

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ХИТОЗАН-МЕЛАНИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

А.В. Бакулин ¹, В.П. Курченко ², Н.В. Сушинская ², И.И. Азарко ², В.П. Варламов ¹

¹Центр «Биоинженерия» РАН, г. Москва;

²Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

В настоящее время хитин и хитозан привлекают внимание широкого круга исследователей благодаря ряду уникальных физико-химических и биологических свойств, а также неограниченной воспроизводимой сырьевой базой. Источники хитина разнообразны и широко представлены в природе. Хитин встречается в наружном покрове членистоногих: ракообразных, насекомых; клеточной стенке грибов и дрожжей. Хитин представляет собой гомополисахарид, состоящий из поли-N-ацетил-D-глюкозоамина. В результате реакции деацетилирования получают хитозан, основным мономером которого является 2-амино-2-дезоксиглюкопираноза. Уникальная структура молекулы (рисунок 1) обуславливает ряд полезных свойств хитозана: антиоксидантные, радиопротекторные, иммуномодулирующие, противоопухолевые, волокно-, пленкообразующие и др. Следует также отметить его низкую токсичность и способность к биodeградации.

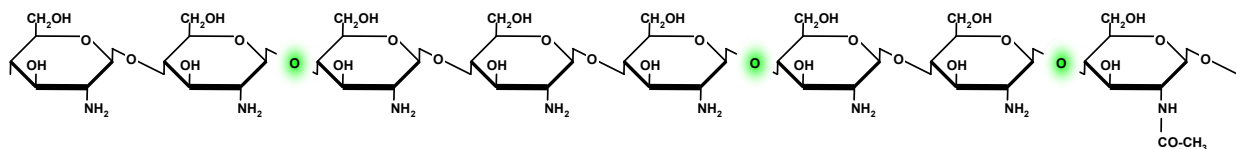


Рисунок 1 – Структурная формула хитозана

Наличие реакционноспособных функциональных групп обеспечивает получение разнообразных химически модифицированных производных хитозана: сульфатированных, карбоксилированных, фторсодержащих и др. Такая химическая модификация хитозана дала возможность получить его производные, которые нашли широкое применение в медицине, биотехнологии, сельском хозяйстве и других отраслях [1].

Как правило, в организмах членистоногих, базидиальных грибов хитин находится в комплексе с другими биополимерами: белками, гликанами и меланинами.

Меланины представляют собой высокомолекулярные полимеры нерегулярной структуры, относящиеся к классу конденсированных фенольных соединений. Они обуславливают темную окраску насекомых, волос человека, клеточной стенки грибов и микроорганизмов. Характерной особенностью меланиновых пигментов является наличие высокостабильных парамагнитных центров, разнообразных функциональных групп, а также системы сопряженных двойных связей в их молекулах. Эти особенности меланинов определяют их фото-, радиопротекторные и антиоксидантные свойства [2,3,4].

Благодаря наличию реакционноспособных функциональных групп у меланинов и хитозана возможно образование комплексов, которые будут обладать широким спектром биологической активности. Такие композиты откроют новые возможности их использования в медицине и пищевой промышленности, сельском хозяйстве и биотехнологии, а также для защиты окружающей среды.

Целью работы явилось получение комплексов хитозана с некоторыми меланинами и изучение их физико-химических характеристик.

Методы исследования

В работе использовался низкомолекулярный хитозан, полученный ферментативным гидролизом хитозана Mv 200 кДа (ЗАО «Биопрогресс») с использованием ферментного препарата Фитопаин [5]. Хитозан имел следующие

характеристики: молекулярную массу 21 кДа; $M_w=29,6$ кДа; $M_n=8,8$ кДа; $I_p=3,4$ и степень дезацетилирования 86%. Анализ полученного хитозана проводили с помощью метода ВЖХ на колонке UHG 500 (7,8X x 300 мм), скорость 0,5мл/мин и подвижной фазой 0,05M уксусная кислота с 0,15M ацетатом аммония, pH 5,1

При создании комплексов были использованы образцы меланинов, выделенные из трутовых грибов: из трутовика плоского (*Ganoderma applanatum*), трутовика настоящего (*Fomes fomentarius*), трутовика дубового ложного (*Phellinus robustus*) и винограда (*Vitis vinifera*). В таблице 1 приведены физико-химические характеристики используемых меланинов.

Меланины были получены экстракцией из обезжиренного сырья 0,1н NaOH при 45 – 50 °С в течение 2 ч с последующим трехкратным переосаждением 1н HCl до pH 1,5, диализом против воды до нейтрального pH и сушкой на лиофильной установке “Нето-Нолтен” (Дания) [6].

Исследования электронного парамагнетизма осуществляли на спектрометре “Varian E-112” (США). Измерение парамагнитных характеристик меланинов и соединений с хитозаном проводили в сухих лиофильно высушенных препаратах. Содержание парамагнитных центров (ПМЦ) определяли методом сравнения с аттестованным образцом угольного порошка с известным содержанием центров. Для расчета g-факторов использовали в качестве эталона Mn^{2+} в порошке MgO [7].

Термогравиметрический анализ проводили на “ТА – 4000 Mettler Toledo” (Швейцария), снабженном модулем ТГ–50. Измерения выполняли в интервале температур 25 – 600 °С в атмосфере воздуха при скорости нагрева 5 °С/мин. Энергию активации определяли по уравнению Бройдо [8]:

$$\ln\left(\ln \frac{100}{100 - \Delta m}\right) = - \frac{E_{\text{акт}}}{R} \times \frac{1}{T} + \text{const}$$

где, Δm -потеря массы (в %) образца при каждой из температур внутри интервала разложения вещества. В нашем случае потеря массы образца является процессом первого порядка и $\ln\left(\ln \frac{100}{100 - \Delta m}\right)$ от $1/T$ представляет собой прямую с наклоном E_A . Расчет E_A производили в максимумах кривых ДТГ.

Для получения комплексов готовили 1,0 % раствора хитозана с молекулярной массой 21кДа и 1,0 % растворы меланинов в 0,1М ацетатном буфере pH 6,0. Реакцию комплексообразования запускали добавлением к 1,0 % раствору хитозана расчетного количества раствора исследуемого меланина. Реакционную смесь инкубировали в течение часа при комнатной температуре и центрифугировали 15 минут при 12,5 тыс об/мин для отделения хитозан-меланинового комплекса. Полученные осадки лиофильно высушивались.

Механические смеси хитозана и меланинов были получены методом совместного перетирания в ступке лиофильно высушенных образцов полимеров в определенном соотношении.

Результаты и обсуждение

Благодаря наличию положительно заряженных аминогрупп, хитозан эффективно взаимодействует с меланинами, представляющими собой полииониты. Образующийся комплекс хитозана с меланинами нерастворим в буфере и выпадает в осадок. Полноту включения меланина в комплекс с хитозаном оценивали по количеству пигмента, оставшегося в растворе, которое определяли по оптической плотности супернатанта при λ 465 нм. Для изучения физико-химических свойств композитов были получены комплексы с различным соотношением хитозана и меланинов. Для их получения растворы хитозана и меланина смешивали в различных соотношениях 10:1; 2:1 и 1:1. Свидетельством комплексообразования меланина с хитозаном является образование осадка,

нерастворимого не только в воде, но и в водных растворах щелочей, минеральных и органических кислотах, а также в органических растворителях. Полученные комплексы были охарактеризованы с использованием методов электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и термогравиметрического анализа.

Отличительной особенностью меланинов, определяющей их основную защитную функцию в организме является высокое содержание неспаренных электронов. Большая электронно-абсорбционная емкость позволяет меланинам дезактивировать природные радикалы, образующиеся в ряде физических и химических процессов.

Качественные реакции показали, что водные растворы пигментов из трутовых грибов и винограда обесцвечивались H_2O_2 , а в присутствии $KMnO_4$ изменяли окраску с коричневой на зеленую с последующим выпадением осадка. Добавление $FeCl_3$ приводило к выпадению осадка, который растворялся в присутствии избытка $FeCl_3$. Такое поведение исследуемых пигментов характерно для меланинов и свидетельствует о присутствии в их структуре хиноидных и фенольных компонентов.

Анализ полученных данных позволяет отнести изучаемые биополимеры из трутовых грибов к классу алломеланинов, а меланин из винограда - к эумеланинам.

В таблице 1 приведены основные физико-химические характеристики изученных меланинов.

Таблица 1 – Физико-химические свойства меланинов из трутовых грибов и винограда

Источник меланина	Элементный состав, %					$\varepsilon^{0,001\%}, l=1\text{см}$				[ПМЦ] $\times 10^{17}$ спин/г
	С	Н	N	О	Н/С	УФС 240н м	УФВ 285 нм	УФА 360нм	465н м	
Трутовик плоский <i>Ganoderma applanatum</i>	46,3	6,4	6,0	30,8	0,14	0,13	0,1	0,03	0,013	6,59
Трутовик настоящий <i>Fomes fomentarius</i>	47,4	6,2	5,7	34,9	0,13	0,16	0,12	0,06	0,023	11,9
Трутовик дубовый ложный <i>Phellinus robustus</i>	38,5	4,7	3,2	38,7	0,12	0,21	0,17	0,09	0,026	4,57
Виноград <i>Vitis vinifera</i>	47,9	6,2	7,09	32,1	0,13	0,20	0,15	0,07	0,028	2,01

В ходе исследований с помощью метода ЭПР установлено, что все полученные хитозан-меланиновые комплексы и использованные для их получения меланины характеризуются интенсивным парамагнитным поглощением с g-фактором равным $2,0035 \pm 0,0003$ (рисунок 2), что позволяет предположить единую природу парамагнитных центров. Форма спектров средняя между лоренцевой и гауссовой характерна для меланинов []. Ширина сигнала составила $\Delta H = 6,0-7,0$ Гс.

Содержание парамагнитных центров исследованных меланинов и хитозан-меланиновых комплексов варьировало в пределах от $1,6 \times 10^{17}$ до $1,4 \times 10^{18}$ спин/г.

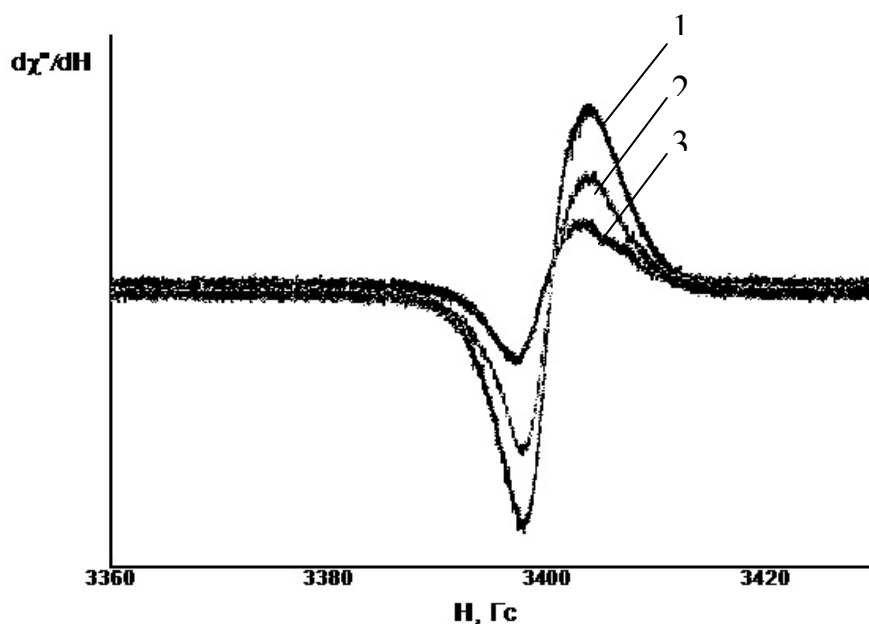


Рисунок 2 - Характерные спектры ЭПР меланиновых пигментов (1) и комплексов хитозан:меланин в соотношении 2:1 (2) и 10:1 (3).

В работе была изучена динамика взаимодействия СВЧ поля со спиновой системой меланинов и их комплексов с хитозаном посредством изменения частоты модуляции магнитного поля от 35 Гц до 100 кГц, а также мощности излучения (рисунок 3). По кривым насыщения сигналов ЭПР образцов меланинового пигмента, снятых при комнатной температуре измерения и $f_m = 25$ кГц были определены времена спин-решеточной релаксации и обменного взаимодействия. Ход кривых зависимости интенсивности сигнала ЭПР соединений меланина и хитозана от мощности СВЧ-излучения не меняется от процентного содержания последнего.

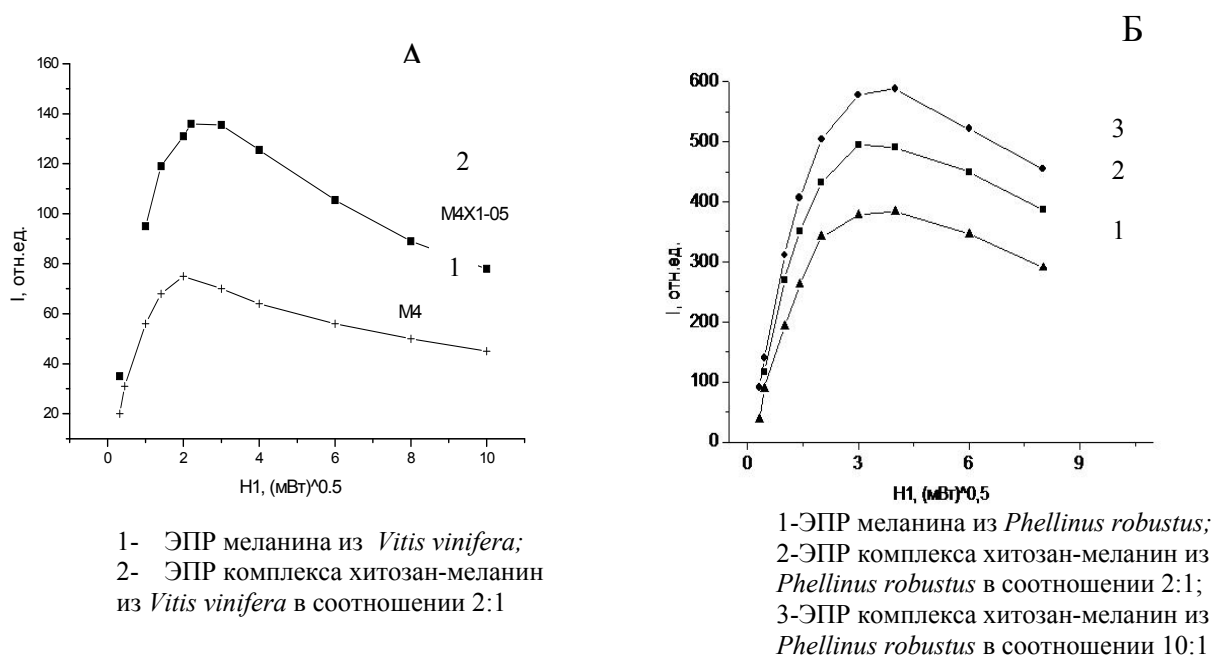
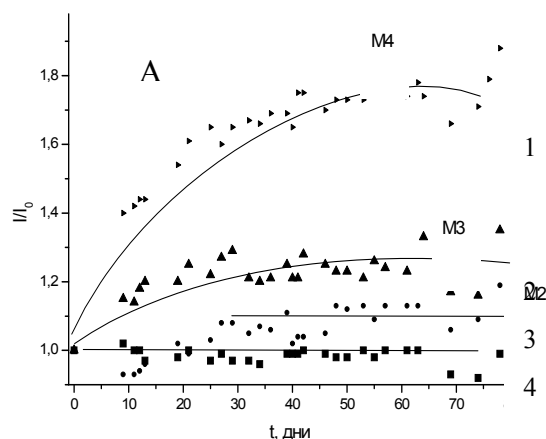


Рисунок 3 - Зависимости интенсивности ЭПР-сигнала от мощности СВЧ излучения образцов меланинов из винограда и его комплекса с хитозаном (А) и из трутовика дубового ложного и его комплекса с хитозаном (Б).

Также исследовалось поведение парамагнитной системы всех полученных комплексов и меланинов в течение 80 суток. Регистрация спектров через определенные промежутки времени выявила различную интенсивность сигнала ЭПР образцов во времени. Полученные результаты позволили разделить меланины и их комплексы на две группы.

К первой группе относятся исходные меланины полученные из трутовых грибов *Fomes fomentarius* (трутовик настоящий) и *Ganoderma applanatum* (трутовик плоский). Их отличительная особенность – практически неизменность величины интенсивности сигнала (рисунок 4 А).



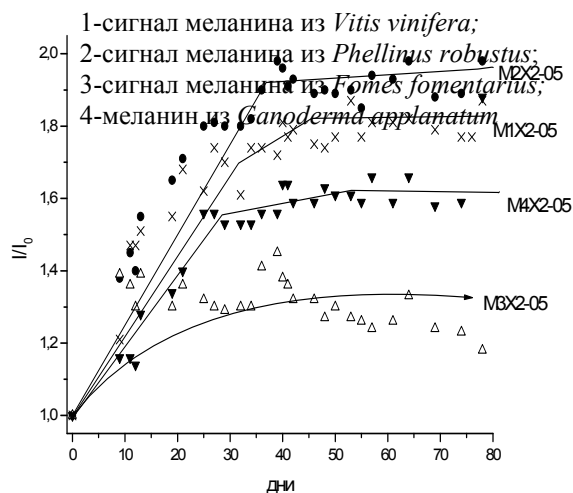
Б

3

4

1

2



- 1- сигнал комплекса хитозан-меланин из *Vitis vinifera* в соотношении 2:1;
- 2- сигнал комплекса хитозан-меланин из *Phellinus robustus* в соотношении 2:1;
- 3-сигнал комплекса хитозан-меланин из *Fomes fomentarius* в соотношении 2:1;
- 4- сигнал комплекса хитозан-меланин из *Ganoderma applanatum* в соотношении 2:1

Рисунок 4 - Зависимость интенсивности ЭПР-сигнала исходных меланинов (А) и комплексов хитозан-меланин (Б) от времени.

Ко второй группе относятся комплексы хитозана и меланина в соотношении 2:1. Они характеризуются интенсивным ростом парамагнитного поглощения с течением времени на протяжении 40 дней. Интенсивность ЭПР-сигналов вышеуказанных образцов, (рисунок 4 Б) практически линейно увеличивается до 2 раз и далее выходит на насыщение. При этом ширина линии и зависимости от мощности СВЧ излучения не изменяются.

Помимо хитозан-меланиновых комплексов с помощью метода ЭПР были проанализированы механические смеси. Процентное соотношение компонентов в смесях было такое же, что и при создании комплексов. Из рисунка 5 видно, что количество парамагнитных центров в комплексах существенно превышает их количество в механических смесях. Это говорит о том, что при образовании комплексов хитозан-меланин происходят структурные изменения, приводящие к увеличению количества стабильных свободных радикалов.

Таким образом, проведенные исследования комплексов хитозана с меланином выявили существенное увеличение количества парамагнитных центров во времени, что свидетельствует о структурных изменениях в них.

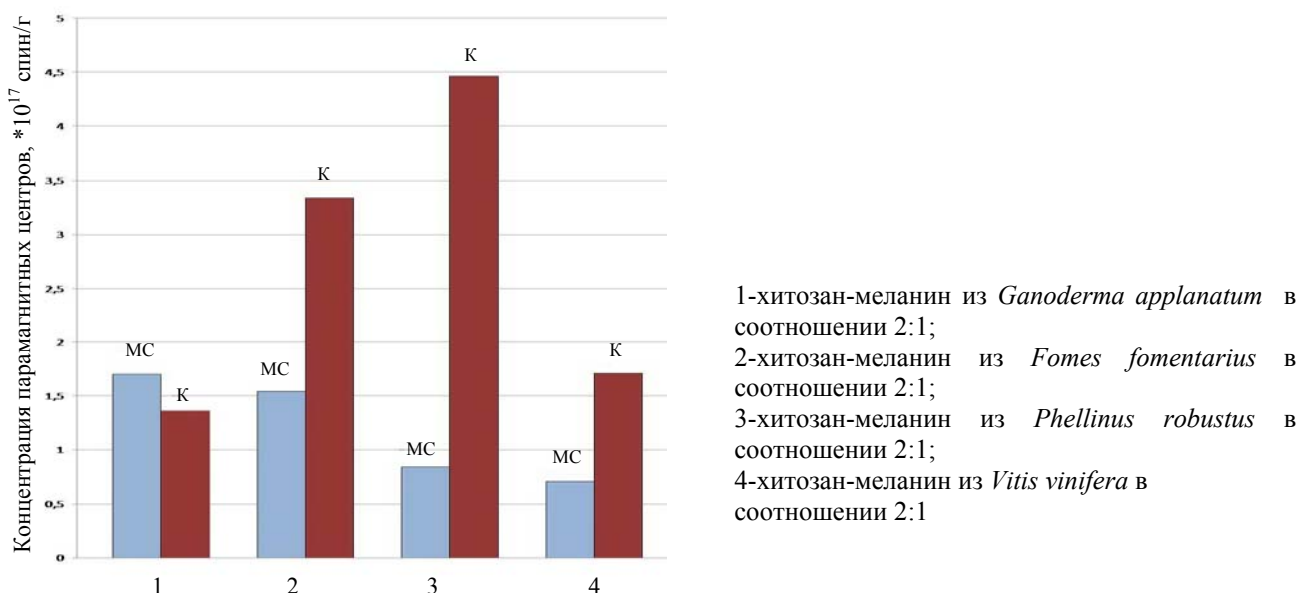


Рисунок 5 - Концентрация парамагнитных центров в комплексах хитозан-меланин и в механических смесях, где MC - механическая смесь, K - комплекс.

Подтверждением структурных изменений в молекулах хитозана и меланина при их комплексообразовании служат проведенные термогравиметрические исследования.

Термоокислительная деструкция полимеров представляет сложный физико-химический процесс, включающий химические реакции деструкции, карбонизации полимера в конденсированной фазе, химические реакции превращения и окисления газовых продуктов и физические процессы интенсивных тепло- и массопередачи. Ход пиролитического процесса и состав образующихся продуктов индивидуален для каждого полимера.

Термостойкость и природа реакций, протекающих при разложении полимера, определяется соответствующими свойствами мономеров. В связи с этим, применение термической деструкции дает информацию о строении полимера. Разложение изучаемых образцов меланинов, хитозанов и их комплексов начиналось с потери связанной воды, при этом наблюдался процесс с уменьшением массы температурном интервале 25-100°C.

Особенности термического разложения меланинов позволили дифференцировать их в соответствии со структурными особенностями на две группы: меланины, выделенные из трутовых грибов и меланина из винограда.

Термическая деструкция меланинов из трутовых грибов проходит в два основных этапа. В интервале температур от 200-350°C потеря веса образцов меланина составляет от 40 до 42% с энергией активации от 68 до 89 кДж/моль. На 31- 36 % потеря веса наблюдается в температурном интервале от 350 до 480°C с энергией активации от 33 до 53 кДж/моль (таблица 2). Такое сходство параметров термоокислительной деструкции свидетельствует о близкой природе исследуемых меланиновых пигментов. Однако следует отметить, что для меланина из винограда характерно меньшее количество зольных элементов, не разлагающихся при температуре 600°C. При термическом разложении хитозана основная потеря веса происходит в один этап в интервале температур от 200 до 270°C с энергией активации 109 кДж/моль.

При термической деструкции хитозан-меланиновых комплексов с минимальным содержанием меланина (10:1) характер дифференциальных кривых сходен с дифференциальной кривой хитозана.

Таблица 2 – Основные характеристики термического разложения меланинов из трутовых грибов, винограда и хитозана

Вещество	Температурный Интервал Разложения, °C	Потеря веса, %	E _a кДж/моль	Остаток % (зола)
Меланин из трутовика плоского <i>Ganoderma applanatum</i>	200-350	42,201	79	12,309
	350-480	33,367	44	
Меланин из трутовика настоящего <i>Fomes fomentarius</i>	200-350	41,929	77	10,441
	350-480	34,578	44	
Меланин из трутовика дубового ложного <i>Phellinus robustus</i>	200-350	40,542	68	9,663
	350-480	36,168	33	
Меланин из винограда <i>Vitis vinifera</i>	200-350	40,479	89	3,854
	350-480	30,993	53	
Хитозан ММ 21 кДа, СД 86%	200-270	34,474	109	13,167

Вероятно, это происходит из-за большого количества хитозана, не вступившего во взаимодействие с меланином. Причем при увеличении количества меланина в комплексе наблюдалось сужение или уширение температурных интервалов потери массы, появление дополнительных этапов разложения (рисунок 6).

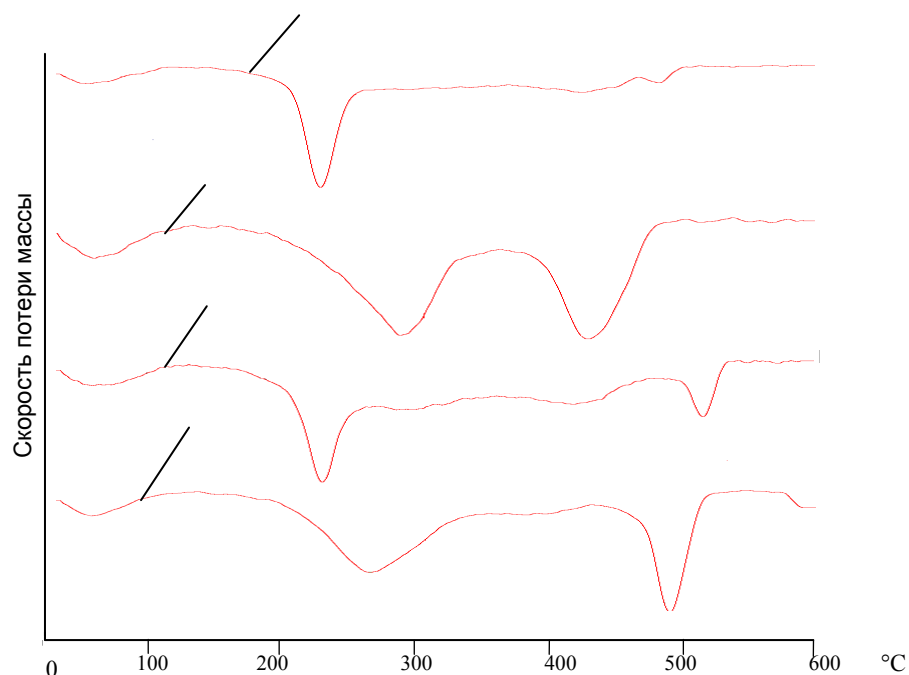


Рисунок 6 - Дифференциальные термогравиметрические кривые хитозана (1), меланина (2), комплекса хитозан-меланин из винограда 2:1 (3) и механической смеси хитозан-меланин из винограда 2:1 (4)

Следует также отметить, что в зависимости от соотношения хитозан-меланин, энергетика процессов разрушения структурных компонентов комплексов была различна.

При сравнении термограмм разложения комплексов хитозан-меланин с аналогичными механическими смесями обнаружен ряд существенных отличий, связанный с появлением дополнительных этапов деструкции и изменением энергетики процессов разрушения вещества.

Выводы

В результате проведенных исследований установлено, что при взаимодействии двух биополимеров: хитозана и меланина происходит комплексообразование. В отличие от исходных полимеров полученные комплексы нерастворимы в водных и органических растворителях. Для них характерно повышение концентрации парамагнитных центров, количество которых увеличивается в течение 40 дней и повышенная термостабильность. Полученные результаты могут быть использованы для решения ряда практически важных задач. Так меланины в растворе эффективно связывают ионы тяжелых металлов и радионуклеиды, образуя их хелатные комплексы [9]. Феномен комплексообразования меланинов с хитозаном дает возможность осуществлять эффективное удаление из растворов меланины, хелатировавшие металлы переменной валентности. Такая технология может быть использована для очистки технологических вод на атомных электростанциях.

Авторы выражают благодарность с.н.с. лаборатории Инженерии ферментов Центра «Биоинженерия» РАН Лопатина С.А. за техническую помощь при анализе образцов хитозана методом ВЖХ, а также Шостак Л.М. БГТУ за техническую помощь в проведении термогравиметрического анализа.

Список литературы

1. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова.-М.: Наука, 2002. 368с.
2. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. М.: Мир, 1986. С. 259-279.
3. Новиков Д.А., Курченко В.П., Азарко И.И.//Радиационная биология. Радиозэкология. 2001, Т. 41, №6, с. 664-670.

4. Бабицкая В.Г., Щерба В.В, Иконникова Н.В.// Прикладная биохимия и микробиология. 2000, Т. 36, № 4, с 439-444.
5. Бакулин А.В., Львова А.А., Албулов А.И., Тран Дин Тоай // Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана: Мат. Девятой междунар. Конф.- М.: ВНИРО. 2008. С. 241-243.
6. Сушинская Н.В., Курченко В.П.//Труды Белорусского государственного университета, 2006, Вып.1, с. 147-158.
7. Керрингтон А., Маклечлан Э. Магнитный резонанс и его применение в химии. М.: Мир, 1970.
8. Broido A. // J. Polym. Sci. Part A-2: Polym. Phys. 1969. Vol. 7. P. 1762.
9. Сушинская Н.В., Кукулянская Т.А., Гавриленко Н.В., Курченко В.П., Горовой Л.Ф., Сенюк О.Ф.// Успехи современной микологии: материалы II Всероссийского конгресса по медицинской микологии – Москва, 2004, т.3, с.192 -194