOH (ЗАО «База №1 Химреактивов», РФ).

Для анализа активности ферментов кутиназы и пероксидазы использовали буферы из трис(гидроксиметил)аминометана (рН 8) и винной кислоты (рН 4) соответственно. Специфическим субстратом для кутиназы являлся паранитрофенилбутират, для пероксидазы – 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислота) (АБТС).

В работе использованы штаммы аскомицетов из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (WFCC975, WDCM1021):

Fusarium oxysporum (ВРРМ 543), выделенный из загрязненных нефтью образцов [11], *Trichoderma harzianum*, полученный из Института проблем экологии и эволюции РАН от д.б.н., профессора В.А. Тереховой.

Все эксперименты по культивированию грибов, изучению их деградативной активности, определению активностей ферментов проводили на базе Лаборатории экологической биотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук».

Изменения в составе и структуре пленок хитозана фиксировали оптическими (СЭМ, ИК, рентгеновская дифрактометрия) и вискозиметрическими методами, с помощью элементного анализа и стандартных физико-механических тестов.

Активность ферментов определяли спектрофотометрически, а прирост мицелия – гравиметрически.

В главе 3 обсуждаются изменения в составе и структуре пленок хитозана, зафиксированные при росте *F. oxysporum* и *T. harzianum*.

В условиях среды, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии пленки хитозана с $\bar{M}_n = 200, 460$ и 530 кДа, наблюдали активный рост микромицетов *F. oxysporum* и *T. harzianum* с образованием характерных колец розового или зеленого цвета. В контрольных вариантах (без хитозана) рост микромицетов не наблюдался.

Методом СЭМ зафиксированы различия в морфоструктуре пленок до и после контакта с микромицетами. Поверхность исходных пленок хитозана гладкая, а после контакта с микромицетами имеет уже более развитую поверхность с многочисленными дефектами. Исследование упруго-пластических свойств пленок хитозана показало, что деформационно-прочностные кривые являются типичными для вязко-упругих материалов. Наибольшие изменения – а именно значительное уменьшение разрывного

напряжения, относительного удлинения и модуля Юнга – характерны для образца пленки хитозана с $\bar{M}_n = 200$ кДа.

После роста *F. oxysporum* и *T. harzianum* на пленках хитозана неожиданным оказалось значительное снижение растворимости полимера в ацетатном буфере, который является классической растворяющей средой, что может свидетельствовать о специфическом взаимодействии микромицета с полимером. Для более подробного исследования структурных изменений макромолекул хитозана получены ИК-спектры образцов с характерными полосами в области как валентных (ν), так и деформационных (δ) колебаний. Основные изменения в ИК-спектрах образцов пленок хитозана после роста микромицетов заключаются в смещении полос поглощения и изменении интенсивности пиков. На ИК-спектре выделенной не растворившейся части хитозана после контакта с *F. oxysporum* пик, характерный для ν_{as} (C-N), отсутствует, что свидетельствует о разрыве этой связи, снижении количества аминогрупп в сополимере, и, следовательно, снижении растворимости. Элементным анализом зафиксировано снижение количества азота во всех образцах.

Исследование влияния температуры культивирования и концентрации полимера в пленке на растворимость хитозана в ацетатном буфере показало, как и в предыдущем эксперименте, значительное снижение ее значений. Более высокую растворимость имели пленки, полученные из раствора 3.5% хитозана. На рост мицелия и, соответственно, на активность ферментов влияют как молекулярная масса полимера, так и его концентрация в пленочном образце. Температура не оказала особого влияния. Более благоприятной средой для продуцирования мицелия явились пленки, полученные из раствора 3.5 мас.%. хитозана с $\bar{M}_n = 200$ кДа.

По материалам работы опубликованы тезисы доклада.

Д.С. Чернова, Т.С. Бабичева, Н.Н. Позднякова, А.Б. Шиповская
Применение пленок хитозана для культивирования микромицетов *Fusarium oxysporum* и *Trichoderma harzianum* // Сб. тез. X Молодежной конференции ИОХ РАН, 2023, С. 261.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучено комплексное влияние микромицетов *F. oxysporum* и *T. harzianum*, культивируемых в присутствии пленок хитозана с $\bar{M}_n = 200, 460$ и 530 кДа и концентрацией 3.5% и 4% при различных температурах, на структуру и свойства пленочных образцов.
2. Установлено, что после роста микромицетов значительно снижается растворимость хитозана в классических растворяющих средах (ацетатный буфер, уксусная и соляная кислоты). Повышение температуры культивирования позволило зафиксировать изменения вплоть до полиэлектролитных свойств. Изменения на ИК-спектре свидетельствуют о разрыве связи C-N, что объяснило снижение растворимости. Элементным анализом выявлено уменьшение количества N, что может свидетельствовать о включении хитозана в метаболизм грибов.
3. Методом СЭМ зафиксированы множественные дефекты в морфоструктуре образцов, показывающие рост грибного мицелия не только на поверхности, но и в толще пленок.
4. На рентгеновских дифрактограммах после роста микромицетов зафиксированы новые рефлексы, что отобразилось на увеличении степени кристалличности хитозана, свидетельствующее о специфичном механизме биodeградации аминополисахарида в культуре микроорганизмов. С уменьшением концентрации полимера в пленочном образце значение степени кристалличности повышается.
5. Обнаружено также, что в результате жизнедеятельности *F. oxysporum* и *T. harzianum* образуются ферменты гидролаза и пероксидаза. При этом, на количественные показатели роста микромицетов и активность продуцируемых ферментов влияет молекулярная масса полимерного образца. Наиболее благоприятной средой для продуцирования мицелия явился хитозан с молекулярной массой 200 кДа. С уменьшением концентрации полимера в пленке активность ферментов повышалась.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тертышная, Ю.В. Биодegradация полимерных материалов под действием микромицетов почвы / Н. С. Левина, И. А. Бидей // Экология и природопользование: прикладные аспекты – 2019. – Т. 2. – С. 179–182.
2. Nicu, R. Chitosan as cationic polyelectrolyte in wet-end papermaking systems / E. Bobu, J. Desbrieres // Cellulose Chemistry and Technology. – 2011. – Vol. 45, No. 1-2. – P. 105–111.
3. Leceta, I. Functional properties of chitosan-based films / I. Leceta, P. Guerrero, K. de la Caba // Carbohydrate Polymers. – 2013. – Vol. 93, No. 1. – P. 339–346.
4. Elagamey, E Proteomic insights of chitosan mediated inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* / M. A. E. Abdellatef, M. Y. Arafat // J. of Proteomics. – 2022. – Vol. 260. Article ID 104560.
5. Dananjaya, S. H. S. Comparative study on antifungal activities of chitosan nanoparticles and chitosan silver nano composites against *Fusarium oxysporum* species complex / Erandani, W. K. C. U., Kim, C. H., Nikapitiya, C., Lee, J., De Zoysa, M. // Int. J. of Biol. Macromol. – 2017. – Vol. 105. – P. 478–488.
6. Singh, T. Synergistic Ability of Chitosan and *Trichoderma harzianum* to Control the Growth and Discolouration of Common Sapstain Fungi of *Pinus radiata* / C. Chittenden // J. Forests. – 2021. – Vol. 12 (5). Article ID 542.
7. Boruah, S. Fungus mediated biogenic synthesis and characterization of chitosan nanoparticles and its combine effect with *Trichoderma asperellum* against *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* / P. Dutta // Indian Phytopathology. – 2020. – Vol. 74 (1), P. 81–93.
8. Meng, D. Antifungal activity of chitosan against *Aspergillus ochraceus* and its possible mechanisms of action / B. Garba, Y. Ren, M. Yao, X. Xia, M. Li, Y. Wang // Int. J. of Biol. Macromol. – 2020. – Vol. 158. – P. 1063–1070.
9. Ren, J. Chitosan is an effective inhibitor against potato dry rot caused by *Fusarium oxysporum* / Tong, J., Li, P., Huang, X., Dong, P., Ren, M. // Physiological and Molecular Plant Pathology. – 2021. – Vol. 113 (16) Article ID 101601.