

Лещинская Анастасия Петровна - младший научный сотрудник лаборатории полимерных наносистем и биотехнологических продуктов, Институт высокомолекулярных соединений Российской Академии Наук, Санкт-Петербург

Писарев Олег Александрович - зав. лаб. полимерных наносистем и биотехнологических продуктов, Институт высокомолекулярных соединений Российской Академии Наук, Санкт-Петербург

Панарин Евгений Фёдорович - директор института, зав. лаборатории биологически активных полимеров, Институт высокомолекулярных соединений Российской Академии Наук, Санкт-Петербург

Groshikova Anna R. - research worker, Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences

Pisarev Oleg A. - laboratory chief, Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences

Panarin Eugenie F. - institute director, Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences



УДК 541.(64+183.12)

Взаимодействие бычьего сывороточного альбумина с катионными растворимыми полиэлектролитами

Плотникова П.В.¹, Власова О.Л.¹, Грошикова А.Р.²,
Писарев О.А.², Е.Ф.Панарин²

¹ Санкт-Петербургский Государственный Политехнический Университет, Санкт-Петербург

² Учреждение Российской Академии наук Институт Высокомолекулярных Соединений РАН

Поступила в редакцию 8.09.2010 г.

Аннотация

Для изучения размеров и кинетики образования дисперсных частиц в растворах, содержащих бычий сывороточный альбумин и синтетические катионные растворимые полимеры, применена комплексная on-line методика, основанная на совместном применении методов интегрального (спектротурбидиметрия) и дифференциального (нефелориметрия) светорассеяния. Оценено влияние pH среды, молекулярной массы и структурной организации полимеров на размер флокул и кинетику флокуляции.

Ключевые слова: примесные белки, дисперсные частицы, катионные полимеры.

For studying of disperse particles sizes and kinetics formations in the solutions containing bovine serum albumin and the soluble synthetic cationic polymers, the complex on-line technique based on joint application of methods integral (spectroturbidimetry) and differential (nephelometry) light scattering is applied. The influence of medium pH, molecular weight and the structural organization of polymers on the size of flocculus and kinetics of flocculation is estimated.

Keywords: proteins impurities, disperse particles, cationic polymers

Введение

Нативные растворы целевых биологически активных веществ (БАВ), получаемые после отделения мицелия от культуральной жидкости представляют собой сложные системы, включающие примесные растворенные органические и неорганические вещества, коллоидные частицы и взвеси. В связи с этим получение целевых продуктов микробиологического синтеза связано с необходимостью концентрирования и очистки нативных растворов. Используемые для этих целей методы экстракции большими объемами органических растворителей (ацетон, хлористый метилен, бутилацетат) экологически небезопасны, а также приводят к значительным потерям целевых продуктов [1].

В последнее время, процессы регулирования устойчивости биологических жидкостей осуществляются с применением водорастворимых полимеров различной структуры, очень малые добавки которых радикально изменяют её стабильность. Для решения такой задачи чаще всего используется метод флокуляции [2]. Развитие эффективных способов применения флокуляции в биотехнологии требует разработки методов синтеза и изучения свойств новых растворимых полимеров, а также исследования молекулярных механизмов их взаимодействия с БАВ.

Цель данной работы состояла в изучении влияния молекулярной массы и структурной организации новых катионных растворимых полиэлектролитов на основе метилсульфата поли - N, N, N, N – триметилметакрилоилоксиэтиламмония (СМС) на размер флокул и кинетику флокуляции бычьего сывороточного альбумина (БСА, ММ – 65000 Да, рI = 4,8). Катионные полиэлектролиты синтезированы в ИВС РАН (табл.1). БСА использовался в качестве модели примесных белков, содержащихся в нативных растворах целевых БАВ. Это связано с тем, что большинство примесных белков, содержащиеся в нативных растворах противоопухолевых и антибактериальных антибиотиков, обладают молекулярными массами ≥ 25000 Да и изоэлектрическими точками ≤ 5.5 [3]. Комплексная on-line методика, основанная на совместном применении методов интегрального (спектрофлуориметрия) и дифференциального (нефелориметрия) светорассеяния описана в [4].

Обсуждение результатов

Экспериментальные данные по изучению флокуляции БСА катионными полиэлектролитами при рН=3,56 (в условиях, когда подавлена ионизация карбоксильных групп белка и молекула БСА несет положительный заряд) показали, что для всех исследованных полимеров эффективные размеры частиц дисперсной системы оставались постоянными и составляли ~310 нм. Образование флокул не наблюдалось [4]. Следовательно, ион - ионное отталкивание положительно заряженных аминокислотных групп полиэлектролитов и положительно заряженного БСА приводило к невозможности образования и роста размеров дисперсных частиц.

Этот вывод подтверждают данные, полученные при рН=6,9, когда возрастала степень диссоциации карбоксильных групп молекул БСА и белок становился отрицательно заряженным, в то время как аминокислотные группы полиэлектролитов сохраняли положительный заряд (рис.1).

При этом значении рН линейные образцы СМС с молекулярной массой 25,5 млн. Да вызывали флокуляцию дисперсных частиц уже при концентрациях - 2,5 мг/л и 5 мг/л (рис. 2а). Для достижения аналогичного эффекта с использованием образцов

более низкой молекулярной массы необходимы концентрации – 5 мг/л и 6 мг/л (рис. 2б), при этом для более высокомолекулярного образца характерна более быстрая кинетика образования флокул. Максимальный размер флокул в обоих случаях находился в интервале значений ~240 - 250 нм. Это позволяет сделать вывод о том, что молекулярная масса линейного полиэлектролита не влияла на размер образовавшихся дисперсных частиц.

Разветвленный полимер СМС с молекулярной массой 14,0 млн. вызывал агрегирование частиц начиная с концентрации 2,5 мг/л, при этом эффективный диаметр флокул достигал ~490 - 600 нм, а область дестабилизации раствора составляла ~ 40 - 200 мин. (рис. 2в). Увеличение концентрации полимера до 5 мг/л и 6 мг/л способствовало улучшению кинетики флокуляции.

Таблица 1. Характеристики катионных полимеров

| № образца | Наименование полимерного звена (тип полимера) | Молекулярная масса полимера, млн. Да | Катионный заряд, мг – экв/г |
|-----------|---|--------------------------------------|-----------------------------|
| 1 | Гомополимер метилсульфатной соли N, N, N, N – триметилметакрилоил-оксиэтиламмония (СМС,линейный) | 25.5 | 3.5 |
| 2 | Гомополимер метилсульфатной соли N, N, N, N – триметилметакрилоил-оксиэтиламмония (СМС, линейный) | 3.1 | 3.5 |
| 3 | Гомополимер метилсульфатной соли N, N, N, N – триметилметакрилоил-оксиэтиламмония (СМС,разветвленный) | 14.0 | 3.5 |

Следует отметить, что начальный эффективный диаметр дисперсных мицелл БСА при рН=6.9 уменьшался и составлял ~147 нм. Это вероятно, связано с тем, что при $8.0 > \text{pH} > 4.3$ субъединицы молекулы БСА находятся в N – форме и представляют компактную структуру за счет гидрофобных взаимодействий, солевых мостиков и водородных связей. Однако, при $\text{pH} < 4,3$ и $\text{pH} > 8,0$ N – форма альбумина подвергается конформационной перестройке (в кислой области - N – F1 конформационный переход; в щелочной области - N – В конформационный переход), из-за чего в этих диапазонах рН наблюдалось увеличение эффективного диаметра дисперсных частиц за счет нарушения взаимодействий между их субъединицами [7].

Таким образом, чем выше молекулярная масса линейного катионного полиэлектролита, тем меньшая концентрация этого полимера необходима для осуществления процесса флокуляции. По всей видимости, чем выше молекулярная масса катионного полимера, тем выше вероятность контакта периферических звеньев адсорбированной макромолекулы с соседними дисперсными частицами.

Вместе с тем, структурная организация полиэлектролитов определяет размер образовавшихся дисперсных частиц и кинетику процесса флокуляции. Линейная макромолекула может одновременно присоединиться к двум частицам, связывая их через полимерные мостики, так как имеет два места присоединения. Разветвленная макромолекула из-за того что обладает несколькими ветвями может одновременно

присоединиться к нескольким частицам. Это объясняет больший эффективный диаметр флокул, начало флокуляции при меньших значениях концентрации и более быструю кинетику процесса при использовании разветвленного полимера.

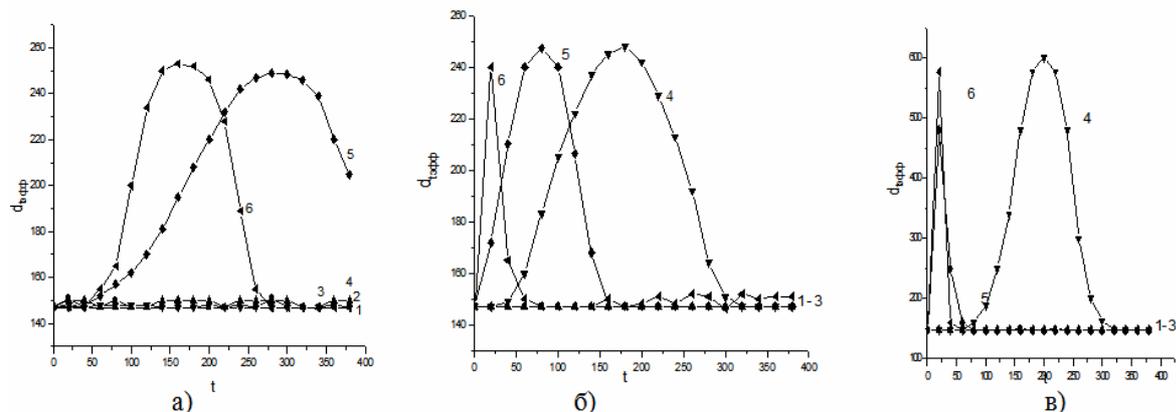


Рис.1. Зависимость эффективного диаметра частиц, $d_{\text{эфф}}$ (нм), от времени эксперимента, t (мин), $\text{pH} = 6,9$. C (мг/л) - концентрация полимеров.

а) 1– раствор БСА, 2-6 - раствор БСА + полимер №1. б) 1– раствор БСА, 2-6 - раствор БСА + полимер №2. в) 1– раствор БСА, 2-6 - раствор БСА + полимер №3. 2. $C = 0,5$; 3. $C = 1$; 4. $C = 2,5$; 5. $C = 5$; 6. $C = 6$.

Заключение

При взаимодействии катионных полиэлектролитов с БСА образование флокул в основном определяется ион - ионным притяжением ионизованных карбоксильных групп белка и аммониевых групп полимеров. Увеличение молекулярной массы линейного полиэлектролита способствует уменьшению концентрации полимера, необходимой для начала процесса флокуляции БСА. Рост числа контактов полимерной макромолекулы с белком приводит к уменьшению времени, необходимого для установления равновесного состояния в дисперсной системе. При постоянном значении pH эффективный диаметр образовавшихся флокул определяется степенью разветвленности полиэлектролита и не зависит от молекулярной массы линейных полимеров. Полученные в работе результаты являются основой для разработки эффективных методов флорочистки нативных растворов целевых БАВ от примесных белков.

Работа осуществлялась при поддержке гранта РФФИ 10-03-00738.

Список литературы

1. Ahuja S. Handbook of bioseparation. Academic Press, San Diego, CA, 2000. 354p.
2. Запольский А.К., Баран А.А. Коагулянты и флокулянты. Л.: Химия, 1987. 204с.
3. Flickinger M.C., Drew W.C. Encyclohedia of bioprocess technology. New York.Wiley. 1999. 654p.
4. Плотникова П.В., Власова О.Л., Грошикова А.Р., Писарев О.А., Панарин Е.Ф. Влияние молекулярной массы и структурной организации катионных полиэлектролитов на флокуляцию белка. ЖПХ. Т.81. 2008. №9. С.1533-1536.

5. Власова О.Л., Плотникова П.В., Писарев О.А., Панарин Е.Ф.//Научно-технические ведомости СПбГПУ. 2007. Т5. №2. С.32-39.
6. Власова О.Л., Плотникова П.В., Groшикова А.Р., Писарев О.А., Панарин Е.Ф. // Материалы Международной конференции Медбиотек-3 . Москва, Авиаиздат, 2006. с.22.
7. Peters T. All about albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications. Academic Press, San Diego, CA, 1996. 456p.

Грошикова Анна Родионовна - научный сотрудник лаборатории биологически активных полимеров, Институт высокомолекулярных соединений Российской Академии Наук, Санкт-Петербург

Писарев Олег Александрович - зав. лаб. полимерных наносистем и биотехнологических продуктов, Институт высокомолекулярных соединений Российской Академии Наук, Санкт-Петербург

Панарин Евгений Фёдорович - директор института, зав. лаборатории биологически активных полимеров, Институт высокомолекулярных соединений Российской Академии Наук, Санкт-Петербург

Leschinskaya Anastasia P. - junior research worker, Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences

Pisarev Oleg A. - laboratory chief, Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences

Panarin Eugenie F. - institute director, Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences



УДК 543.544.5

Сорбция производных изатина сверхсшитыми полистиролами из водно-органических растворов

Власова Ю.В., Шафигулин Р.В., Буланова А.В.,
Пурыгин П.П., Туманин А.Н.

Самарский государственный университет, Самара

Поступила в редакцию 26.11.2010 г.

Аннотация

Исследованы особенности сорбции производных изатина на сверхсшитом полистироле (ССПС) из водно-цетонитрильного раствора. Показано, что их сорбция обусловлена дисперсионными и π - π -взаимодействиями сорбатов с неполярным ССПС.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, изатины, сверхсшитый полистирол

Sorption of synthesized derivatives of isatin on the hypercrosslinked polystyrene was investigated. It was shown that their sorption is caused by dispersive and specific interaction.

Keywords: high performance liquid chromatography, isatins, hypercrosslinked polystyrene