

Денис Викторович Минаков<sup>1✉</sup>, Евгений Сергеевич Саврасов<sup>2</sup>, Ольга Николаевна Мусина<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, Барнаул, Россия

<sup>2</sup>Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

<sup>1</sup>minakovd-1990@yandex.ru

<sup>2</sup>savrasovbti@mail.ru

<sup>3</sup>musinaolga@gmail.ru

## НОВЫЙ ЭФФЕКТИВНЫЙ ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ХИТООЛИГОСАХАРИДОВ И ОЦЕНКА ИХ БИОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ

Цель исследования – разработка ферментативного способа получения хитоолигосахаридов (ХОС), изучение их физико-химических и пребиотических свойств. Объекты исследования – коммерческий хитозан, хитозан-глюкановый комплекс (ХтзГК) из плодовых тел *Ganoderma lucidum*, пробиотические штаммы *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* и *Bifidobacterium bifidum*. Ферментативный гидролиз проводили с использованием доступного препарата «Целлолюкс-А» (целлюлаза – 6000 ед/мл, ксиланаза – 1700 ед/мл) при температуре 50 °С, рН 5,0 в течение 24 ч. Физико-химические свойства определяли методами вискозиметрии и потенциометрического титрования. Пребиотическую активность оценивали при глубинном культивировании пробиотиков на питательных средах с добавлением 0,5 % ХОС. Выход ХОС из хитозана (94,5 %) превышает выход из ХтзГК (78,4 %). ХОС из хитозана характеризовались высокими значениями характеристической вязкости (4,1 дл · г<sup>-1</sup>), молекулярной массы (5,4 кДа) и степенью деацетилирования (91,5 %), превышающими соответствующие показатели для ХОС из ХтзГК на 7,9 %; 68,8 и 24,3 % соответственно. При культивировании пробиотиков наибольшее количество КОЕ/мл показали среды с ХОС из хитозана: *L. acidophilus* –  $2,38 \cdot 10^8$ , *L. casei* –  $2,51 \cdot 10^8$ , *L. rhamnosus* –  $4,47 \cdot 10^8$ , *L. plantarum* –  $4,57 \cdot 10^8$ , *B. bifidum* –  $7,04 \cdot 10^8$ . Предложен эффективный способ ферментативного гидролиза хитозана из ракообразных и хитозан-глюканового комплекса из биомассы высших грибов с использованием ферментного комплекса целлюлазы и ксиланазы, обеспечивающий получение ХОС с заданными характеристиками. Применение целлюлазы и ксиланазы вместо специфических ферментов (хитиназы и хитозаназы) позволяет снизить затраты на получение ХОС. Биофункциональные свойства ХОС из хитозана, включающие физико-химические параметры (характеристическую вязкость, молекулярную массу, степень деацетилирования) и выраженную пребиотическую активность, свидетельствуют о перспективности их использования в качестве пребиотиков. Полученные данные способствуют совершенствованию технологий производства пребиотиков на основе ХОС и расширению их использования в сельском хозяйстве и пищевой промышленности.

**Ключевые слова:** высшие грибы, хитозан, хитозан-глюкановый комплекс, хитоолигосахариды, пребиотические свойства

**Для цитирования:** Минаков Д.В., Саврасов Е.С., Мусина О.Н. Новый эффективный ферментативный способ получения хитоолигосахаридов и оценка их биофункциональных свойств // Вестник КрасГАУ. 2026. № 5. С. 253–262. DOI: 10.36718/1819-4036-2026-5-253-262.

**Финансирование:** государственное задание Министерства науки и высшего образования РФ № 075-03-2024-105 (тема № FZMM-2024-0003, рег. № НИОКТР 124013000666-5).

Denis Viktorovich Minakov<sup>1✉</sup>, Evgeny Sergeevich Savrasov<sup>2</sup>, Olga Nikolaevna Musina<sup>3</sup><sup>1,2,3</sup>Altai State Technical University named after I.I. Polzunov, Barnaul, Russia<sup>2</sup>Altai State University, Barnaul, Russia<sup>1</sup>minakovd-1990@yandex.ru<sup>2</sup>savrasovbti@mail.ru<sup>3</sup>musinaolga@gmail.ru

## A NEW EFFICIENT ENZYMATIC METHOD FOR PRODUCING CHITOOIGOSACCHARIDES AND THEIR BIOFUNCTIONAL PROPERTIES EVALUATION

*The aim of the study is to develop an enzymatic method for obtaining chitooligosaccharides (COS) and to investigate their physicochemical and prebiotic properties. The objects of the study were commercial chitosan, chitosan-glucan complex (ChtsGK) from the fruiting bodies of Ganoderma lucidum, and probiotic strains of Lactobacillus acidophilus, L. casei, L. rhamnosus, L. plantarum, and Bifidobacterium bifidum. Enzymatic hydrolysis was performed using the available preparation Cellolux-A (cellulase – 6000 U/ml, xylanase – 1700 U/ml) at a temperature of 50 °C, pH 5.0 for 24 hours. The physicochemical properties were determined by viscometry and potentiometric titration. Prebiotic activity was assessed by submerged cultivation of probiotics on nutrient media supplemented with 0.5 % COS. The yield of COS from chitosan (94.5 %) exceeds that from ChtsGC (78.4 %). COS from chitosan were characterized by high values of intrinsic viscosity (4.1 dl · g<sup>-1</sup>), molecular weight (5.4 kDa) and the degree of deacetylation (91.5 %), exceeding the corresponding indicators for COS from ChtsGC by 7.9 %, 68.8 and 24.3 %, respectively. When cultivating probiotics, the highest number of CFU/ml was shown by media with chitosan-based chitosan-containing complexes: L. acidophilus – 2.38 · 10<sup>8</sup>, L. casei – 2.51 · 10<sup>8</sup>, L. rhamnosus – 4.47 · 10<sup>8</sup>, L. plantarum – 4.57 · 10<sup>8</sup>, B. bifidum – 7.04 · 10<sup>8</sup>. An effective method for enzymatic hydrolysis of chitosan from crustaceans and chitosan-glucan complex from higher fungal biomass using an enzyme complex of cellulase and xylanase is proposed, ensuring the production of chitosan with specified characteristics. The use of cellulase and xylanase instead of specific enzymes (chitinase and chitosanase) makes it possible to reduce the costs of obtaining chitosan. The biofunctional properties of chitosan-based COSs, including physicochemical parameters (inherent viscosity, molecular weight, degree of deacetylation) and pronounced prebiotic activity, demonstrate their potential for use as prebiotics. These findings contribute to the improvement of COS-based prebiotic production technologies and the expansion of their use in agriculture and the food industry.*

**Keywords:** higher fungi, chitosan, chitosan-glucan complex, chitooligosaccharides, prebiotic properties

**For citation:** Minakov DV, Savrasov ES, Musina ON. A new efficient enzymatic method for producing chitooligosaccharides and their biofunctional properties evaluation. *Bulletin of KSAU*. 2026;(5):253-262. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2026-5-253-262.

**Funding:** state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation № 075-03-2024-105 (topic № FZMM-2024-0003, registration № NIOKTR 124013000666-5).

**Введение.** Высшие базидиальные грибы содержат пищевые волокна, включая β-глюканы, хитин и гетерополисахариды (пектиновые вещества, гемицеллюлозы, полиуронины и др.) в количестве 10–50 % от сухой массы. Преимущество нерастворимых пищевых волокон заключается в сокращении времени прохождения пищи через кишечник, предотвращении нарушений регулярности его опорожнения и снижении риска развития колоректального рака [1, 2]. Польза для здоровья растворимых пищевых волокон, и особенно β-(1,3),(1,6)-D-глюканов, заключается в снижении уровня холестерина,

концентрации глюкозы в плазме крови, факторов риска развития дегенеративных заболеваний, включая сердечно-сосудистые. Помимо этого, пищевые волокна грибов стимулируют рост полезной микрофлоры кишечника, благодаря чему используются в качестве пребиотиков [3]. Перспективным биологически активным веществом для исследований пищевых волокон, содержащихся в грибах, является хитин, из которого получают различные модифицированные формы, в частности хитозан и хитоолигосахариды [4].

Хитозан и хитоолигосахариды (ХОС) относятся к деацетилированным производным хитина. По сравнению с хитином хитозан и ХОС проявляют более высокую биологическую активность, что обуславливает их широкое применение в пищевой промышленности, медицине и сельском хозяйстве [5].

Хитоолигосахариды представляют собой олигомеры N-ацетил-D-глюкозамина ( $\geq 85\%$ ) и D-глюкозамина ( $\leq 15\%$ ), связанные  $\beta$ -1,4 гликозидными связями. Степень полимеризации (СП) ХОС, которая определяется степенью ферментативного гидролиза хитозана, составляет от 2 до 20, а их средняя молекулярная масса (ММ) – 3,9 кДа. ХОС обладают высокой пребиотической активностью – стимулируют рост лакто- и бифидобактерий. Эксперименты на мышах показывают, что ХОС со СП 2–8 обладают свойствами регуляции микрофлоры кишечника. Применение ХОС со СП 2–6 значительно увеличивает моторику кишечника, восстанавливает состав микробиоты кишечника и метаболический дисбаланс. Установлено, что ХОС могут применяться в качестве пребиотиков, поскольку стимулируют рост молочнокислых бактерий, одновременно подавляя кишечные патогены [3]. Согласно исследованиям [5] ХОС (СП 2-8, ММ < 1,5 кДа, СД 99,9 %) стимулируют рост *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* в концентрациях от 0,1 до 0,5 %. Положительные результаты получены также при использовании ХОС (СП 4-9, ММ < 1,7 кДа, СД 60 %) стимулирующих рост *L. paracasei* и *L. kefir* в концентрации 0,1 %.

Кишечник человека населен примерно 100 триллионами микроорганизмов, включая 1000–1150 видов бактерий [6]. Эти виды взаимодействуют с организмом, регулируя баланс микробиоты кишечника, улучшая функции слизистой оболочки, иммунной системы хозяина, и существенно влияют на здоровье человека [7, 8].

В последние годы исследователи проявляют повышенный интерес к питанию, направленному на модуляцию кишечной микробиоты, в частности с применением хитоолигосахаридов. В совокупности оптимизация технологии получения ХОС и углубленное понимание их биологических функций позволят раскрыть их способность положительно влиять на состояние здоровья человека, что способствует достижению основных целей государственной политики, на-

правленной на улучшение качества жизни населения. Таким образом, разработка способов получения хитоолигосахаридов (олигомеров  $\beta$ -1,4-связанного D-глюкозамина) с высокой пребиотической активностью из хитозана ракообразных и хитозан-глюкановых комплексов высших грибов с использованием доступного фермента целлюлазы является актуальной научно-прикладной задачей.

**Цель исследования** – разработка ферментативного способа получения хитоолигосахаридов, изучение их физико-химических и пребиотических свойств.

**Задачи:** разработать методику получения хитоолигосахаридов (ХОС) путем ферментативного гидролиза как коммерческого хитозана, так и хитозан-глюканового комплекса (ХтзГК), выделенного из плодовых тел грибов *Ganoderma lucidum*, с использованием доступного ферментного препарата «Целлолюкс-А»; исследовать физико-химические свойства полученных ХОС (характеристическая вязкость, молекулярная масса, степень деацетилирования) и определить их выход из различных исходных материалов; изучить пребиотическую активность полученных ХОС в отношении пробиотических штаммов микроорганизмов (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum*). Оценить эффективность ХОС, полученных из разных источников (хитозана и ХтзГК), в качестве стимуляторов роста пробиотических микроорганизмов; дать оценку целесообразности применения ферментного комплекса целлюлазы и ксиланазы вместо специфических ферментов (хитиназы и хитозаназы) для промышленного получения ХОС с выраженными пребиотическими свойствами.

**Объекты и методы.** В качестве объектов исследования использовались молочнокислые бактерии *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum*, выделенные из коммерческих аптечных препаратов «Ацидофиллин», «Лактожиналь», «Лактобактерии Рамнозус-СМ», «Био Лонг Лайф» и «Бифидумбактерин»; культивируемые высшие базидиальные грибы *Ganoderma lucidum* – источник для получения хитозан-глюканового комплекса и хитоолигосахаридов; коммерческий хитозан (изгото-

витель: Orison Chemicals Limited, Китай); ферментный препарат «Целлолюкс-А» (ООО ПО «Сиббиофарм», г. Бердск).

Для культивирования молочнокислых бактерий на агаризованных средах использовали селективные питательные среды для роста бактерий рода *Lactobacillus*, %: глюкоза – 2,0; пептон – 1,0; мясной экстракт – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,4;  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 0,5; полисорбат 80 – 0,1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,2;  $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  – 0,2; %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,02;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0,005; агар микробиологический – 1,0. pH доводили до 6,2 при 25 °С; для *Bifidobacterium bifidum*, %: панкреатический гидролизат казеина – 3,0; дрожжевой экстракт – 0,5;  $\alpha$ -Д-лактоза – 0,25; Д-глюкоза – 0,75; цистеина гидрохлорид – 0,05; NaCl – 0,25;  $\text{MgSO}_4$  – 0,05; кислота аскорбиновая – 0,05;  $\text{CH}_3\text{COONa}$  – 0,03; агар микробиологический – 0,09 (изготовитель – ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», г. Оболенск).

Культивирование молочнокислых бактерий глубинным способом для определения пребиотической активности ХОС проводили в орбитальном термостатируемом шейкере-инкубаторе (Biosan Orbital Shaker-Incubator ES-20, Латвия) при температуре 37 °С в течение 48 ч. В состав питательной среды (без добавления агара) ХОС из хитин-глюканового комплекса (ХтзГК), ХОС из хитозана, ХтзГК и хитозана добавляли в количестве 0,5 %, ориентируясь на данные, представленные в источнике [9]. Количество посевного материала составляло 10 %. Отбор проб проводили через 6, 12, 24, 48 ч. Культивирование прекращали при значительном уменьшении сахаров питательной среды, пиковом показателе биомассы продуцентов и КОЕ. После ферментации в культуральной жидкости определяли КОЕ в 1 мл среды методом предельных разведений.

Для получения хитозан-глюкановых комплексов (ХтзГК) использовали хитин-глюкановый комплекс, выделенный из плодовых тел грибов *Ganoderma lucidum*. Получение ХтзГК проводили по следующей оригинальной методике: 1000 г измельченных плодовых тел (размер частиц 100–500 мкм) экстрагировали 70 %-м раствором этанола в течение 48 ч в статических условиях. Остаток в виде биошрота высушивали при температуре 40 °С. Высушенный биошрот вывари-

вали с 1 N NaOH при температуре 85 °С в течение 4 ч. Остаток промывали сначала водопроводной, затем дистиллированной водой для удаления остаточного количества NaOH. Затем к массе остатка добавляли при гидромодуле 1 : 3 3 % раствор  $\text{H}_2\text{O}_2$  для депигментации. После чего повторно промывали дистиллированной водой. Остаток высушивали, измельчали и просеивали для получения размера частиц 10–50 мкм.

Дополнительную очистку хитозана и ХтзГК перед ферментативным гидролизом осуществляли следующим образом. Образцы хитозана (20 г) и ХтзГК растворяли в 1 л 1 %-го раствора уксусной кислоты. После фильтрации при пониженном давлении к фильтрату добавляли водный раствор 1 M NaOH для получения осадка. Осадок многократно промывали дистиллированной водой до достижения pH промывной воды около 7. Затем добавляли безводный изопропиловый спирт (200 мл) для удаления небольшого количества пигмента из хитозана и ХтзГК. После этого осадок высушивали в вакуумной печи. Очищенные хитозан и ХтзГК измельчали до порошкообразного состояния (10–50 мкм).

Ферментативный гидролиз хитозана и ХтзГК для получения хитоолигосахаридов осуществляли следующим образом. Раствор хитозана готовили путем диспергирования 3,00 г хитозана/ХтзГК в 20 мл воды, растворения в 12 мл 5 %-й уксусной кислоты и доведения объема до 60 мл водой. Значение pH полученного раствора хитозана/ХтзГК доводили до  $\leq 5,60$  с помощью NaOH. Добавляли 6 мл 1 %-го раствора ферментного комплекса целлюлазы (6000 ед/мл) и ксиланазы (1700 ед/мл) и инкубировали смесь в течение 24 ч при температуре 50 °С. Реакцию останавливали кипячением в течение 10 мин для денатурации ферментов, которые затем удаляли фильтрацией. Фильтрат концентрировали примерно до 1/20 на роторном испарителе при пониженном давлении. Затем добавляли достаточное количество спирта. Выход полученных образцов определяли гравиметрически.

Определение характеристической вязкости и молекулярной массы осуществляли следующим образом. Для растворения хитозана и ХтзГК в качестве растворителя применяли водный раствор 1 %-й уксусной кислоты, для растворения хитоолигосахаридов – дистиллированную воду.

Молекулярную массу (ММ) полученных образцов рассчитывали по уравнению Марка – Хаувинка – Куна

$$[\eta] = K_m M^\alpha,$$

где  $[\eta]$  – характеристическая вязкость;  $M$  – молекулярная масса;  $K_m$  и  $\alpha$  – эмпирические константы.

Литературные значения констант  $K$  и  $\alpha$  составляют  $1,81 \cdot 10^{-4}$  и  $0,93$  соответственно [10].

Характеристическую вязкость (ХВ) растворов хитозана, ХтзГК и хитоолигосахаридов определяли в модифицированном вискозиметре «Убеллоде» (СКБ «Пушино», Россия) с диаметром капилляра 0,3 мм при 25 °С (точность измерения  $\pm 0,1$  с). Значения характеристической вязкости рассчитывали двойной графической экстраполяцией зависимости  $\ln \eta_{\text{рнт}}/C$  от бесконечного разбавления [11].

Степени деацетилирования (СД) определяли методом потенциометрического титрования, описанным в работе [12].

Для статистической обработки данных использованы пакеты анализа Microsoft Excel 2021 (Microsoft, США). Эксперименты проводились в 3 повторностях. Различия между средними значениями считали статистически значимыми при  $p\text{-value} < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Известно, что хитиназа, хитозаназа и лизоцим способны гидролизовать частично N-ацетилированные хитозаны, при этом ферментативный гидролиз сопровождается преимущественным образованием димеров, тримеров и тетрамеров N-ацетил-D-глюкозамина. Хитозан также может расщепляться другими неспецифическими ферментами, такими как липаза, папаин, пектиназа и протеаза. Показано, что хитозан может подвергаться биотрансформации до хитоолигосахаридов со степенью полимеризации от 3 до 11 за счет воздействия целлюлазы, что является перспективным направлением в первую очередь, с экономической точки зрения. Стоимость целлюлазы значительно ниже стоимости вышеупомянутых ферментов [13].

Схема получения ХОС из хитозана и ХтзГК представлена на рисунке.

Согласно разработанной схеме, для получения ХОС может использоваться как хитозан, полученный из панцирей ракообразных, так и хитозан-глюкановый комплекс из биомассы высших грибов.

Ферментативный гидролиз хитозана и ХтзГК проводился в течение 24 ч при температуре 50 °С, pH 5,0 и использовании 1 %-го раствора ферментного комплекса целлюлазы и ксиланазы. Установлено, что ферментный комплекс оказывает значительное влияние на деполимеризацию хитозана и ХтзГК.

После 24-часового инкубирования полимеров с целлюлазой и ксиланазой из реакционной смеси отбирали образец, в который при перемешивании добавляли щелочной раствор (1 М NaOH). Отсутствие образования осадка свидетельствовало о деполимеризации хитозана с образованием низкомолекулярных олигомеров. Полученные результаты подтверждаются данными работы [13], в которой в масс-спектрах гидролизатов обнаружены пики, соответствующие массовым числам  $(M + Na)^+$  тримера тетрадекасахарида. Продукты реакции представлены преимущественно хитоолигосахаридами с преобладанием фракций со степенью полимеризации 3–11.

Сравнительный анализ процессов ферментативной деполимеризации хитозана и хитозан-глюкановых комплексов позволил оценить влияние природы исходного субстрата на характеристики получаемых хитоолигосахаридов. Физико-химические свойства образцов хитозана, ХтзГК и полученных из них ХОС, представлены в таблице 1. Процесс ферментативного получения ХОС из хитозан-глюкановых комплексов высших грибов характеризуется исключением стадий агрессивной деминерализации и депротеинизации, что отличает его от традиционной технологии переработки панцирей ракообразных. Ферментативная обработка хитозана позволяет получать более чистые хитоолигосахариды, тогда как гидролиз хитозан-глюкановых комплексов приводит к образованию смеси хитоолигосахаридов и  $\beta$ -глюкоолигосахаридов, обладающей потенциально более высокой биологической активностью.



Схема получения хитоолигосахаридов из хитозана и хитозан-гликоканового комплекса  
Schematic diagram of chito-oligosaccharide production from chitosan and chitosan-glucan complex

Таблица 1

**Физико-химические свойства образцов хитозана, ХтзГК и полученных из них ХОС**  
**Physicochemical properties of chitosan samples, chitosan-glucan complexes, and chito-oligosaccharides derived from them**

Образец	Характеристическая вязкость, дл · г <sup>-1</sup>	Молекулярная масса, кДа	Степень деацетилирования, %	Выход, % от сухого вещества
ХОС из ХтзГК	3,8±0,2	3,2±0,3	73,6±3,4	78,4±1,3
ХОС из хитозана	4,1±0,3	5,4±0,6	91,5±2,9	94,5±1,6
ХтзГК	20,8±2,1	45,4±2,1	66,7±2,3	10,2±0,8
Хитозан	44,5±1,9	113,6±4,2	88,2±3,1	–

Результаты исследований продемонстрировали, что выход ХОС из хитозана превышал выход ХОС из ХтзГК на 16,1 %. В ходе исследования физико-химических свойств хитозана, хитозан-гликокановых комплексов и хитоолигосахаридов установлено, что наибольшими показателями характеристической вязкости (44,5 дл · г<sup>-1</sup>), молекулярной массы (113,6 кДа) и степени деацетилирования (88,2 %) обладает коммерческий хитозан. При проведении сравнительной оценки с ХтзГК из биомассы грибов выявлены

значительные отличия по этим показателям. У ХтзГК значения ХВ, ММ и СД ниже на 53, 60 и 24 %.

Физико-химические свойства ХОС из хитозана и ХтзГК также отличались. Значения ХОС из хитозана превышали значения ХОС из ХтзГК по ХВ на 7,3 %, ММ на 40,7 и СД на 19,5 %.

Следующим этапом являлось исследование пребиотических свойств полученных ХОС при добавлении их в питательные среды (табл. 2).

**Зависимость концентрации молочнокислых бактерий от содержания в питательной среде источников углеводов при глубинном культивировании**  
**Dependence of lactic acid bacteria concentration on the content of carbohydrate sources in the nutrient medium during submerged cultivation**

Источник углевода в питательной среде	Пробиотические штаммы, КОЕ/мл				
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>B. bifidum</i>
Глюкоза	$1,44 \cdot 10^9$	$1,61 \cdot 10^9$	$1,78 \cdot 10^9$	$1,36 \cdot 10^9$	$2,42 \cdot 10^9$
ХОС из ХтзГК	$5,88 \cdot 10^6$	$5,94 \cdot 10^6$	$2,54 \cdot 10^6$	$3,83 \cdot 10^6$	$5,38 \cdot 10^6$
ХОС из хитозана	$2,38 \cdot 10^8$	$2,51 \cdot 10^8$	$4,47 \cdot 10^8$	$4,57 \cdot 10^8$	$7,04 \cdot 10^8$
ХтзГК	$8,7 \cdot 10^5$	$1,34 \cdot 10^5$	$3,23 \cdot 10^5$	$5,98 \cdot 10^5$	$7,94 \cdot 10^5$
Хитозан	$1,28 \cdot 10^6$	$1,01 \cdot 10^6$	$1,22 \cdot 10^6$	$1,03 \cdot 10^6$	$2,04 \cdot 10^6$

В результате проведенных исследований установлено, что молочнокислые бактерии показывают максимальный рост на питательной среде, содержащей ХОС из хитозана, достигая наибольших значений от  $2,38$  до  $7,04 \cdot 10^8$  КОЕ/мл. Культивирование штаммов на среде с хитозаном показало более низкие значения КОЕ/мл: от  $1,01$  до  $2,04 \cdot 10^6$ .

Необходимо отметить, что хитозан с невысокой молекулярной массой является стимулятором роста молочнокислых бактерий. Однако он может вызывать ингибирование микроорганизмов за счет своей выраженной антибактериальной активности, которая усиливается при достижении высокой молекулярной массы [14].

ХОС имеют меньший размер молекул, чем хитозан, и следовательно, меньшую вязкость и большую растворимость в водных растворах, что усиливает их пребиотические свойства. Пробиотические бактерии (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) эффективно гидролизуют  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидные связи ХОС до моносахаридов, которые интегрируются в центральный углеродный метаболизм, обеспечивая энергетические и пластические потребности клетки. Одновременно ХОС функционируют как сигнальные молекулы, индуцирующие экспрессию специфических оперонов утилизации и стимулирующие синтез защитных экзополисахаридов, что повышает резистентность бактерий к стрессовым факторам желудочно-кишечного тракта. Ключевым элементом селективности является способность пробиотических микроорганизмов ферментировать ХОС с активной продукцией короткоцепочечных жирных кислот, что приводит к локальному снижению pH и редокс-потенциала среды, создавая условия, благоприятные для развития полезной микрофлоры и подавляющие рост патогенных конкурентов.

Полученные экспериментальные данные с использованием в качестве компонентов питательной среды хитозана и полученных из него ХОС незначительно отличались от результатов культивирования на питательной среде с глюкозой. В то же время рост на питательных средах с ХтзГК и ХОС из ХтзГК показал более низкие значения от  $1,34$  до  $8,7 \cdot 10^5$  и от  $2,54$  до  $5,94 \cdot 10^6$  КОЕ/мл. Это обусловлено тем, что в структуре хитозан-глюканового комплекса присутствуют  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюканы, которые могут ингибировать рост бактерий [15]. Установлено, что ХОС с более высокой молекулярной массой также ингибируют рост многих молочнокислых бактерий [16].

Морфологические характеристики клеток пробиотических штаммов бактерий при культивировании на исследуемых питательных средах различного состава существенно не отличались.

Таким образом, проведенные исследования показывают перспективность использования ферментного препарата «Целлолюкс-А» при получении ХОС, обладающих пребиотическими свойствами, как из хитозана ракообразных, так и из хитозан-глюкановых комплексов высших грибов.

### Заключение

1. Впервые доказана высокая эффективность применения доступного ферментного препарата «Целлолюкс-А» (целлюлаза – 6000 ед/мл, ксиланаза – 1700 ед/мл) для получения хитоолигосахаридов из различных источников. Показано, что этот подход является экономически выгодной альтернативой использованию специфических, дорогостоящих ферментов (хитиназы и хитозаназы), недоступных для промышленного получения ХОС. Экономическая эффективность метода обусловлена низкой

стоимостью препарата «Целлолюкс-А» (широко используется в сельском хозяйстве и пищевой промышленности), упрощением и ускорением технологического процесса за счет использования мягких и легко контролируемых условий неспецифического ферментативного гидролиза (температура – 50 °С, pH – 5,0, время – 24 ч) и возможностью применения стандартного производственного оборудования. Полученные результаты открывают перспективу для масштабирования технологии получения ХОС с заданными функциональными свойствами.

2. Комплексно изучены физико-химические свойства образцов хитозана из ракообразных, хитозан-глиукановых комплексов из биомассы высших грибов и полученных из них хитоолигосахаридов. Установлено, что ХОС, полученные из хитозана, характеризуются более высокими показателями характеристической вязкости (4,1 дл · г<sup>-1</sup>), молекулярной массы (5,4 кДа) и степени деацетилирования (91,5 %), что превышает соответствующие значения для ХОС из хитозан-глиуканового комплекса грибов *Ganoderma lucidum* на 7,9 %, 68,8 и 24,3 % соответственно. Выявлены корреляционные зависимости между этими показателями и пребиотической активностью: оптимальный баланс молекулярной массы (3–6 кДа) и высокая степень деацетилирования (> 90 %) обеспечивают максимальную биодоступность и усвояемость олигосахаридов пробиотическими микроорганизмами. При этом выход ХОС из хитозана (94,5 %) значительно превышает выход из ХтзГК (78,4 %), что дополнительно подтверждает технологическую эффективность данного подхода.

3. Впервые проведена комплексная оценка пребиотической активности хитозана, хитозан-глиукановых комплексов и хитоолигосахаридов в отношении пяти ключевых для пищевой промышленности пробиотических штаммов. Установлено, что ХОС из хитозана проявляют выраженную стимулирующую активность в отношении всех тестируемых штаммов, особенно *Bifidobacterium*

*bifidum*. При добавлении ХОС в питательную среду количество колониеобразующих единиц на мл составило для *L. acidophilus* – 2,38 · 10<sup>8</sup>; *L. casei* – 2,51 · 10<sup>8</sup>; *L. rhamnosus* – 4,47 · 10<sup>8</sup>; *L. plantarum* – 4,57 · 10<sup>8</sup>; *B. bifidum* – 7,04 · 10<sup>8</sup>. ХОС из ХтзГК показали более низкую пребиотическую активность (2,54–5,88 · 10<sup>6</sup> КОЕ/мл) в сравнении с ХОС из хитозана. Выявлены значительные различия в эффективности ХОС в зависимости от источника их получения: активность ХОС из хитозана превышает активность ХОС из ХтзГК в 37–85 раз, что связано с присутствием в хитозан-глиукановом комплексе грибов α- и β-глиуканов, снижающих биодоступность полученных олигомеров. Полученные данные позволяют рекомендовать ХОС с молекулярной массой 5–6 кДа и степенью деацетилирования > 90 % в качестве эффективных пребиотических добавок для функциональных пищевых продуктов.

4. На основании проведенных исследований разработаны научно обоснованные рекомендации по выбору оптимального сырья и условий получения ХОС с пребиотическими свойствами. Результаты исследования соответствуют приоритетным направлениям развития биотехнологии в Российской Федерации и могут быть использованы для создания отечественных пребиотических препаратов, способствующих решению задач импортозамещения в пищевой и сельскохозяйственной отраслях. Перспективы дальнейших исследований включают изучение *in vivo* эффектов полученных ХОС, оптимизацию технологических параметров для промышленного производства, а также разработку функциональных пищевых продуктов с использованием синтезированных хитоолигосахаридов. Особый интерес представляет исследование синергетического действия ХОС из хитозана и β-глиуканов из грибов, которое может расширить спектр их биологической активности и повысить эффективность применения в профилактике метаболических нарушений и заболеваний желудочно-кишечного тракта.

#### Список источников

1. Wu M., Li J., An Y., et al. Chitooligosaccharides prevents the development of colitis-associated colorectal cancer by modulating the intestinal microbiota and mycobiota // *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 10. P. 2101. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02101.
2. Guan Z., Feng Q. Chitosan and chitooligosaccharide: the promising non-plant-derived prebiotics with multiple biological activities // *International journal of molecular sciences*. 2022. Vol. 23, N 12. P. 6761. DOI: 10.3390/ijms23126761. EDN: XICONX.
3. Vela Gurovic M.S., Dello Staffolo M., Montero M., et al. Chitooligosaccharides as novel ingredients of fermented foods // *Food & Function*. 2015. Vol. 6, N 11. P. 3437–3443. DOI: 10.1039/c5fo00546a.

4. Kim S.K. Chitooligosaccharides: prevention and control of diseases. Cham: Springer International Publishing, 2022. DOI: 10.1007/978-3-030-92806-3.
5. Kaczmarek M.B., Struszczyk-Swita K., Li X., et al. Enzymatic modifications of chitin, chitosan, and chitooligosaccharides // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2019. Vol. 7, N Sep. P. 243. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00243. EDN: RRDJUU.
6. Mazidi M., Rezaie P., Kengne A.P., et al. Gut microbiome and metabolic syndrome // *Diabetes & metabolic syndrome*. 2016. Vol. 10. P. 150–157. DOI: 10.1016/j.dsx.2016.01.024. EDN: YWILKT.
7. Liaqat F., Eltem R. Chitooligosaccharides and their biological activities: a comprehensive review // *Carbohydrate Polymers*. 2018. Vol. 184. P. 243–259. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.12.067. EDN: YEPPJZ.
8. Wang Q., Jiang Y., Luo X., et al. Chitooligosaccharides modulate glucose-lipid metabolism by suppressing SMYD3 pathways and regulating gut microflora // *Marine drugs*. 2020. Vol. 18, N 1. P. 69. DOI: 10.3390/md18010069. EDN: UBZZTU.
9. Ismail S.A., El-Sayed H.S., Fayed B. Production of prebiotic chitooligosaccharide and its nano/microencapsulation for the production of functional yoghurt // *Carbohydrate Polymers*. 2020. Vol. 234. Art. 115941. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.115941. EDN: ZMYDJU.
10. De Farias B.S., Grundmann D.D.R., Rizzi F.Z., et al. Production of low molecular weight chitosan by acid and oxidative pathways: effect on physicochemical properties // *Food Research International*. 2019. Vol. 123. P. 88–94. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.04.051. EDN: TQCXPX.
11. Давыдова В.Н., Володько А.В., Горбач В.И., и др. Влияние хитозана на способность липополисахарида взаимодействовать с клетками иммунной системы // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2024. Т. 60, № 2. С. 158–166. DOI: 10.31857/S0555109924020051. EDN: GAWNZC.
12. Amamou O., Kefil S., Denis J.-P., et al. Revisiting the determination of the degree of deacetylation using potentiometric titration: a new equation for modified chitosan // *Molecules*. 2024. Vol. 29, N 13. P. 2962. DOI: 10.3390/molecules29132962. EDN: GSKLQE.
13. Naveed M., Phil L., Sohail M., et al. Chitosan oligosaccharide (COS): an overview // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. Vol. 129. P. 827–843. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.192.
14. Gonçalves C., Ferreira N., Lourenço L. Production of low molecular weight chitosan and chitooligosaccharides (COS): a review // *Polymers*. 2021. Vol. 13, N 15. Art. 2466. DOI: 10.3390/polym13152466. EDN: LPROZU.
15. Минаков Д.В., Саврасов Е.С., Мусина О.Н. Полисахариды высших грибов: систематизация данных о выделении, структуре, биологических свойствах и пребиотическом потенциале // *Химия растительного сырья*. 2025. № 3. С. 60–87. DOI: 10.14258/jcprm.20250317374. EDN: IIOCQZ.
16. Rakkhumkaew N., Pengsuk C. Chitosan and chitooligosaccharides from shrimp shell waste: characterization, antimicrobial and shelf life extension in bread // *Food science and biotechnology*. 2018. Vol. 27, N 4. P. 1201–1208. DOI: 10.1007/s10068-018-0332-2. EDN: PBWURU.

## References

1. Wu M, Li J, An Y, et al. Chitooligosaccharides prevents the development of colitis-associated colorectal cancer by modulating the intestinal microbiota and mycobiota. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10:2101. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02101.
2. Guan Z, Feng Q. Chitosan and chitooligosaccharide: the promising non-plant-derived prebiotics with multiple biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(12):6761. DOI: 10.3390/ijms23126761. EDN: XICONX.
3. Vela Gurovic MS, Dello Staffolo M, Montero M, et al. Chitooligosaccharides as novel ingredients of fermented foods. *Food & Function*. 2015;6(11):3437-3443. DOI: 10.1039/c5fo00546a.
4. Kim SK. *Chitooligosaccharides: prevention and control of diseases*. Cham: Springer International Publishing; 2022. 352 p. DOI: 10.1007/978-3-030-92806-3.
5. Kaczmarek MB, Struszczyk-Swita K, Li X, et al. Enzymatic modifications of chitin, chitosan, and chitooligosaccharides. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019;7(SEP):243. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00243. EDN: RRDJUU.

6. Mazidi M, Rezaie P, Kengne AP, et al. Gut microbiome and metabolic syndrome. *Diabetes & Metabolic Syndrome*. 2016;10:150-157. DOI: 10.1016/j.dsx.2016.01.024. EDN: YWILKT.
7. Liaqat F, Eltem R. Chitooligosaccharides and their biological activities: a comprehensive review. *Carbohydrate Polymers*. 2018;184:243-259. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.12.067. EDN: YEPPJZ.
8. Wang Q, Jiang Y, Luo X, et al. Chitooligosaccharides modulate glucose-lipid metabolism by suppressing SMYD3 pathways and regulating gut microflora. *Marine Drugs*. 2020;18(1):69. DOI: 10.3390/md18010069. EDN: UBZZTU.
9. Ismail SA, El-Sayed HS, Fayed B. Production of prebiotic chitooligosaccharide and its nano/microencapsulation for the production of functional yoghurt. *Carbohydrate Polymers*. 2020;234:115941. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.115941. EDN: ZMYDJU.
10. De Farias BS, Grundmann DDR, Rizzi FZ, et al. Production of low molecular weight chitosan by acid and oxidative pathways: effect on physicochemical properties. *Food Research International*. 2019;123:88-94. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.04.051. EDN: TQCXPX.
11. Davydova VN, Volodko AV, Gorbach IV, et al. Influence of chitosan on the ability of LPS to interact with cells of the immune system. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2024;60(2):158-166. (In Russ.). DOI: 10.31857/S0555109924020051. EDN: GAWNZC.
12. Amamou O, Kefil S, Denis JP, et al. Revisiting the determination of the degree of deacetylation using potentiometric titration: a new equation for modified chitosan. *Molecules*. 2024;29(13):2962. DOI: 10.3390/molecules29132962. EDN: GSKLQE.
13. Naveed M, Phil L, Sohail M, et al. Chitosan oligosaccharide (COS): an overview. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;129:827-843. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.192.
14. Gonçalves C, Ferreira N, Lourenço L. Production of low molecular weight chitosan and chitooligosaccharides (COS): a review. *Polymers*. 2021;13(15):2466. DOI: 10.3390/polym13152466. EDN: LPROZU.
15. Minakov DV, Savrasov ES, Musina ON. Polysaccharides of higher fungi: systematization of data on extraction, structure, bio-logical properties, and prebiotic potential. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2025;3:60-87. (In Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20250317374. EDN: IIOCQZ
16. Rakkhumkaew N, Pengsuk C. Chitosan and chitooligosaccharides from shrimp shell waste: characterization, antimicrobial and shelf life extension in bread. *Food Science and Biotechnology*. 2018;27(4):1201-1208. DOI: 10.1007/s10068-018-0332-2. EDN: PBWURU.

Статья принята к публикации 19.03.2026 / The article accepted for publication 19.03.2026.

Информация об авторах:

**Денис Викторович Минаков**, научный сотрудник Центра комплексных исследований и экспертной оценки пищевой продукции «АлтайБиоЛакт», доктор технических наук

**Евгений Сергеевич Саврасов**, стажер-исследователь Центра комплексных исследований и экспертной оценки пищевой продукции «АлтайБиоЛакт», аспирант кафедры органической химии

**Ольга Николаевна Мусина**, главный научный сотрудник, доцент Центра комплексных исследований и экспертной оценки пищевой продукции «АлтайБиоЛакт», доктор технических наук

Information about the authors:

**Denis Viktorovich Minakov**, Researcher at the AltaiBioLakt Center for Comprehensive Research and Expert Evaluation of Food Products, Doctor of Technical Sciences

**Evgeny Sergeevich Savrasov**, Research Intern at the AltaiBioLakt Center for Comprehensive Research and Expert Evaluation of Food Products, Postgraduate Student at the Department of Organic Chemistry

**Olga Nikolaevna Musina**, Chief Researcher and Associate Professor at the AltaiBioLakt Center for Comprehensive Research and Expert Evaluation of Food Products, Doctor of Technical Sciences