



УДК 547.458

## Изучение молекулярно-массового распределения хитозана из мицелия гриба *Aspergillus niger* методом гель-хроматографии

© 2020 Велинзон П.З., Новинюк Л.В.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок – филиал федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр пищевых систем имени В.М. Горбатова» РАН, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 27.03.2020 г.

DOI: 10.17308/sorpchrom.2020.20/2956

В статье представлены результаты изучения молекулярного состава хитозана, выделенного из мицелия гриба *Aspergillus niger*, в сравнении с образцом фирмы Fratelli Parodi (контроль). Хитозан представляет собой сополимер глюкозамина и ацетилглюкозамина и является полимолекулярным биополимером. Возможности применения хитозана во многом определяются его сорбционной и биологической активностью, которая, в значительной степени, зависит от молекулярной массы. Целью работы является изучение молекулярно-массового распределения (ММР) полимерных молекул хитозана с использованием метода гель-проникающей хроматографии.

Получены хроматограммы выхода полимерных молекул изученных образцов хитозана, на которых наблюдается наличие 3-х характерных пиков, соответствующих трём основным фракциям: высокомолекулярной (ММ 34-105 кДа), фракции со средней молекулярной массой (ММ 17.5-27.5 кДа) и низкомолекулярной (ММ 4.5-13.5 кДа). Установлен молекулярно-массовый состав, определена среднечисловая и среднечисловая молекулярная масса отдельных фракций хитозанов.

Построены кривые ММР, характеризующие молекулярно-массовое распределение по фракциям. Анализ кривых ММР показывает, что полученный из мицелия гриба *Aspergillus niger* и контрольный образцы, имеют относительно идентичный полимолекулярный состав. Основную долю составляет высокомолекулярная фракция около 60%. Массовая доля фракции со средней молекулярной массой в контрольном образце хитозана составляет 20%, а в опытном – 10%. Доля низкомолекулярной фракции в контрольном образце хитозана составляет около 20%, а в опытном – 30%. При этом показано, что дисперсия молекулярных масс близка к 1, что характерно для мономолекулярных биополимеров.

**Ключевые слова:** хитозан, мицелий гриба *Aspergillus niger*, биополимерные молекулы, гель-хроматография, хроматограммы, молекулярно-массовое распределение, среднечисловая и среднечисловая молекулярные массы.

### Введение

В настоящее время достаточно широкое применение в различных областях науки, техники, медицины, сельского хозяйства и косметологии находит хитозан – полиаминосахарид природного происхождения [1,2]. Возможности применения хитозана во многом определяются его сорбционной и биологической активностью, которая, в значительной степени, зависит от молекулярной массы данного биополимера [3,4]. Молекулярная масса полимера оказывает влияние также на биоцидные (антибактериальные, антигрибковые) и иммуномодулирующие свойства хитозана [5]. Установлено, что высокомолекулярный хитозан обладает наибольшим антибактери-

альным эффектом. Низкомолекулярные водорастворимые хитозаны с молекулярной массой от 2 до 30 кДа теряют эффективность антимикробного действия [6,7].

Хитозан представляет собой сополимер глюкозамина и ацетилглюкозамина и является полидисперсным биополимером. Более полную характеристику свойств хитозана может дать определение молекулярно-массового распределения (ММР), включающего средневесовую и среднечисленную молекулярные массы и дисперсию молекулярных масс [8]. Наиболее изучено ММР хитозана, полученного из панцирей ракообразных [9,10]. Нами разработана схема получения хитозана из мицелиальной массы гриба *Aspergillus niger* – продуцента лимонной кислоты [11]. Исследование его молекулярно-массовых характеристик представляет собой научный и практический интерес.

Известны результаты исследования хитозана с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографических колонках, заполненных полидивинилбензолом или другим полимером [9]. Этот метод широко применяется для определения молекулярно-массового распределения полимеров со средней молекулярной массой.

Для определения ММР возможно также воспользоваться методом гель-фильтрации (гель-хроматографии) на хроматографических колонках, заполненных набухшим гранулированным гелем Sephadex. В качестве элюента применяют разбавленные растворы кислот или солей, не вызывающие деструкцию геля. Выбор марки геля определяется размерами пор в гранулах геля и величиной ячеек между гранулами. Молекулы исследуемого полимера диффундируют внутрь гранулы и задерживаются в порах при фильтрации, а более крупные молекулы, попадая в ячейки, проходят между гранулами и выводятся из колонки вместе с элюентом [12].

Целью данной работы является изучение ММР полимерных молекул хитозана, выделенного из мицелиальной биомассы гриба *Aspergillus niger*, с использованием метода гель-хроматографии.

## Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования использованы образцы хитозана, полученные по разработанному способу [13] из мицелиальной биомассы гриба *Aspergillus niger*. Клеточная стенка гриба *Aspergillus niger* содержит хитин-глюкановый комплекс, из которого выделен хитозан. Технология выделения хитозана включает щелочной и кислотный гидролиз исходного мицелия на стадиях депротеинизации и деминерализации для удаления белковых и минеральных примесей, проведение высокотемпературного деацетилирования хитин-глюканового комплекса и извлечения хитозана из полученного хитозан-глюканового комплекса раствором уксусной кислоты. Экспериментально исследован образец хитозана из мицелия гриба *Aspergillus niger* со степенью деацетилирования 70%. В качестве контрольного образца изучен хитозан фирмы Fratelli Parodi (Италия) со степенью деацетилирования 85%. Для проведения хроматографических исследований использовались растворы хитозана в 1%-м растворе соляной кислоты.

Молекулярную массу определяли по калибровочному графику, построение которого осуществлялось с использованием растворов-стандартов с известной молекулярной массой (альбумин, химотрипсин). Измерение оптической плотности растворов (D) проводили на спектрофотометре СФ-26 при длине волны  $\lambda=280$  нм относительно раствора элюента (0.9%-й водный раствор NaCl). В качестве маркера использовали раствор рибофлавина (ММ 376.36 Да,  $\lambda=480$  нм). Полученный калибровочный график представляет собой линейную зависимость соотношения объёмов

выхода стандартного вещества и маркера (y) от lg MM (x), которая описывается уравнением:

$$y = -0.5844x + 3.1656 \quad (1)$$

Исследования проводились на хроматографической колонке с параметрами: внутренний диаметр – 13 мм; высота столба геля – 57 см; внутренний объем  $V_i = 75.6 \text{ см}^3$ , заполненной гелем Sephadex G-75. Для этого типа геля область разделения по молекулярной массе находится в пределах от 3000 до 100000 Да [12]. Скорость элюирования составляла  $32 \text{ см}^3/\text{ч}$ .

Для определения молекулярной массы хитозана  $1 \text{ см}^3$  исследуемого раствора вводили в хроматографическую колонку, осуществляли непрерывное поступление элюента и отбирали пробы объемом по  $3.5 \text{ см}^3$ . Измерение оптической плотности выделенных проб проводили относительно раствора элюента на спектрофотометре СФ-26 при длине волны, соответствующей максимуму поглощения.

### Обсуждение результатов

Анализ полученных хроматограмм (рис. 1) указывает на наличие 3-х пиков, обусловленных присутствием в исследуемых образцах биополимеров трех фракций: высокомолекулярной, фракции со средней молекулярной массой и низкомолекулярной фракции.

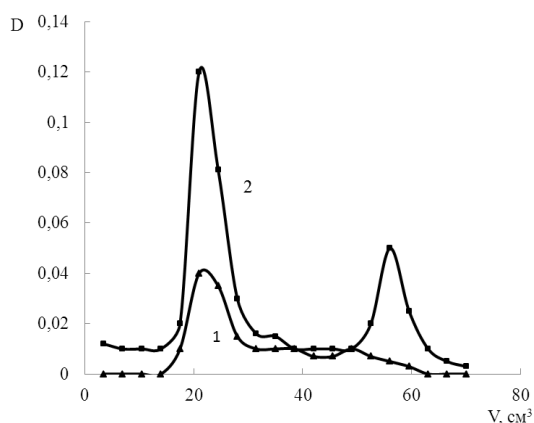


Рис. 1. Хроматограммы выхода полимерных молекул хитозана: 1 – хитозан из мицелия гриба *Aspergillus niger*, 2 – образец хитозана фирмы Fratelli Parodi

Fig. 1. Chromatograms of the polymer molecules of chitosan: 1 – chitosan obtained from the mycelium of the *Aspergillus niger* fungus, 2 – chitosan sample produced by Fratelli Parodi

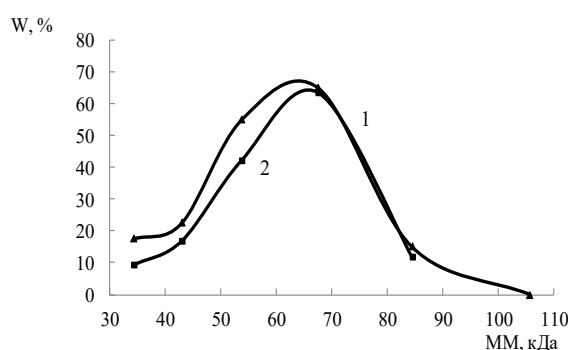


Рис. 2. ММР высокомолекулярной фракции хитозана: 1 – хитозан из мицелия гриба *Aspergillus niger*, 2 – образец хитозана фирмы Fratelli Parodi

Fig. 2. MWD of the high molecular weight chitosan fraction: 1 – chitosan obtained from the mycelium of the *Aspergillus niger* fungus, 2 – chitosan sample produced by Fratelli Parodi

По экспериментальным хроматограммам и уравнению калибровочного графика (1) определены молекулярные массы и получены кривые молекулярно-массового распределения (рис. 2-4), характеризующие фракционный молекулярный состав исследованных биополимеров.

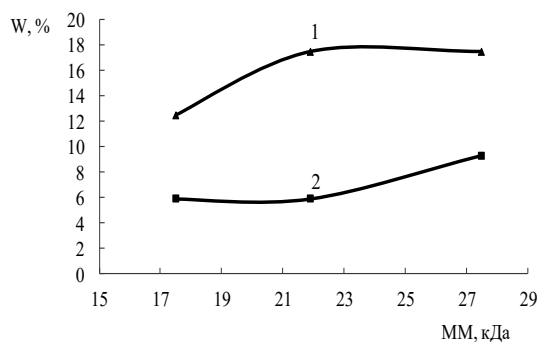


Рис. 3. ММР фракции хитозана со средней молекулярной массой: 1 – хитозан из мицелия гриба *Aspergillus niger*, 2 – образец хитозана фирмы Fratelli Parodi  
 Fig. 3. MWD of the average molecular weight fraction 1 – chitosan obtained from the mycelium of the *Aspergillus niger* fungus, 2 – chitosan sample produced by Fratelli Parodi

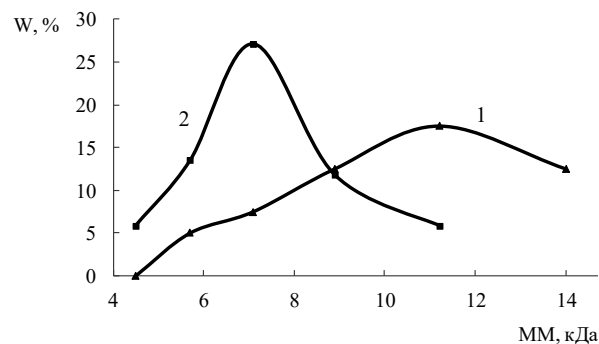


Рис. 4. ММР низкомолекулярной фракции хитозана: 1 – хитозан из мицелия гриба *Aspergillus niger*, 2 – образец хитозана фирмы Fratelli Parodi  
 Fig. 4. MWD of the low molecular weight chitosan fraction: 1 – chitosan from the mycelium of the *Aspergillus niger* fungus, 2 – chitosan sample produced by Fratelli Parodi

Массовую долю полимерных молекул во фракциях ( $W$ , %) определяли по уравнению (2):

$$W = \frac{h_i}{\sum h_i} 100 \quad (2)$$

где  $h_i$  – высота пика отобранной пробы, мм.

По соответствующим уравнениям рассчитаны характеристики молекулярно-массового распределения для отдельных фракций изученных биополимеров хитозана: среднечисленная –  $M_N$  (3) и средневесовая (среднемассовая) –  $M_W$  (4) молекулярная масса, а также дисперсия ( $M_W/M_N$ ) (5) [14].

$$M_N = \frac{\sum h_i}{\sum (h_i/M_i)} \quad (3)$$

$$M_W = \frac{\sum (h_i \cdot M_i)}{\sum h_i} \quad (4)$$

где  $M_i$  – молекулярная масса полимерных молекул хитозана в отобранной пробе, кДа.

Результаты расчёта молекулярно-массового распределения исследованных хитозанов представлены в таблице.

Анализ кривых ММР показывает, что изученные образцы хитозана, полученного из мицелия гриба *Aspergillus niger* и фирмы Fratelli Parodi имеют относительно идентичный полимолекулярный состав. Основную долю составляет высокомолекулярная фракция (около 60%) с молекулярной массой от 34 до 85 кДа в хитозане фирмы Fratelli Parodi и от 34 до 105 кДа в опытном образце, полученном из мицелия гриба *Aspergillus niger*. Массовая доля фракции со средней молекулярной массой (17-27,5 кДа) ниже в образце из мицелия (~10%) по сравнению с контрольным (20%), в то время как низкомолекулярная фракция в опытном образце составляет (~30%), а в контрольном (~20%).

Таблица. Показатели молекулярно-массового распределения исследованных гель-хроматографическим методом хитозанов

Table. Molecular weight distribution of chitosans studied by means of gel chromatography

№ п/п	Образец хитозана	Фракция хитозана	M, кДа	M <sub>N</sub> , кДа	M <sub>w</sub> , кДа	M <sub>w</sub> /M <sub>N</sub>
1	из мицелия гриба <i>Aspergillus niger</i>	Высокомолекулярная	34.3-105.8	54.86	54.83	0.999
		Фракция со средней молекулярной массой	17.5-27.5	22.13	22.85	1.03
		Низкомолекулярная фракция	4.54-13.9	9.38	10.14	1.08
2	Образец фирмы Fratelli Parodi	Высокомолекулярная	34.3-84.5	56.90	59.93	1.05
		Фракция со средней молекулярной массой	17.5-27.5	22.25	23.05	1.04
		Низкомолекулярная фракция	4.54-11.2	6.86	7.25	1.06

Установлено, что дисперсия молекулярных масс для всех трёх фракций исследованных образцов близка к 1, то есть значения среднемассовой и среднечисловой молекулярной массы практически равны, что, как известно, характерно для мономолекулярных биополимеров в отличие от синтетических полимолекулярных полимеров [8, 15]

### Заключение

В результате проведённых исследований методом гель-проникающего фильтрования с использованием геля Sephadex G-75 получены хроматограммы выхода солянокислого раствора хитозана, выделенного из мицелия гриба *Aspergillus niger*, в сравнении с образцом хитозана фирмы Fratelli Parodi. Установлено наличие в хроматограммах 3-х характерных пиков, отвечающих присутствием в них трёх фракций, соответственно – высокомолекулярной (ММ 34-105 кДа), со средней молекулярной массой (ММ 17.5-27.5 кДа) и низкомолекулярной (ММ 4.5-13.5 кДа).

Изучение ММР позволило определить молекулярно-массовый состав, среднемассовую и среднечисловую молекулярную массу, дисперсию молекулярных масс отдельных фракций исследованных хитозанов. Равенство значений  $M_w=M_N$  позволило сделать вывод о мономолекулярном характере изученных биополимеров.

### Список литературы

1. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение. Под ред. Скрябина К.Г., Вихоревой Г.А., Варламова В.П. М. Наука. 2002. 368 с.
2. Хитозан / Под ред. Скрябина К.Г., Михайлова С.Н., Варламова В.П. М. Центр Биоинженерия РАН. 2013. 593 с.
3. Новинюк Л.В., Кулев Д.Х., Негруца И.В., Велинзон П.З. // *Пищевые системы*. 2018. Т.1. № 2. С. 55-62.
4. Попова Э.В., Домнина Н.С., Коваленко Н.М., Борисова Е.А. и др. // *Вестник защиты растений*. 2017. № 3 (93). С. 28-33.
5. Hadrami I., Daayf F. // *Marine Drugs*. 2010. Vol. 8. No 4. pp. 968-987.
6. Куликов С.Н., Хайруллин Р.З. Хитозан. М. Центр Биоинженерия РАН. 2013. С. 363-407.
7. Куликов С.Н. Тихонов В.Е., Безродных Е.А., Лопатин С.А. и др. // *Биоорганическая химия*. 2015. Т. 41. № 1. С. 67-73.
8. Тагер А.А. Физико-химия полимеров. М. Научный мир. 2007. 576 с.
9. Хабаров В.Б., Пронин А.Я., Буряк А.К. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2011. Т. 11. № 3. С. 292-298.

10. Шагдарова Б.Ц., Левов А.Н., Варламов В.П. // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2013. Т. 15. №3 (5). С. 1694-1696.
11. Новинюк, Л.В., Кулёв, Д.Х., Велинзон, П.З., Шарова Н.Ю. // *Пищевая промышленность*. 2016. № 11. С. 30-31.
12. Детерман Г. Гель-хроматография. М. Мир. 1970. 252 с.
13. Новинюк Л.В., Кабанов В.Л., Кулёв Д.Х., Велинзон П.З. Патент РФ. № 2678125. 2019.
14. Хабаров В.Б., Пронин А.Я., Гринь А.В., Самуйленко А.Я. // "Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана", сборник трудов VIII Международной конференции. М. Изд-во ВНИРО. 2006. С. 139-145.
15. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия. М. Высшая школа. 2002. 479 с.

## Studying the molecular weight distribution of chitosan obtained from the mycelium of *Aspergillus niger* fungus by means of gel chromatography

© 2020 Velinzon P.Z., Novinyuk L.V.

*All-Russian Research Institute of Food Additives – Branch of Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Center of Food Systems named after V.M. Gorbachev" RAS, St. Petersburg*

The article presents the results of the study of molecular chitosan obtained from the mycelium of the *Aspergillus niger* fungus as compared to a sample produced by Fratelli Parodi (control sample). Chitosan is a copolymer of glucosamine and N-acetylglucosamin and a polymolecular biopolymer. The applications of chitosan are largely determined by its sorption and biological activity, which depends a lot on the molecular mass. The aim of our study was to investigate the molecular weight distribution (MWD) of the polymer molecules of chitosan using gel permeation chromatography.

The obtained chromatograms of the output of the polymer molecules of the studied chitosan samples demonstrated 3 characteristic peaks, corresponding to the three main fractions: a high molecular weight fraction (MM 34-105 kDa), an average molecular weight fraction (MM 17.5-27.5 kDa) and a low molecular weight fraction (MM 4.5-13.5 kDa). The study determined the molecular weight composition, the weight- and number-average weight of certain chitosan fractions.

The MWD curves characterising the molecular weight distribution among fractions were obtained. The analysis of the curves demonstrated that the sample obtained from the mycelium of the *Aspergillus niger* fungus and the control sample have relatively identical polymolecular composition. The largest fraction is the high molecular weight fraction (about 60%). The mass fraction of the average molecular weight fraction in the control chitosan sample is 20%, while in the studied sample it is 10%. The portion of the low molecular weight fraction is 20% in the control sample and 30% in the studied sample. It is demonstrated that the dispersion of molecular weights is close to 1, which is characteristic of monomolecular biopolymers.

**Keywords:** chitosan, *Aspergillus niger* fungus mycelium, biopolymer molecules, gel chromatography, chromatograms, molecular weight distribution, weight- and number-average molecular weight.

### References

1. *Xitin i xitozan: poluchenie, svojstva i primeneniye.*, Pod red. Skryabina K.G., Vixorevoj G.A., Varlamova V.P. M., Nauka Publ., 2002, 368 p.
2. *Xitozan*, Pod red. Skryabina K.G., Mixajlova S.N., Varlamova V.P., M., Centr Bioinzheneriya RAN, 2013, 593 p.
3. Novinyuk L.V., Kulev D.X., Negrucza I.V., Velinzon P.Z., Pishhevy'e sistemy', 2018, Vol. 1, No 2, pp. 55-62.
4. Popova E.V., Domnina N.S., Kovalenko N.M., Borisova E.A. et al., *Vestnik zashhity rastenij*, 2017, No 3 (93), pp. 28-33.
5. Hadrami I., Daayf F., *Marine Drugs*, 2010, Vol. 8, No 4, pp. 968-987.
6. Kulikov S.N., Xajrullin R.Z., Xitozan, M., *Centr Bioinzheneriya RAN*, 2013, pp. 363-407.
7. Kulikov S.N. Tixonov V.E., Bezrodny'x E.A., Lopatin S.A et al., *Bioorganicheskaya khimiya*, 2015, Vol. 41, No 1, pp. 67-73.
8. Tager A.A., Fiziko-ximiya polimerov, M., Nauchny'j mir, 2007, 576 p.

9. Xabarov V.B., Pronin A.Ya., Buryak A.K., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2011, Vol. 11, No 3, pp. 292-298.
10. Shagdarova B.Cz., Levov A.N., Varlamov V.P., *Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk*, 2013, Vol. 15, No 3 (5), pp. 1694-1696.
11. Novinyuk, L.V., Kulyov, D.X., Velinzon, P.Z. et al., *Pishhevaya promy`shlennost*, 2016, No 11, pp. 30-31.
12. Determan G., *Gel-khromatografiya*, M., Mir Publ, 1970, 252 p.
13. Novinyuk L.V., Kabanov V.L., Kulyov D.X., Velinzon P.Z. Patent RF, No 2678125, 2019.
14. Khabarov V.B., Pronin A.Ya., Grin` A.V., Samujlenko A.Ya., "Sovremenny`e perspektivy` v issledovanii xitina i xitozana", sbornik trudov VIII Mezhdunarodnoj konferencii, M., Izd-vo VNIRO, 2006, pp. 139-145.
15. Knorre D.G., My`zina S.D. *Biologicheskaya khimiya*, M., Vy`sshaya shkola Publ., 2002, 479 p.

**Велинзон Полина Залмановна** – к.т.н., младший научный сотрудник, доцент, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок - филиал федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр пищевых систем имени В.М. Горбатова» РАН, Санкт-Петербург

**Новинюк Людмила Васильевна** – к.т.н., старший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок - филиал федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр пищевых систем имени В.М. Горбатова» РАН, Санкт-Петербург

**Velinzon Polina Z** – k.t., junior researcher, associate professor, All-Russian Research Institute of Food Additives - Branch of Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Center of Food Systems named after V.M. Gorbachev" RAS, St. Petersburg, E-mail: [aise50@rambler.ru](mailto:aise50@rambler.ru)

**Novinyuk Ludmila V.** – k.t., Senior Researcher, All-Russian Research Institute of Food Additives - Branch of Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Center of Food Systems named after V.M. Gorbachev" RAS, St. Petersburg, E-mail: [L.novinyuk@yandex.ru](mailto:L.novinyuk@yandex.ru)