

ИССЛЕДОВАНИЕ СОРБЦИОННОЙ ЕМКОСТИ КИСЛОТОРАСТВОРИМЫХ ХИТОЗАНОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К БЫЧЬЕМУ СЫВОРОТОЧНОМУ АЛЬБУМИНУ

В. А. Королева, М. Г. Холявка, С. М. Сазыкина, С. С. Ольшанникова, В. Г. Артюхов

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Аннотация. Исследована сорбционная емкость кислоторастворимых хитозанов по отношению к бычьему сывороточному альбумину. Установлено, что оптимальное время сорбции белка на среднемoleкулярном хитозане составляет 4 часа, на высокомолекулярном хитозане – 5 часов. Максимальная степень сорбции белка на матрице среднемoleкулярного хитозана равна 28.5 мг на 1 г сорбента, на матрице высокомолекулярного хитозана практически идентична и равна 28.6 мг/г.

Обсуждается вопрос о возможном механизме сорбции белковой макромолекулы на хитозане.

Ключевые слова: хитозан, сорбционная емкость, сорбция белков

Abstract. The sorption capacity of acid-soluble chitosan with respect to the bovine serum albumin was investigated. It is found that the optimal time for protein adsorption on medium weight chitosan is 4 hours, on the high molecular weight chitosan is 5 hours. The maximum degree of adsorption of protein on the matrix of middle molecular weight chitosan is 28.5 mg per 1 g of the sorbent, on the high molecular weight chitosan matrix is almost identical and equal to 28.6 mg/g.

The question of the possible mechanism of adsorption of protein macromolecules on chitosan are discussed.

Keywords: chitosan, adsorption capacity, adsorption of proteins

Одними из наиболее значимых в практическом отношении биополимеров являются полисахариды – высокомолекулярные соединения, построенные из элементарных звеньев – моносахаридов, соединенных между собой гликозидными связями. Этот класс биополимеров относится к числу наиболее распространенных в природе органических соединений. Бифункциональные свойства полисахаридов в значительной мере обусловлены особенностями их строения [1].

Хитозаны являются сополимерами 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкозамина и 2-ацетиламино-2-дезоксид-β-D-глюкозамина. Хитозаны получают путем деацетилирования хитина, поскольку хитин трудно деацетилировать полностью, хитозаны подразделяются на несколько типов, в со-

ответствии с молекулярной массой и степенью деацетилирования [2-5].

Молекулы хитозана содержат катионы, представленные аминогруппами, и анионы в виде гидроксильных групп, поэтому хитозаны могут сорбировать ферменты, полисахариды и ионы металлов. Интерес к хитозану связан с уникальными физиологическими и экологическими характеристиками: противогрибковыми, противоопухолевыми, иммуномодулирующими свойствами, а также биосовместимостью, биodeградируемостью. Он обладает способностью к образованию пленок, к селективному связыванию тяжелых металлов и органических соединений [6, 7].

Благодаря вышеперечисленным свойствам, хитозаны могут активно использоваться в медицине, пищевой промышленности и аграрной индустрии в форме комплексных препаратов с

© Королева В. А., Холявка М. Г., Сазыкина С. М., Ольшанникова С. С., Артюхов В. Г., 2015

иммобилизованными ферментами. Хитозаны как сорбенты являются носителями химически и геометрически неоднородного поля. В структуре солевой формы хитозана помимо солевых групп присутствуют остаточные ацилы, полуацетальные концевые гидроксилы, гидроксилы пиранозного кольца. Их химическая неоднородность увеличивается за счет примесей белков, минеральных кислот, значительного количества сорбированной воды. Высока неоднородность надмолекулярной структуры хитозанов: имеют место кристаллические и аморфные области, причем для сорбции доступна главным образом аморфная часть. Для модификации хитозанов с целью достижения лучших эксплуатационных свойств, уменьшения растворимости и увеличения механической прочности пленок из хитозана достаточно часто используют термообработку [8-10].

Исследование сорбционных свойств хитозанов актуально, т.к. эти полисахариды являются эффективными сорбентами неполярных соединений (белков, красителей, ПАВ) и ионов тяжелых металлов [8, 11].

Изучение свойств коллоидных систем, содержащих сложные органические соединения, представляет интерес как с теоретической, так и практической точек зрения. Отличительными особенностями таких систем являются специфический характер сорбции органических соединений, сложная структура межфазной границы раздела; это может быть вызвано сложным составом и строением молекул органических соединений. В их состав могут входить различные функциональные группы, которые оказывают влияние на механизм их сорбции. Этот процесс может происходить за счёт одновременной реализации различных типов взаимодействий (кулоновское, донорно-акцепторное, за счёт ван-дер-ваальсовых сил и др.). Нередко сорбция сложных органических молекул сопровождается изменением их конформации, реакциями поверхностного комплексообразования с активными центрами сорбентов. Специфический характер сорбции органических соединений влияет на изoeлектрическую точку, электрокинетический потенциал сорбентов, устойчивость и другие свойства указанных дисперсных систем. Механизм специфического взаимодействия сложных органических молекул с активными центрами поверхности определяет пространственное и энергетическое состояние адсорбированных молекул в поверхностном слое, а в последующем — их биологическую активность. Поведение сложных многокомпонент-

ных растворов в сорбционных системах представляет особый интерес, поскольку минеральные вещества в растворе могут выполнять различные функции, например, являться средосоздающим компонентом (кислоты и щелочи) и определять заряд аминокислоты, а, следовательно, и механизм поглощения, или выступать конкурентами за сорбционные места при ионном обмене и не-обменном поглощении смесей [12-16].

Цель работы: исследование сорбционной емкости кислоторастворимых хитозанов по отношению к белку, подбор оптимальных условий сорбции белков на матрицах кислоторастворимых среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования нами были выбраны два вида кислоторастворимого хитозана, синтезированных ЗАО «Биопрогресс»: высокомолекулярный хитозан ($M_r = 350 \text{ кДа}$, степень деацетилирования $СД = 94.85\%$) и среднемолекулярный хитозан ($M_r = 200 \text{ кДа}$, $СД = 82\%$). Сорбционную емкость хитозанов по белку изучали по отношению к бычьему сывороточному альбумину (БСА) фирмы «Sigma».

Сорбцию БСА на матрице хитозана осуществляли следующим образом: к 1 г хитозана добавляли 50 мл раствора БСА (в концентрации 1 мг/мл) в 0.1 М фосфатном буфере (рН 6.5), инкубировали с периодическим перемешиванием [17, 18]. Далее отбирали надосадочную жидкость через 5, 10, 30 и 90 минут, 2, 3, 4, 5, 24 и 48 часов. Определение количества белка осуществляли модифицированным методом Лоури [19]. Количество адсорбированного белка определяли как разность между исходной концентрацией БСА в растворе и его содержанием в надосадочной жидкости после осуществления процесса сорбции альбумина.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ содержания белка (в мг сорбата на г сорбента) в гетерогенном препарате (рис. 1) показал, что сорбция бычьего сывороточного альбумина на матрице кислоторастворимого среднемолекулярного хитозана происходит, начиная с 5 минут инкубации (13.3 мг БСА на 1 г хитозана). Максимум степени адсорбции белка наблюдается после 4 часов периодического перемешивания хитозана с раствором БСА и составляет 28.5 мг/г. После 24 часов инкубации сорбата и сорбента на-

чинает происходить частичная десорбция БСА с матрицы кислоторастворимого средномолекулярного хитозана.

Адсорбция белка на матрице кислоторастворимого высокомолекулярного хитозана (рис. 2) также происходит, начиная с 5 минут инкубации (14.3 мг БСА на 1 г хитозана), и достигает максимума после 5 часов контакта сорбата и сорбента (28.6 мг/г). Частичная десорбция альбумина происходит после суток инкубации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе наших исследований было выявлено, что оптимальное время сорбции белка на матрицах кислоторастворимых средномолекулярного и высокомолекулярного хитозанов составляет 4 и 5 часов соответственно. Максимальная сорбция БСА на матрице средномолекулярного хитозана составляет 28.5 мг сорбата на г сорбента, на матрице высокомолекулярного хитозана – 28.6 мг/г. Сорбционная емкость средномолекулярного и

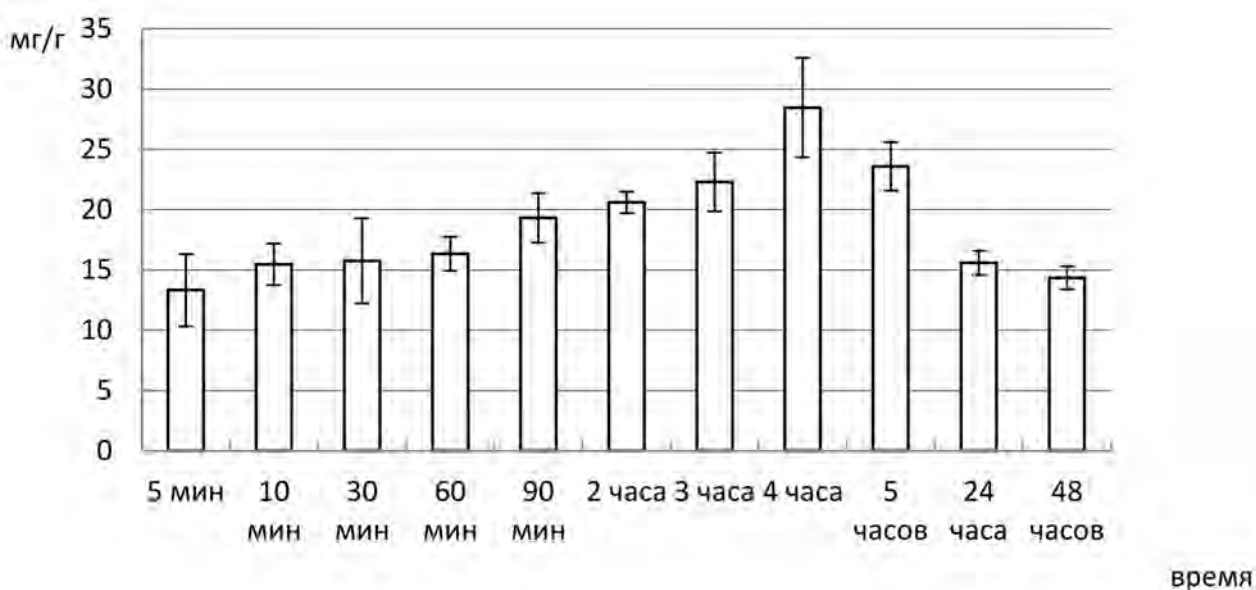


Рис. 1. Содержание БСА (в мг сорбата на г сорбента), сорбированного на матрице средномолекулярного хитозана

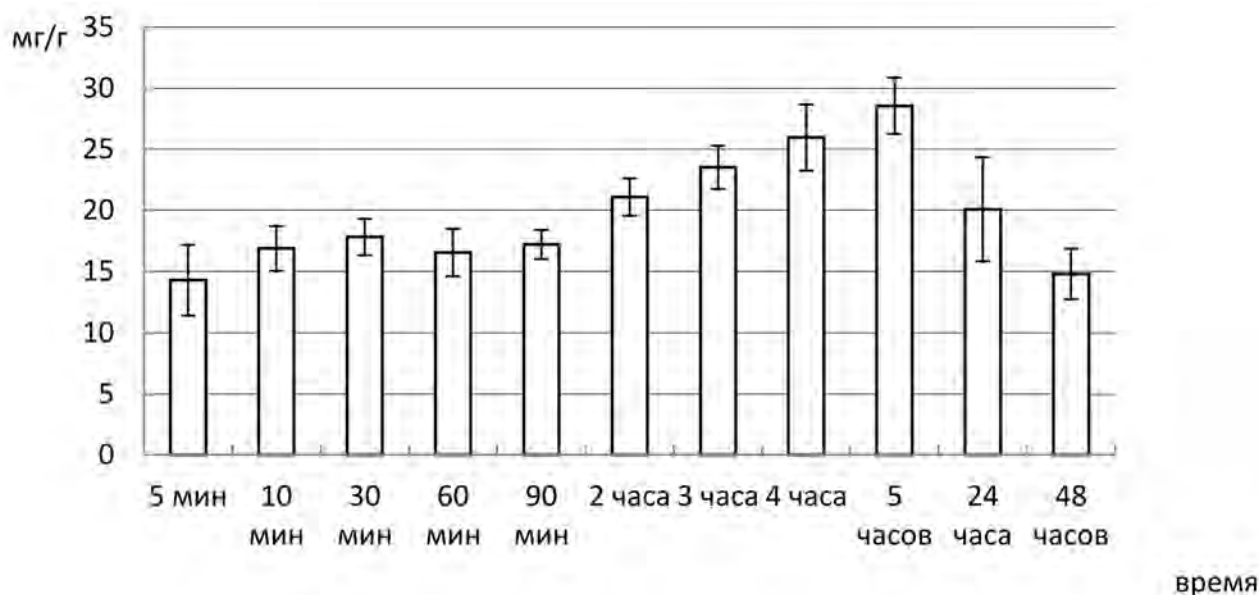


Рис. 2. Содержание БСА (в мг сорбата на г сорбента), сорбированного на матрице высокомолекулярного хитозана

высокомолекулярного хитозанов по отношению к альбумину практически идентичны, следовательно, в диапазоне молекулярных масс от 200 до 350 кДа хитозан проявляет одинаковые сорбционные свойства по отношению к данному белку.

Сорбционная способность хитозана обусловлена наличием в макромолекуле свободных аминогрупп, с помощью которых образуются надмолекулярные комплексы данного полисахарида с органическими соединениями [20]. Сорбция – важнейший этап таких сложных многостадийных процессов как катализ, растворение, набухание, поверхностные химические реакции, транспорт низкомолекулярных веществ через мембраны. Хитозаны могут быть использованы как материал для создания селективно-проницаемых мембран, и знания свойств хитозанов как сорбентов необходимы при решении задач мембранного разделения [9, 11]. При сорбции на хитозанах протекает многокомпонентный ионный обмен, что осложняет процесс сорбции и в зависимости от природы аминокислоты на поверхности белка может изменить получаемые результаты, поэтому исследование сорбционной емкости хитозанов по отношению к белку и в дальнейшем будет представлять теоретический и практический интерес [21].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тунакова Ю.А. Оценка сорбционной емкости биополимерных сорбентов на основе хитозана в отношении металлов / Ю.А. Тунакова, Е.С. Мухаметшина, Ю.А. Шмакова // Вестник Казанского технологического университета — 2011. — № 10. — С. 96–100.
2. Shen-Kun Liao. A Kinetic Study of Thermal Degradations of Chitosan/Polycaprolactam Blends / Chi-Chih Hung, Shen-Kun Liao, Ming-Fung Lin // Macromolecular Research. — 2004. — Vol. 12, No. 5. — P. 466–473.
3. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение. / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. – М.: Наука, 2002. – 364 с.
4. Сливкин А.И. Разработка биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на хитозане / А.И. Сливкин [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2013. — Т.13, № 1. — С. 53–59.
5. Ковалева Т.А. Иммобилизация гидролитических ферментов на анионитах / Т.А. Ковалева [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы — 2008. — Т.8, Вып.6 — С. 1035–1041.
6. Зизевских О.В. Сорбция низкомолекулярного хитозана катионообменными мембранами / О.В. Зизевских // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2007. — Т.7, Вып.3. — С. 373–380.
7. Сливкин Д.А. Хитозан для фармации и медицины / Д.А. Сливкин [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. — 2011. — № 2. — С. 214–232.
8. Термомодификация хитозановых пленок в форме солей с различными кислотами / М.А. Зоткин, Г.А. Вихорева, А.С. Кечекьян // Высокомолекулярные соединения. — 2004. — Сер. Б, Т.46, №2. — С.359.
9. Котельникова Т.А. Сорбционные свойства некоторых полимерных материалов по данным нелинейной газовой хроматографии/ Т.А. Котельникова, Е.П. Агеев // Высокомолекулярные соединения. — 2002. — Сер. А, Т.44, №8. — С.1433–1443.
10. Котельникова Т.А. Влияние термообработки на сорбционные свойства хитозанов по данным обращенной газовой хроматографии / Т.А. Котельникова // Сорбционные и хроматографические процессы — 2008. — Т.8, Вып.1 — С. 50–59.
11. Агеев Е.П. Структура и транспортные свойства хитозановых пленок, модифицированных термообработкой / Е.П. Агеев [и др.] // Высокомолекулярные соединения. — 2004. — Сер. А, Т.46, №12. — С. 2035–2041.
12. Чухно А.С. Изoeлектрическая точка белков в водных растворах азолов / А.С. Чухно, И.Б. Дмитриева, Д.В. Мартынов // Вестник Санкт-Петербургского университета. — 2011. — Сер. 4, №2. — С.124–133.
13. Демин А.А. Ионнообменная сорбция биологически активных веществ / А.А. Демин, И.А. Чернова, Л.К. Шатаева. — СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, — 2008. — 154 с.
14. Хохлова О.Н. Влияние хлорида натрия на необменную сорбцию фенилаланина и тирозина низкоосновным анионообменником АН-221 / О.Н. Хохлова, Е.В. Немчинова, Т.Н. Нефедова // Краткие сообщения. Сорбционные и хроматографические процессы. — 2010. — Т.10, Вып.5. — С. 753–759.
15. Хохлова О.Н. Некоторые особенности необменной сорбции ароматических аминокислот низкоосновными анионообменниками в динамических условиях. I. Влияние условий проведения сорбции / О.Н. Хохлова // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2012. — Вып. 2. — С. 223–230.

16. Холявка М.Г. Иммобилизация гидролаз как один из путей регулирования и стабилизации их активности / М.Г. Холявка [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. — 2013. — Т. 11, №7. — С. 29–35.

17. Логинова О.О. Разработка методики получения гетерогенного биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана. / О.О. Логинова, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов, А.С. Беленова // Фундаментальные исследования. — 2013. — № 11-3. — С. 484–487.

18. Логинова О.О. Физико-химические и кинетические свойства гетерогенного биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана / О.О. Логинова, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов // Биофармацевтический журнал. — 2015 — Т.7, №2. — С. 13–16.

19. Логинова О.О. Подбор методики количественного определения трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана, и его каталитической активности / О.О. Логинова, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов, А.С. Беленова // Вестник Воронежского государственного университета. — 2013. — №2. — С. 116–119.

20. Марьин А.П. Высокомолекулярные соединения / А.П. Марьин, Е.П. Феофилова. — М.: Наука, 1982. — Сер. Б, Т. 24, № 9. — С. 658–662.

21. Хохлова О.Н. Термодинамическое описание сорбции тирозина анионообменником АВ-17-2П в форме триптофана / О.Н. Хохлова, В.Ю. Хохлов // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2008. — Т.8, Вып.3. — С.525–529.

*Воронежский государственный университет
Королева В. А., аспирант
E-mail: koroleva_victoria@bk.ru
Тел.: +7(473)2208586*

*Voronezh State University
Koroleva V. A., Post graduate student
E-mail: koroleva_victoria@bk.ru
Ph.: +7(473)2208586*

*Холявка М. Г., к.б.н., старший научный сотрудник
E-mail: holyavka@rambler.ru
Тел.: +7(473)2208586*

*Holyavka M. G., PhD (Biology), Senior researcher
E-mail: holyavka@rambler.ru
Ph.: +7(473)2208586*

*Сазыкина С. М., студентка
E-mail: sazykina.93@mail.ru
Тел.: +7(473)2208586*

*Sazykina S. M., Student
E-mail: sazykina.93@mail.ru
Ph.: +7(473)2208586*

Ольшанникова С. С., студентка

Olshannikova S. S., Student

*Артюхов В. Г., доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru
Тел.: +7(473)2208981*

*Artyukhov V. G., PhD (Biology), D.Sci., Full Professor, Manager of biophysics and biotechnology department
Phone: +7(473)2208981
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*