

Школа-конференция «Успехи аналитической химии»
12-17 ноября 2006 г.

профессор, д.х.н. В.П. Варламов

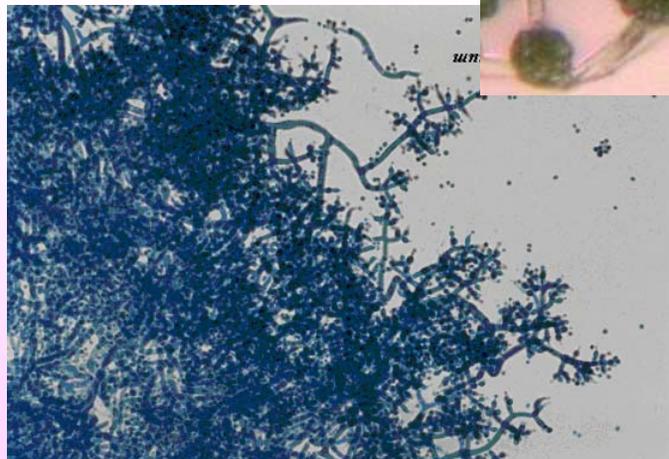
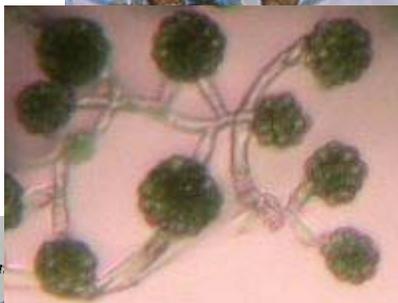
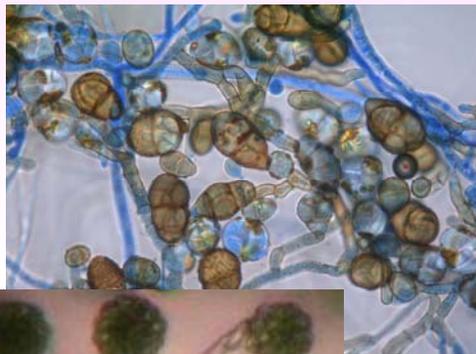
*Аналитические аспекты в исследовании технологии
превращения хитина и хитозана*



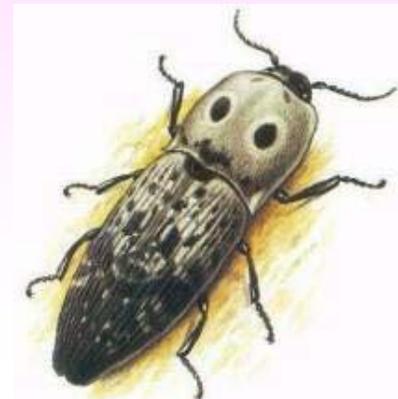
центр
БИОИНЖЕНЕРИЯ
российская академия наук

Природные источники хитина и хитозана

Грибы



Насекомые



Природные источники хитина и хитозана

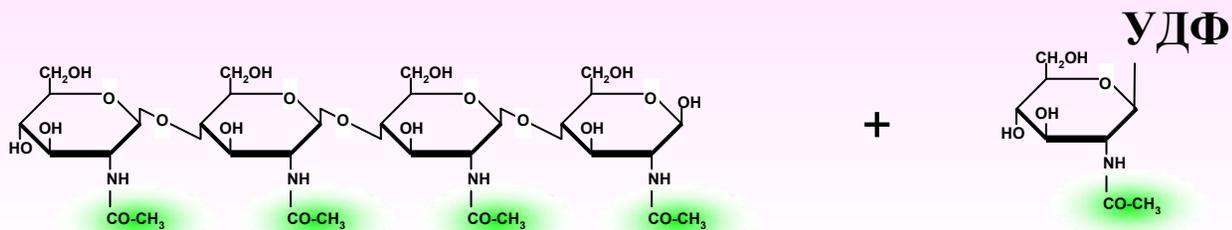
Ракообразные



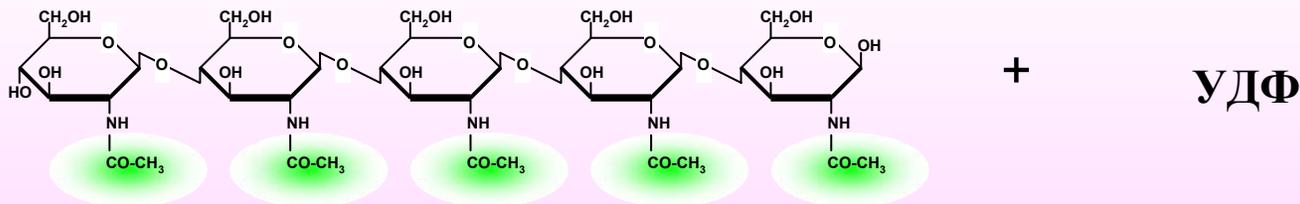
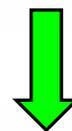
Этапы производства хитина и хитозана из ракообразных



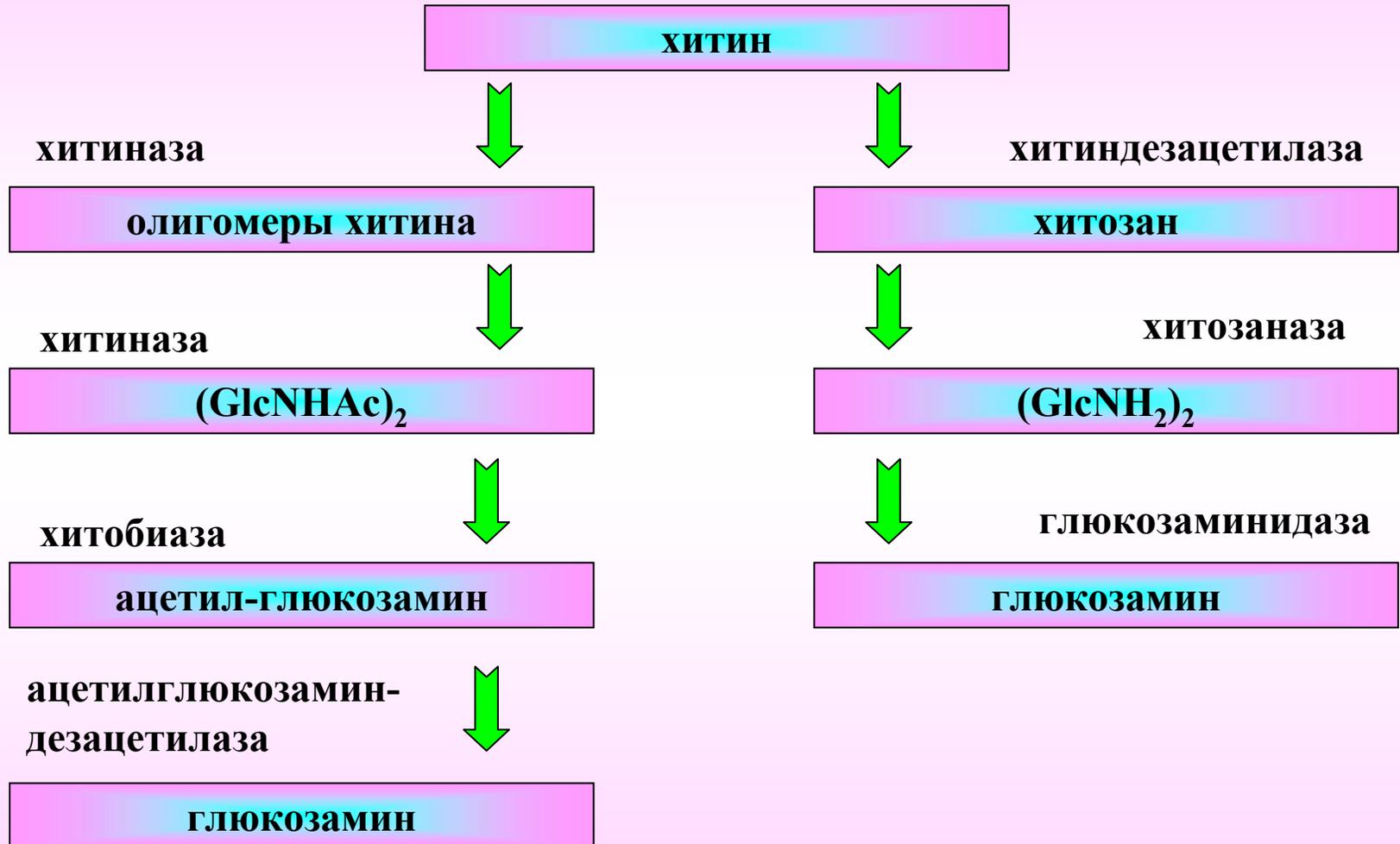
Синтез хитина в природе



хитинсинтетаза
(хитин-4-β-ацетил-глюкозаминилтрансфераза)

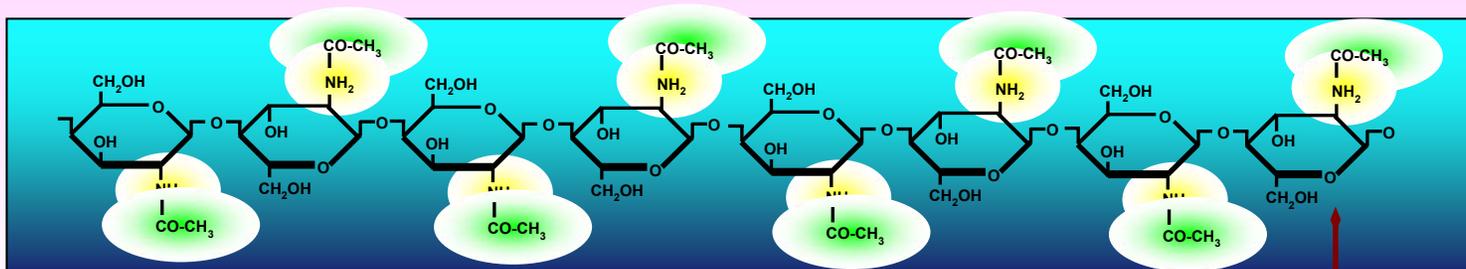


Пути деградации хитина



Строение и получение хитозана

хитин крабовый

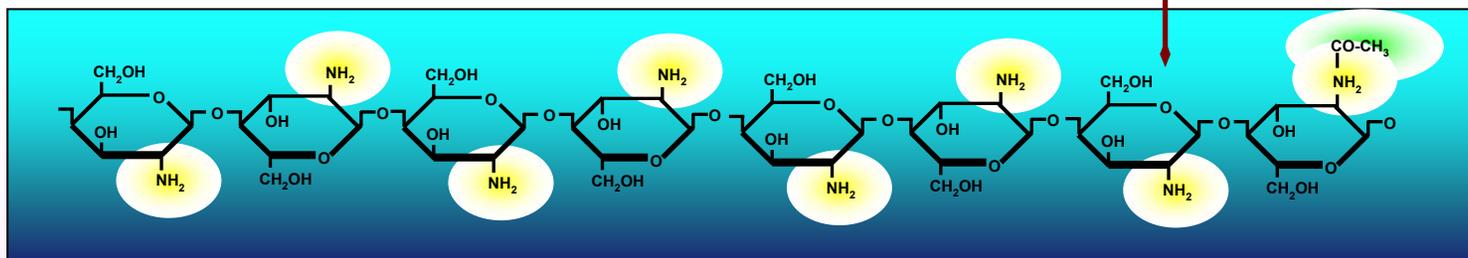


деацетилирование

ХИТОЗАН высокомолекулярный
500-1000 кДа



- N-ацетилглюкозамин
- глюкозамин

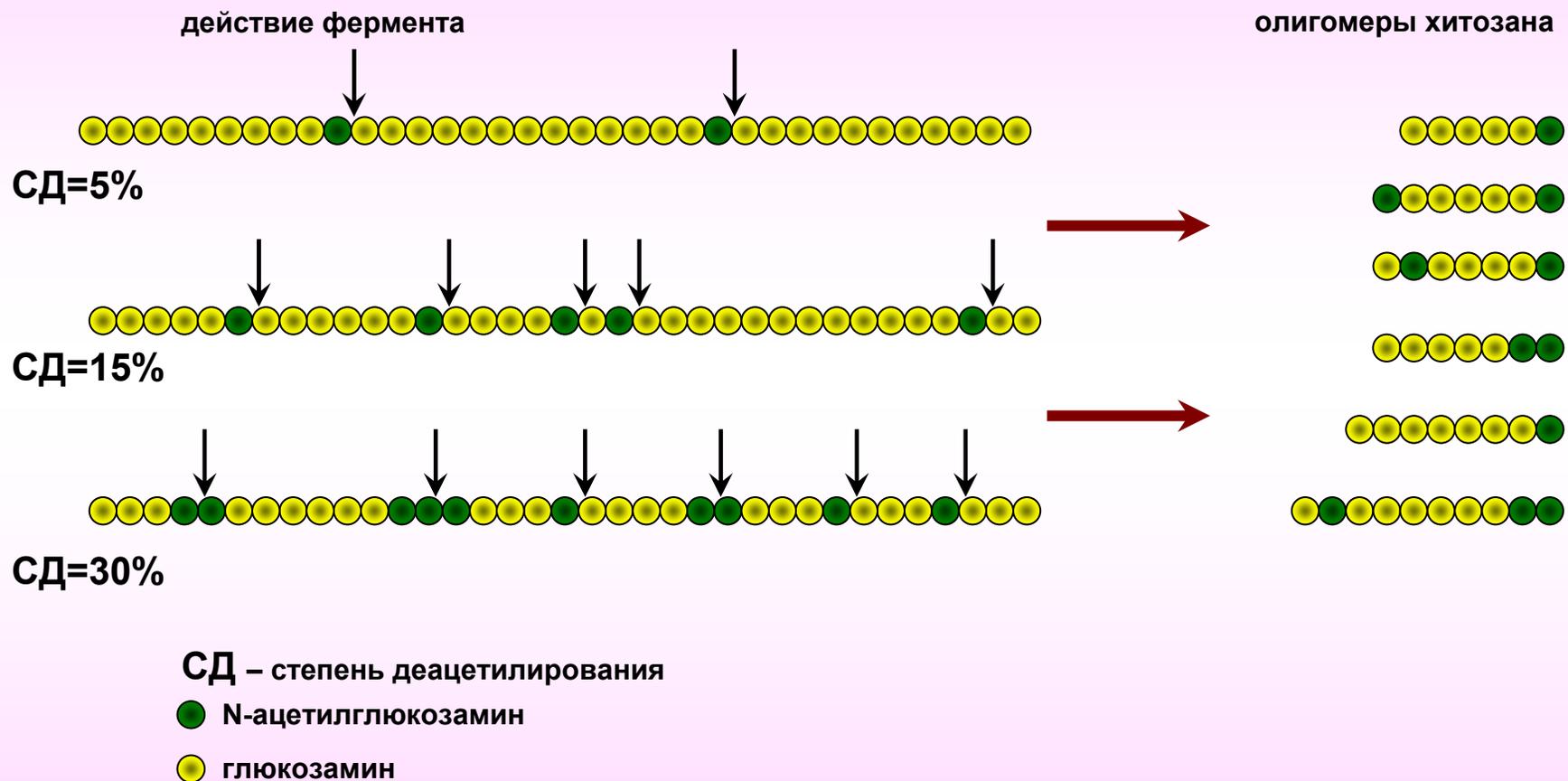


ферментативный гидролиз,
кислотный гидролиз



олигомеры хитозана
1-20 кДа, СП 5 - 100

Ферментативная деполимеризация хитозана



Сферы применения хитозана

пищевая отрасль

элиситорные препараты для защиты растений

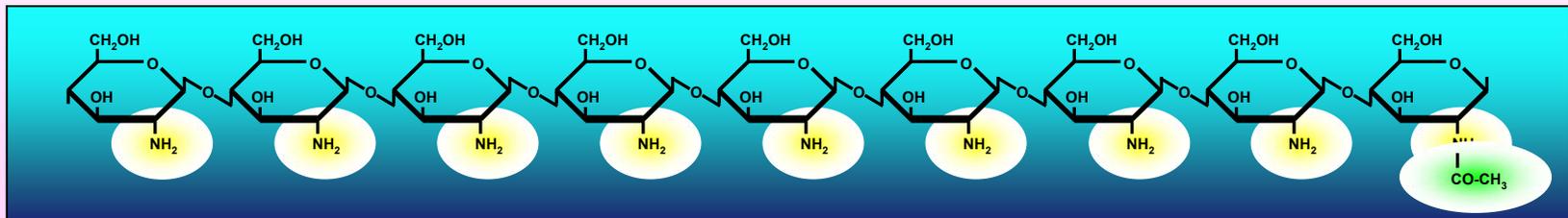
сорбент тяжёлых и радиоактивных металлов

средство доставки лекарственных веществ

ранозаживляющие повязки

косметическая основа

радиопротекция

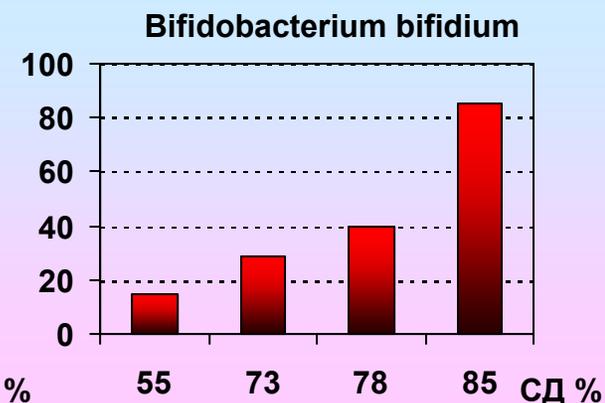
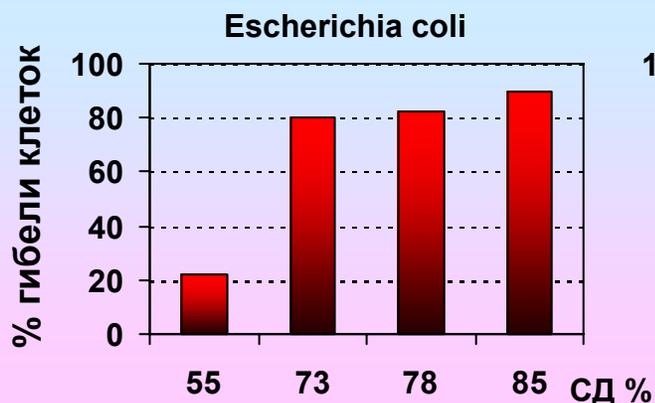


Антибактериальная активность низкомолекулярного хитозана

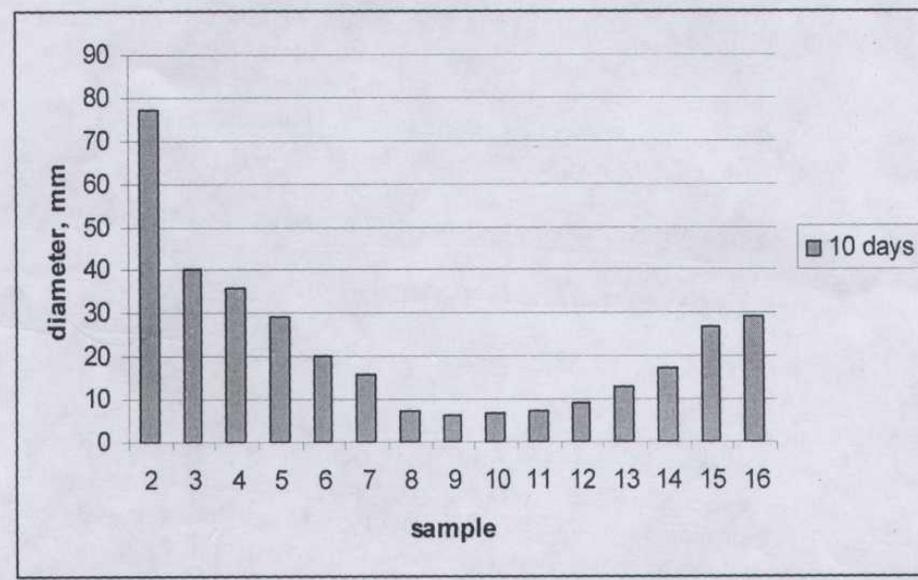
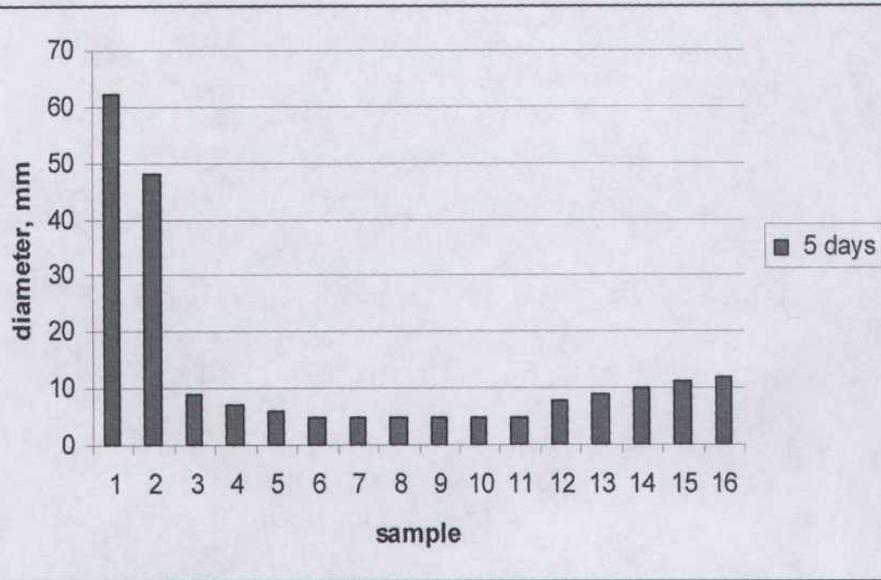
Гибель микроорганизмов, обработанных хитозанами со СД 85% и с разными мол. массами, после 1 ч инкубации, рН 6,5

микроорганизмы	% гибели при действии хитозанов с Мv, кДа		
	6	10	12
<i>Escherichia coli</i>	79,6	79,9	76,3
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	80,0	90,0	84,1
<i>Enterobacter agglomerans</i>	99,8	99,6	99,8
<i>Candida kruisei</i>	2,2	3,5	5,1
<i>Bacillus subtilis</i>	99,2	100	99,3
<i>Bifidobacterium bifidium</i>	82,0	85,7	93,5

Влияние хитозана 4 кДа с разными степенями деацетилирования на гибель клеток, после 1 ч инкубации, рН 6,5



Рост *Penicillium vermaessenii* в присутствии хитозана с различными молекулярными массами



1-control; 2-GlcNH₂; 3-1243 Da; 4-1300 Da; 5-1473 Da; 6-1651 Da; 7-1843 Da; 8-4108 Da; 9-5154 Da; 10-7565 Da; 11-9917 Da; 12-15033 Da; 13-26.0 kDa; 14-35.0 kDa; 15-52.0 kDa; 16-70.0 kDa

Использование олигомеров хитозана в доставке ДНК

Эффективность доставки ДНК в клетки хитозанами в зависимости от степени полимеризации хитозана

Рис. 1 опыт *in vitro*

Рис. 2 опыт *in vivo*

Оптимальные размеры олигомеров хитозана
СП 15-21, ММ 3-5 кДа

Уменьшение СП хитозана приводит к расщеплению нуклеиновой кислоты ДНКазами

Увеличение СП хитозана затрудняет диссоциацию комплекса с ДНК и уменьшает эффективность доставки *in vivo*

Рис.1

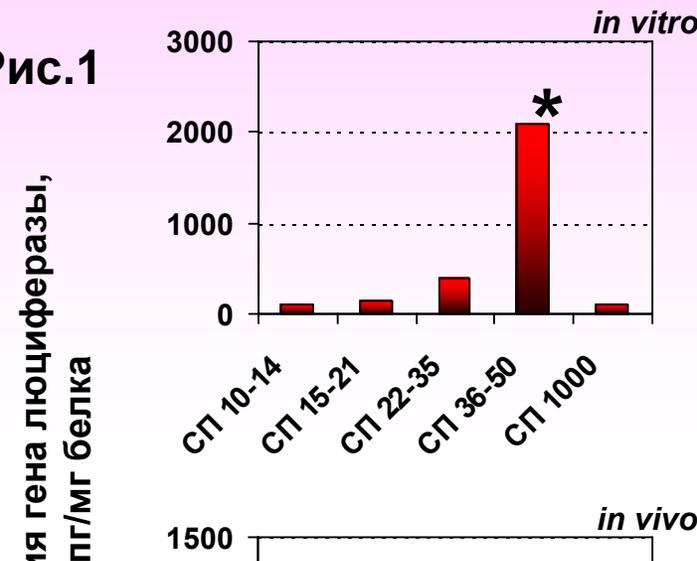
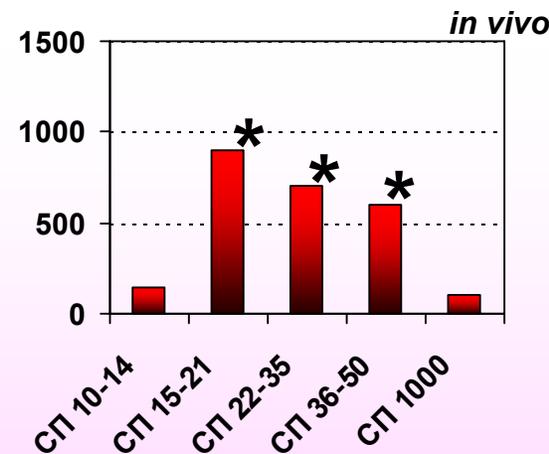
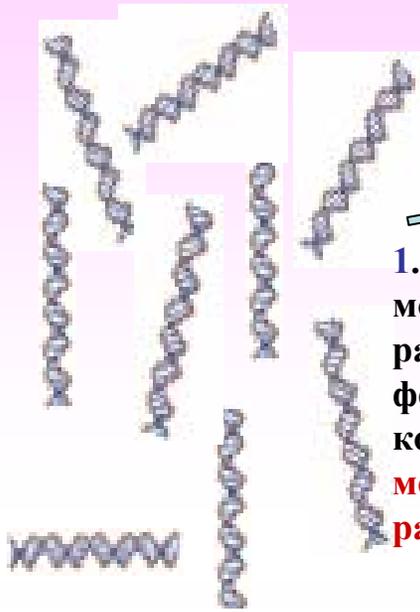


Рис.2



Два способа упорядочения молекул ДНК в фазах



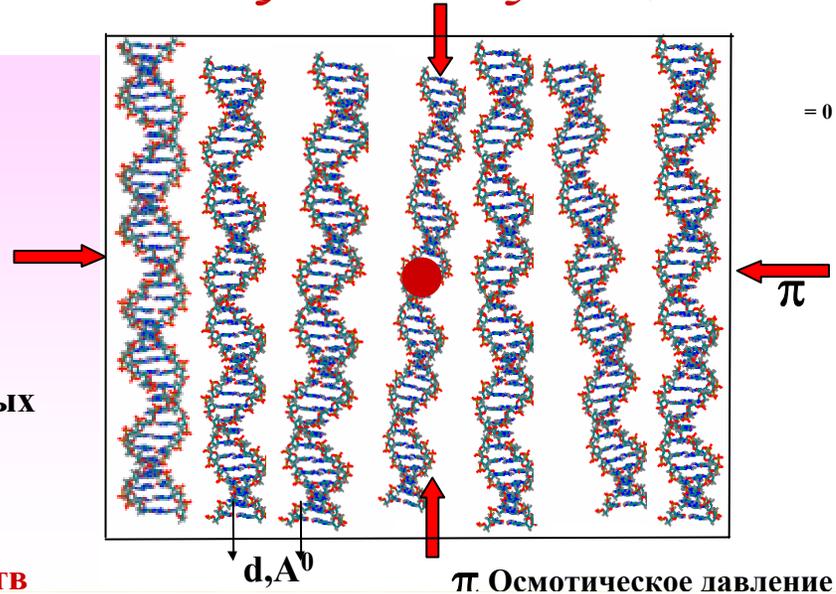
молекулы ДНК.

1. Фазовое исключение молекул из водно-полимерных растворов приводит к формированию фазы, в которой **расстояние между молекулами зависит от свойств растворителя**

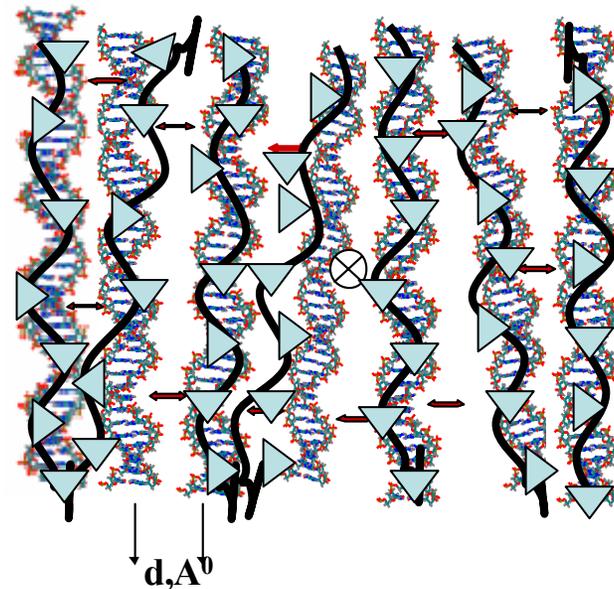
2. Образование комплексов между молекулами ДНК и



поликатионов (ПК) приводит к образованию фазы, в которой **расстояние между молекулами фиксировано**



π Осмотическое давление

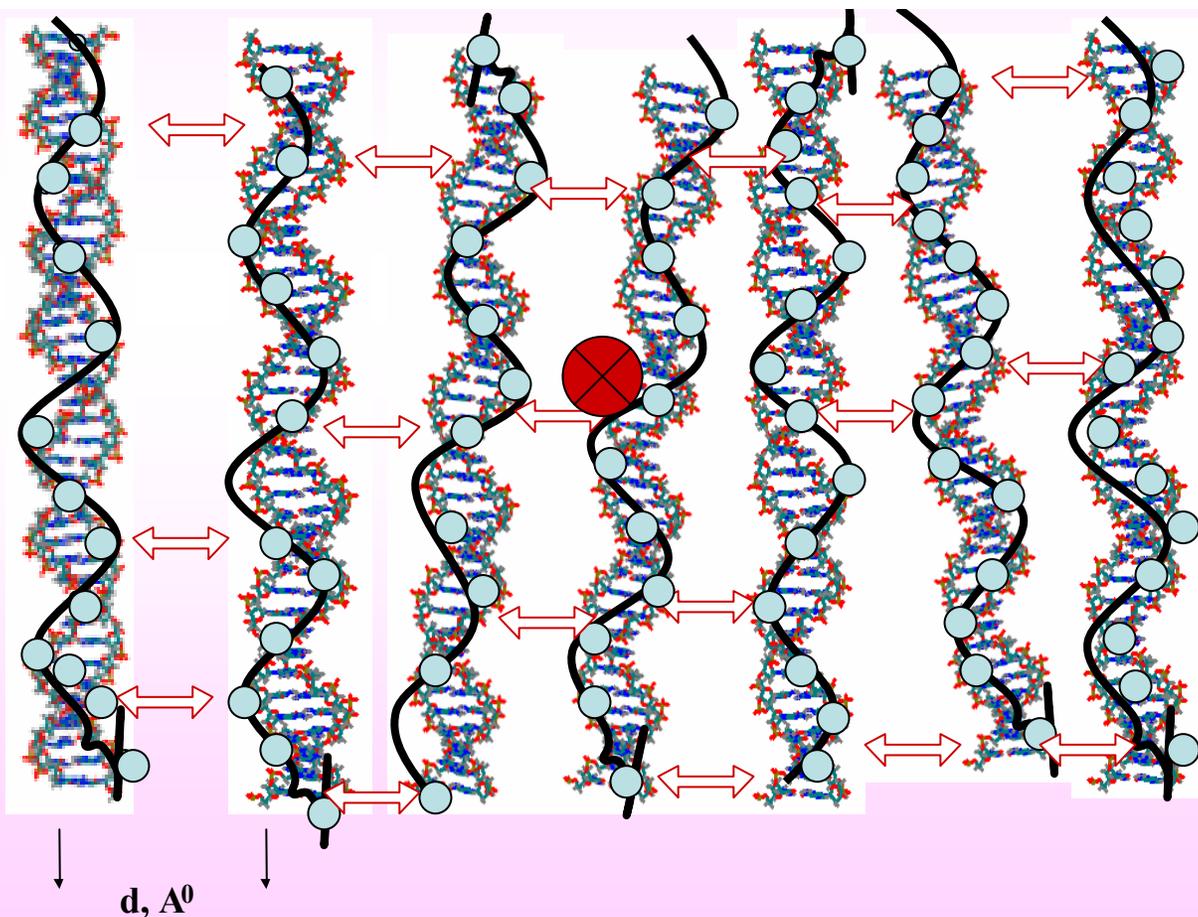


↔
Взаимодействие между молекулами комплексов (ДНК-ПК) определяет свойства образующихся частиц

Особенности частиц ЖКД, образуемых при фазовом исключении из водно-солевых дц молекул НК, отрицательные заряды которых нейтрализованы противоионами:

При нейтрализации 80-90% отрицательных фосфатных групп НК положительно заряженными группами поликатиона, взаимодействие между соседними молекулами НК приводит к образованию дисперсии.

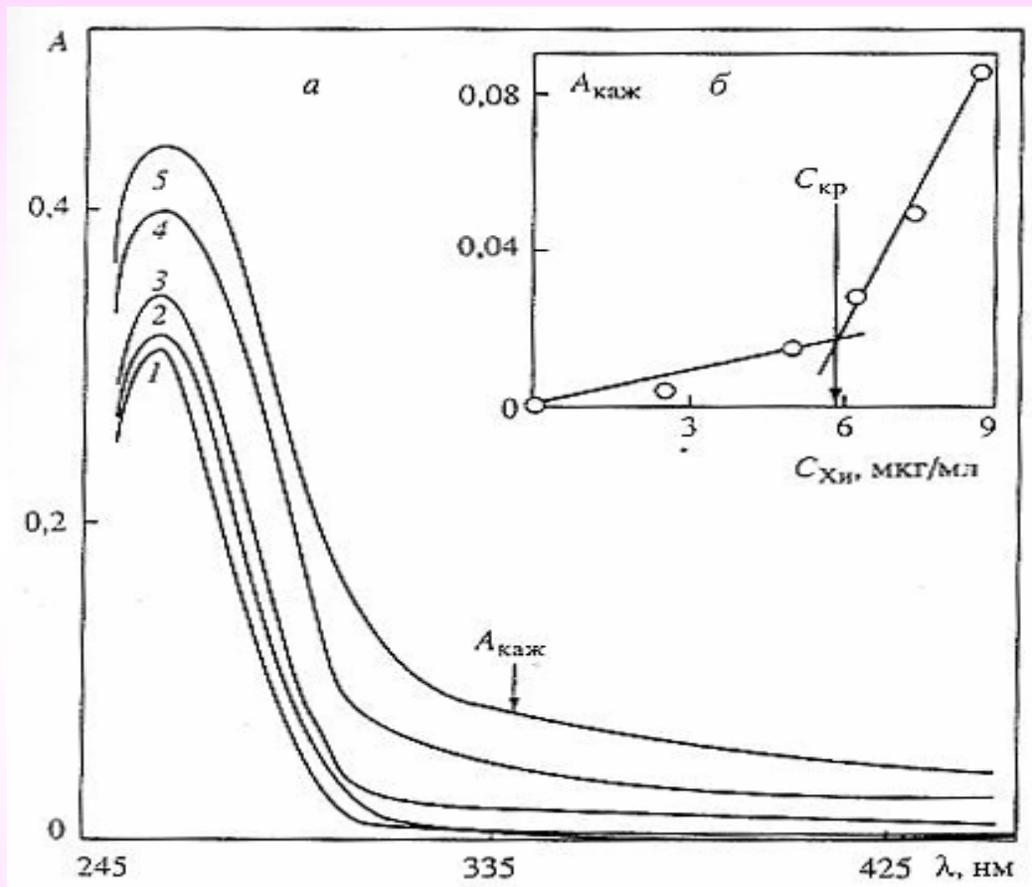
- 1). Энергия взаимодействия между молекулами комплекса (НК-поликатион) обеспечивает **одно, фиксированное расстояние** между соседними молекулами;
- 2). При «удачном» выборе поликатиона, при расстоянии (d) может возникнуть холестерическая упаковка соседних молекул;



3) Аномальная оптическая активность, характерная для частиц холестерической ЖКД НК, позволит **следить за изменениями характера упаковки молекул комплекса (НК-поликатион)**

4). Наличие дополнительных химических групп (в составе поликатиона) открывает возможность для эффективного взаимодействия разных химических и биологических соединений с частицами ЖКД.

Формировании дисперсии комплекса (ДНК-хитозан)

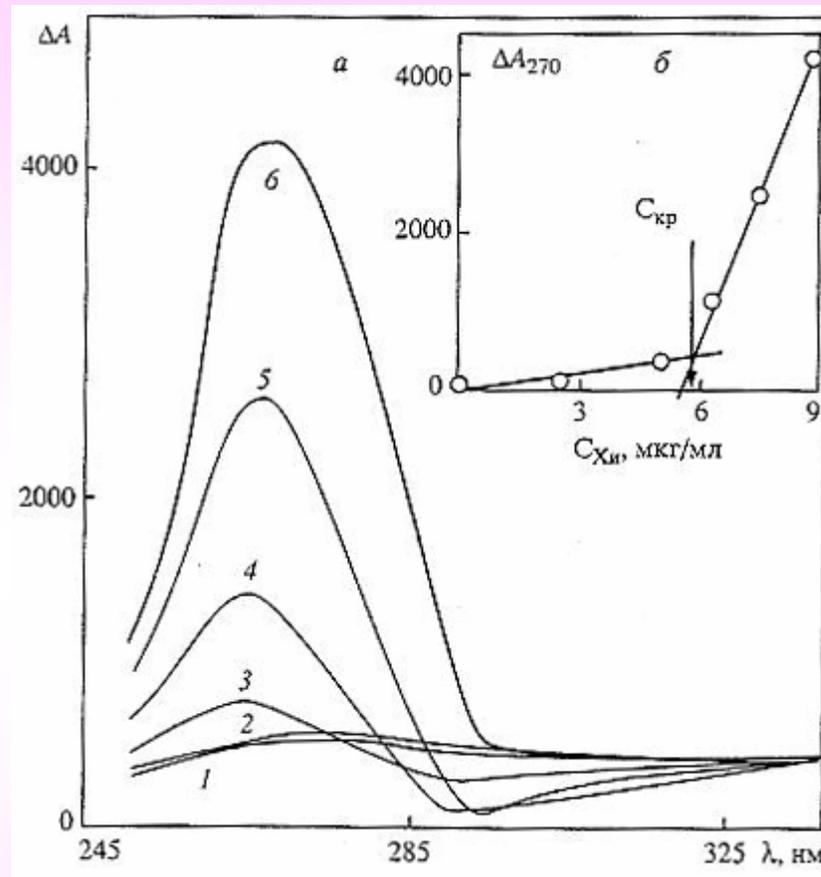


Спектры поглощения (а) ДНК в отсутствие (кривая 1) и присутствии хитозана в растворе (кривые 2-5) .

Кривые 2-5 - 2,5; 5,0; 7,5 и 8,75 $\mu\text{кг/мл}$ хитозана, соответственно

б) зависимость «кажущейся» оптической плотности (λ 340 нм) дисперсий комплексов (ДНК-хитозан) от концентрации хитозана в растворе

Спектры КД дисперсий комплекса (ДНК-хитозан)

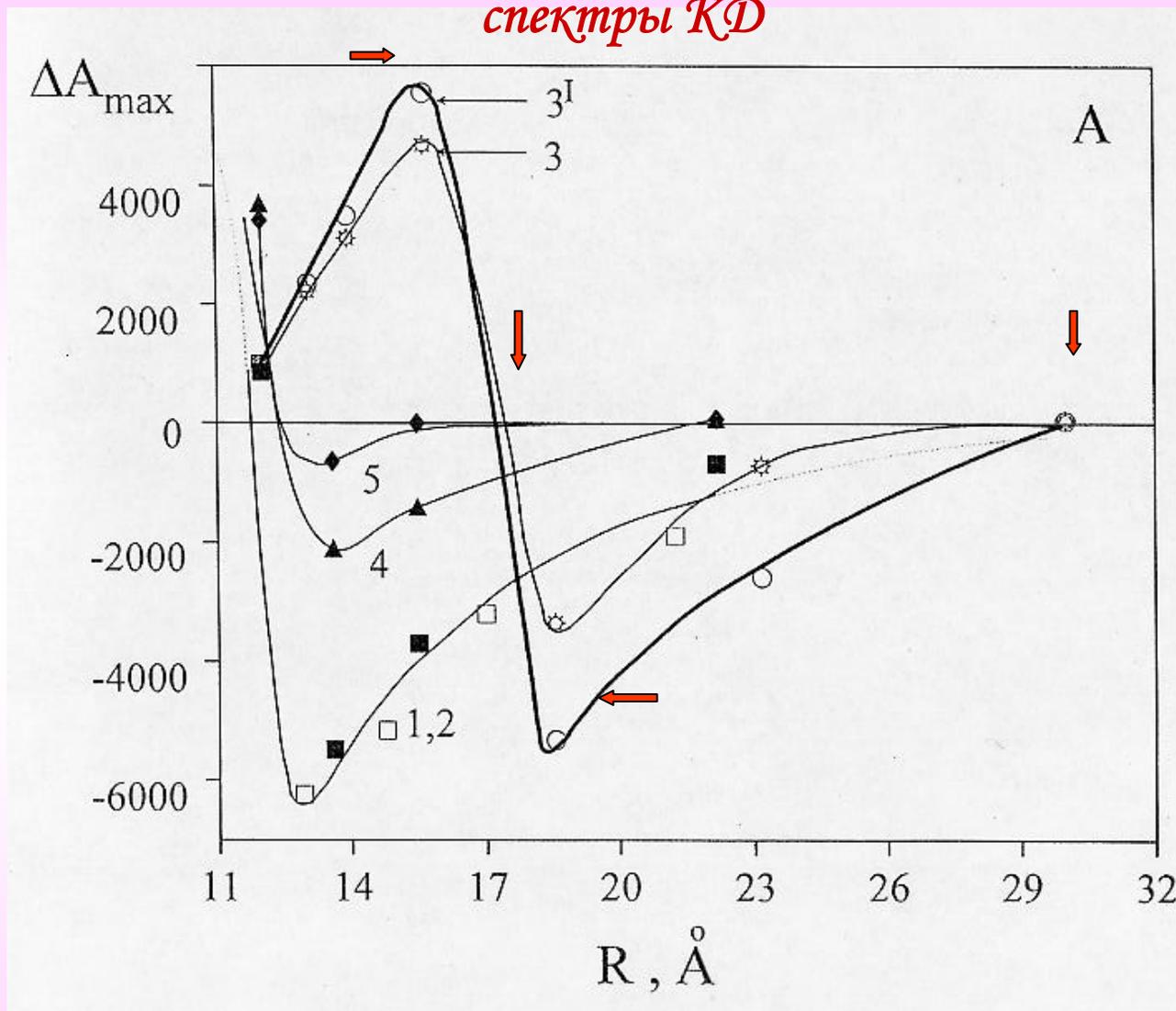


Спектры КД (а) ДНК в отсутствие (кривая 1) и присутствии хитозана в растворе (кривые 2-6).

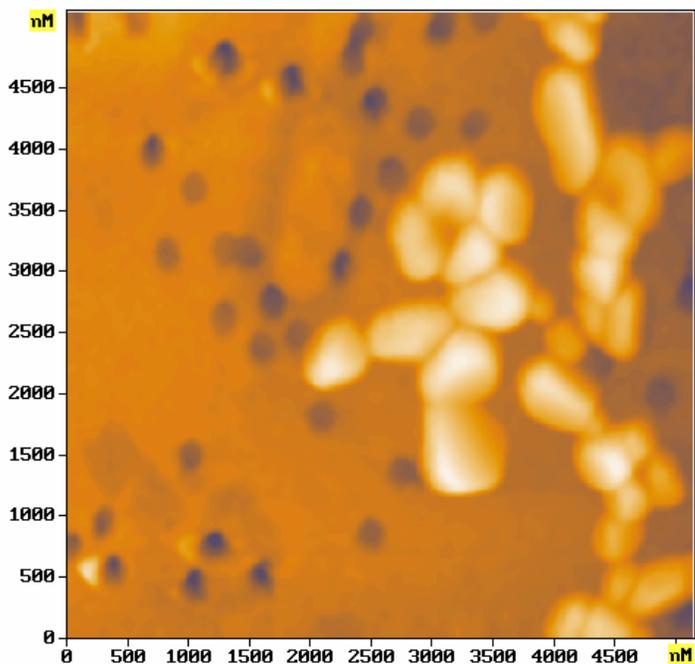
Кривые 2- 6 – 2,5; 5,0; 6,25; 7,5 и 8,75 мкг/мл хитозана, соответственно;

б) зависимость амплитуды полосы (λ 270 нм) в спектре КД комплексов (ДНК-Хи) от концентрации хитозана в растворе

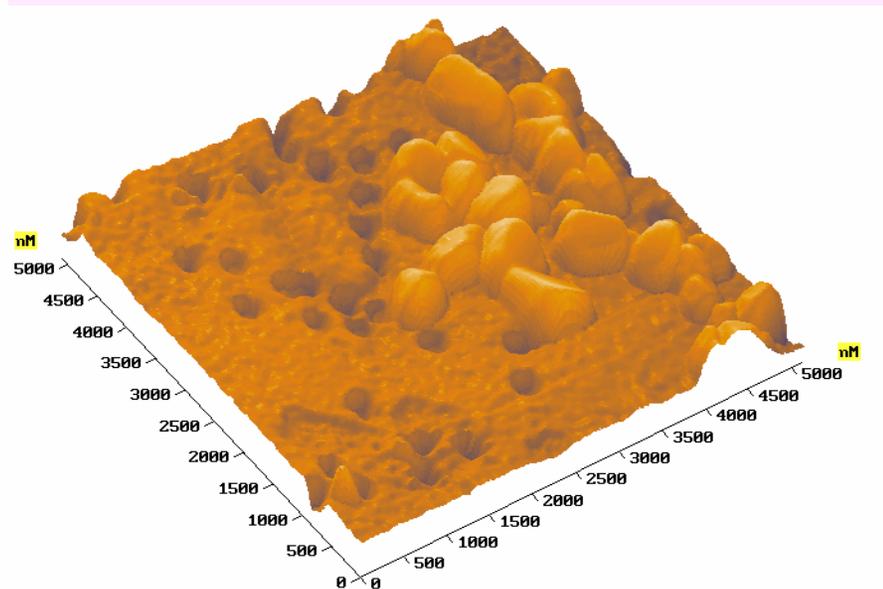
Формирование дисперсий комплексов (ДНК-хитозан), имеющих разные спектры КД



Зависимость амплитуды полосы в спектре КД ЖКД ДНК от среднего расстояния между аминогруппами в молекулах хитозана. 1, 4, 5 - 14,6 кДа (0,05; 0,15 и 0,5 М NaCl, соответственно); 2 - 8,4 кДа (0,05М NaCl); 3 - 5,0 кДа (0,05 М NaCl).



А



Б

2-D и 3-D изображения частиц ЖКД, сформированных из комплекса (ДНК-хитозан)

Радиозащитная активность низкомолекулярного хитозана

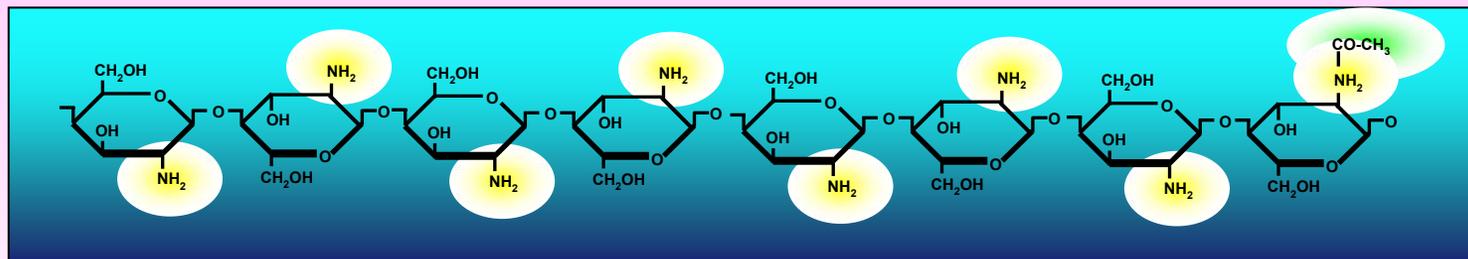
Влияние хитозана с различной молекулярной массой на выживаемость мышей при внутривенном введении за 15-30 минут до облучения в дозе 8г

ММ, кДа	Доза хитозана, мг/кг	Выживаемость, %
70	20	73*
	15	40*
10	50	87,1*
	25	30*
5	100	0
	50	20**
контроль	-	3,2

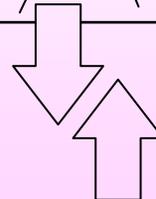
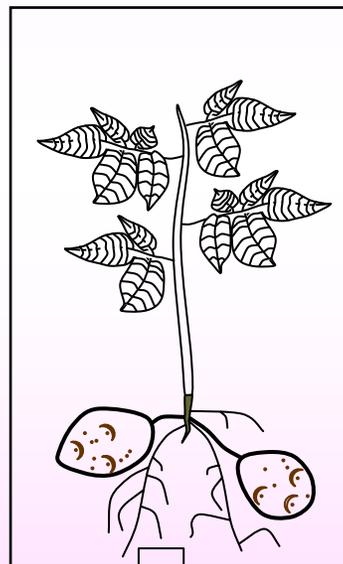
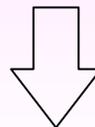
* Различия достоверны по сравнению с контролем при $P < 0,05$

** Различия достоверны по сравнению с контролем, хитозаном с ММ 70 кДа и 10 кДа

Препараты для защиты растений от фитопатогенов

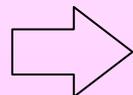


АгроХит (низкомолекулярный хитозан, 5-20 кДа)

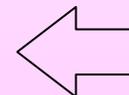


ТМТД
Ридомил голд МЦ
Куприкол

химические пестициды,
эталон



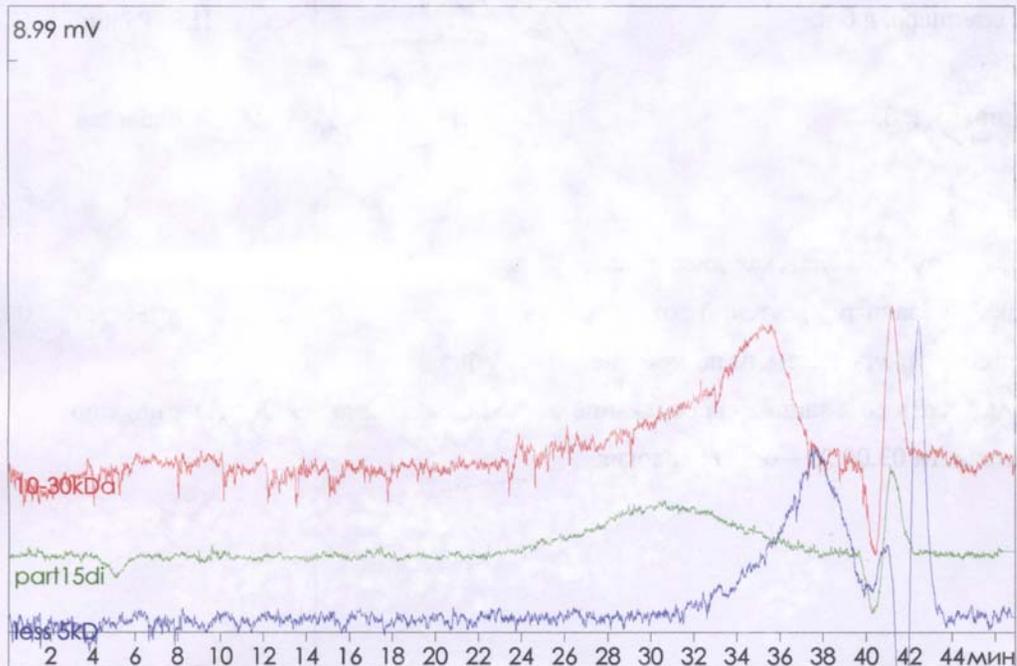
фитопатоген



Trichoderma harzianum

Триходермин

Хроматограмма образцов хитозана



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

Для образца с $K = 1.000000$ Альфа = 0.000000
Mn: 3384.65
Mw: 10143
Mw/Mn: 2.99678 (индекс полидисперсности)
Mz: 31380.4
Mz+1: 51491.5
Mp: 2510.15 (молекулярная масса для наибольшего пика)
Квант времени, использованный при расчетах: 9.988 сек.

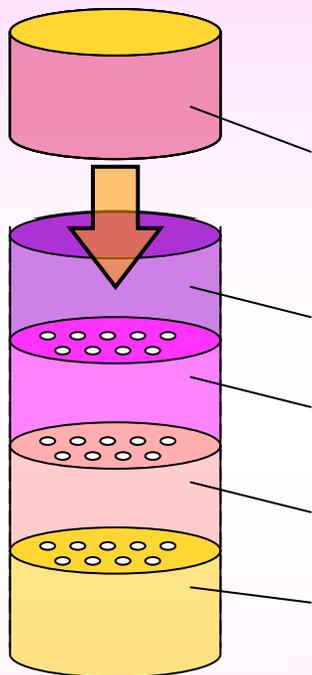
КОММЕНТАРИЙ

Отчет выдан программой МультиХром ГПХ
© 1993-2001 Ampersand Ltd.

**масса в хроматографическом пике - M_p ,
средневесовая молекулярная масса - M_w ,
среднечисловая молекулярная масса - M_n ,
значения полидисперсности - M_w/M_n (I_p)**

Фракционирование хитозана и его характеристика

фракционирование хитозана на мембранах



№ фракции хитозана	M_w (kDa)	M_n (kDa)	M_w/M_n	массовая доля фракции, %
нефракционированный хитозан    	40,4	7,5	5,41	100
 фракция 1	30,4	8,4	3,60	51
 фракция 2	10,1	3,4	3,00	42
 фракция 3	2,3	1,4	1,68	2
 фракция 4	1,3	0,8	1,60	4

Для определения молекулярной массы в хроматографическом пике (M_p), средневесовой молекулярной массы M_w , среднечисловой молекулярной массы M_n и значения полидисперсности (M_w/M_n) образцов хитозана проводили хроматографический анализ с использованием тандема колонок Ultrahydrogel 250 и Ultrahydrogel 500. Для калибровки колонок использовали декстрановый стандарт

Влияние СДА хитозана на его гидродинамический объем

Physicochemical Behaviors of Chitosan

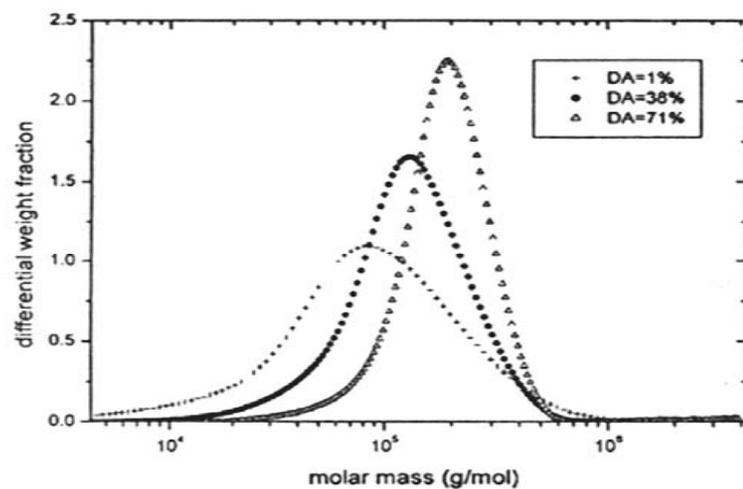
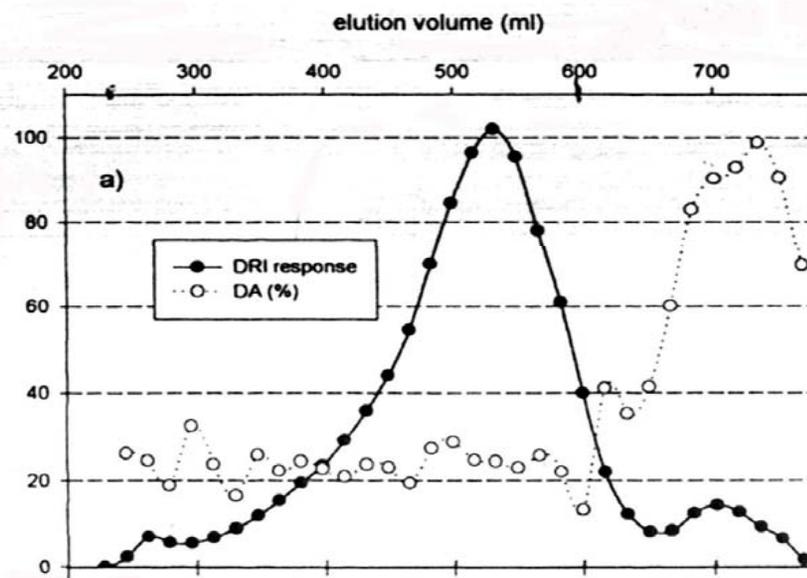


Figure 6. Molecular weight distributions of chitosans eluted on TSK gel columns in solution in an acetic acid/ammonium acetate buffer ($\mu = 0.15$ M).

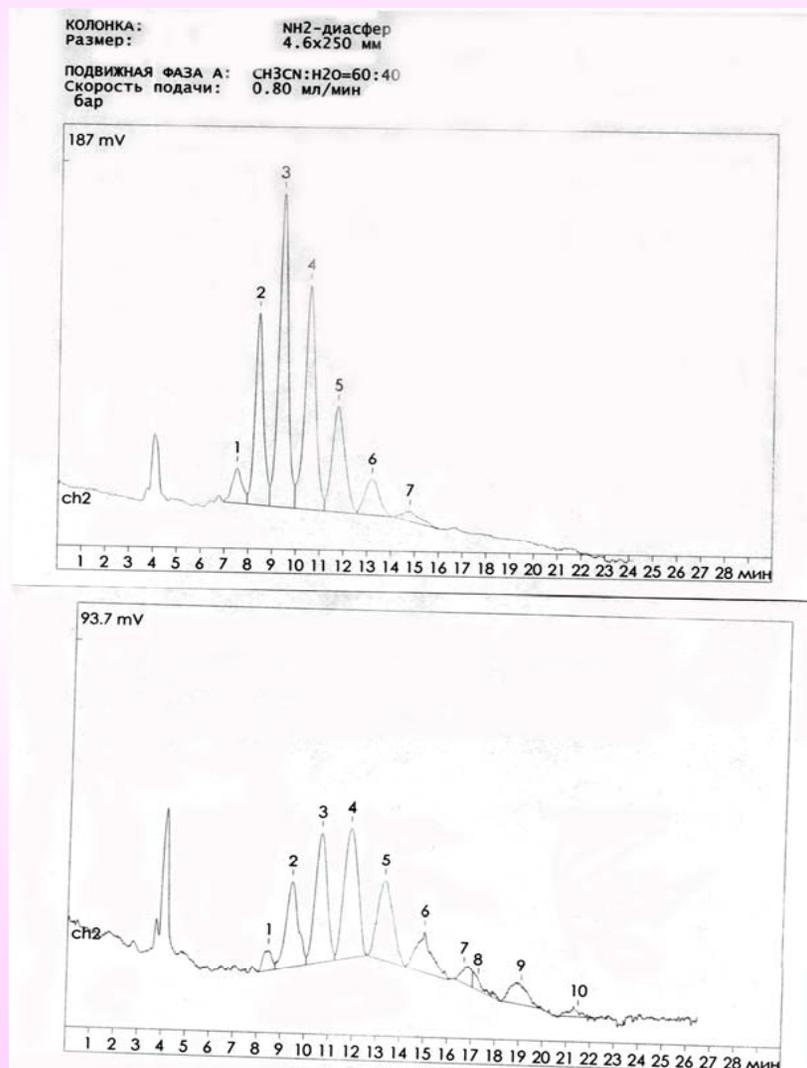
G. Berth, H. Dautzenberg / Carbohydrate Polymers 47 (2002) 39–51



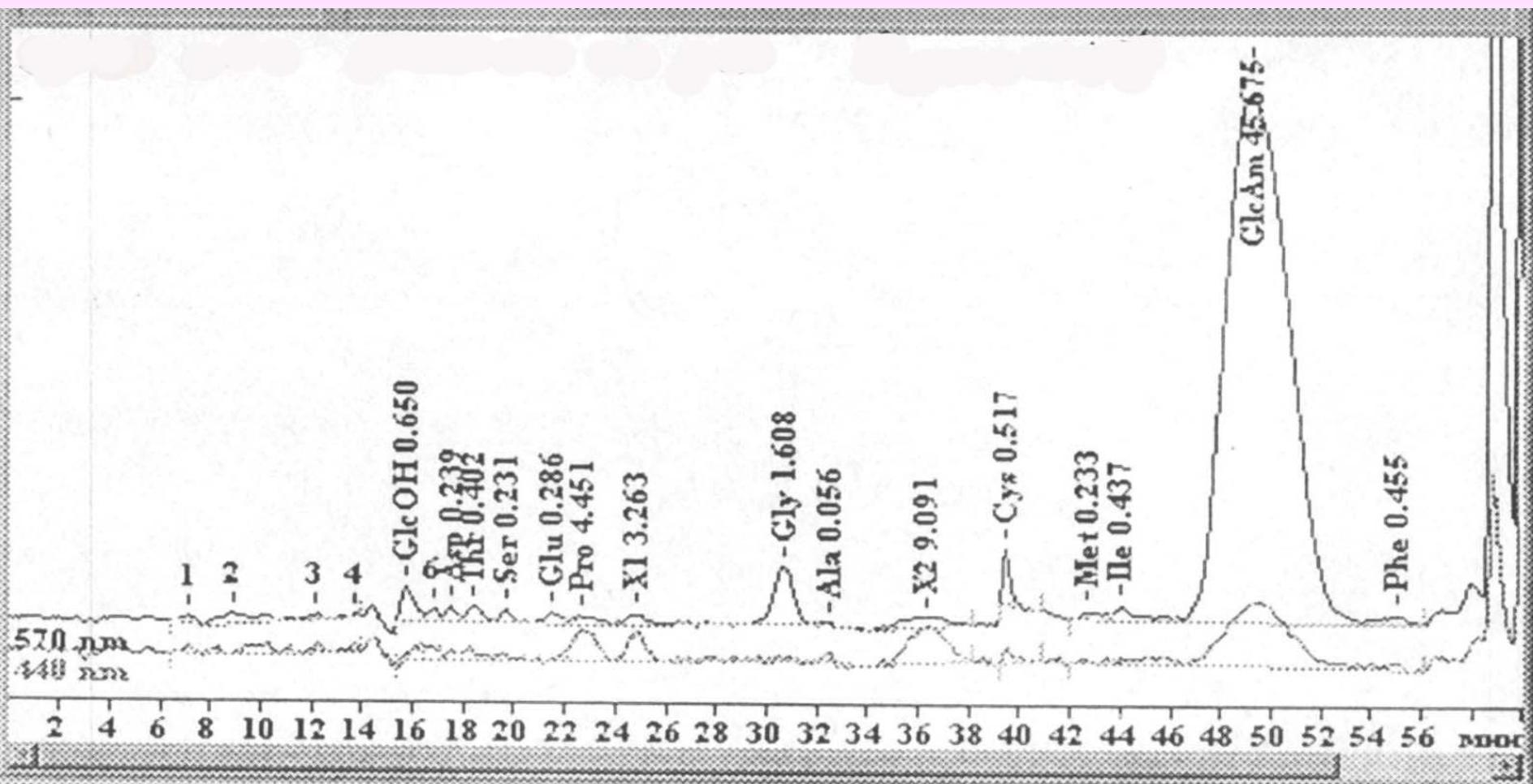
Влияние СДА на значения ММР хитозана

CDA, (%)	M_N	M_W	I_P
89	6813	41788	6.1
80	5939	31546	5.3
76	5473	21864	4.0

Определения содержания олигомеров в препаратах хитозана



Определение остаточного белка



Исследование влияния материала ультрафильтрационных мембран на возможность фракционирования хитозана

Исследованные материалы:

- Полисульфон
- Сополимер акриловой кислоты и винилового спирта
- Ацетилированная целлюлоза
- Регенерированная целлюлоза

Выбраны мембраны Hydrosart:

(Пределы пропускания: 30, 10, 5 кДа)

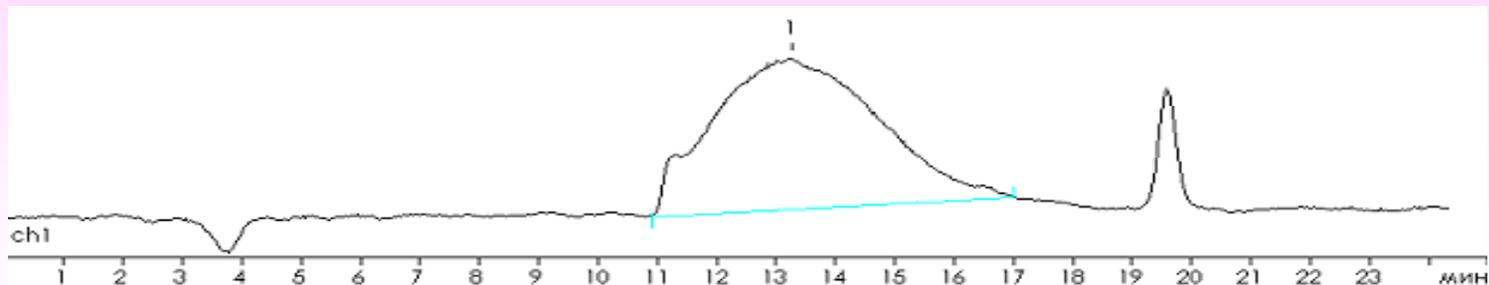
Выполнены из частично регенерированной целлюлозы

Результаты хроматографического анализа фракций хитозана

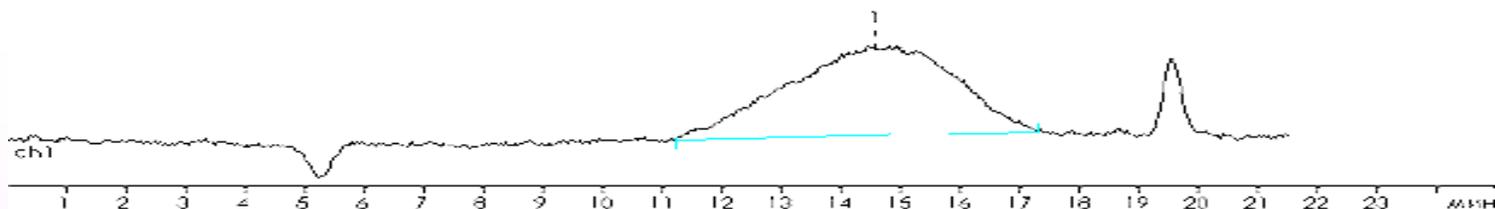
Характеристика фракций > 30 кДа

Растворитель	M_w	M_n	M_w / M_n
0,3 М NaAc	40450	18450	2,19
0,1 М NaAc	36485	15628	2,33
0,1 М NH ₄ Ac	33415	13254	2,52
0,3 М NaCl	30900	14701	2,01
0,3 М NaLac	29185	14925	1,96
0,1 М NaLac	27585	12417	2,22
0,3 М NaNO ₃	26649	11826	2,25
0,1 М NaCl	24219	10876	2,23
0,1 М NaNO ₃	23908	11745	2,03
0,3 М NH ₄ Ac	21879	5942	3,68

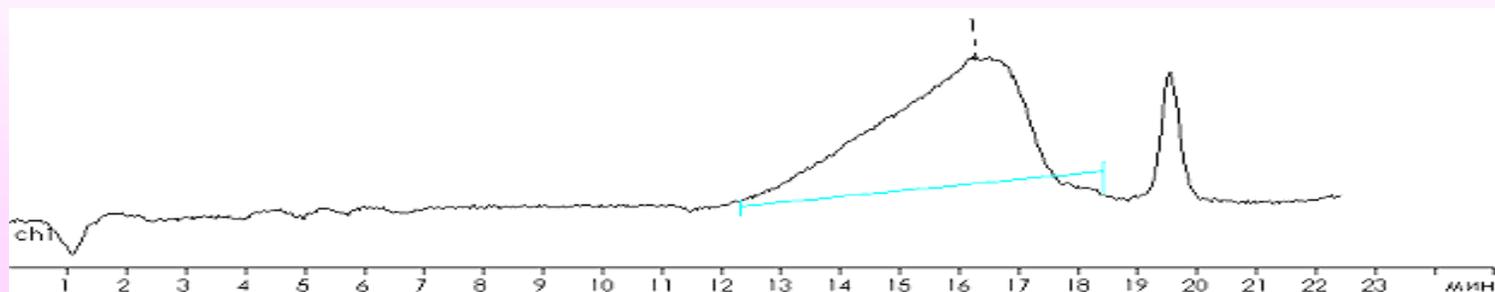
Типичные профили хроматографических пиков получаемых фракций



Типичный вид хроматограммы фракции хитозана >30 кДа



Типичный вид хроматограммы фракции хитозана 10-30 кДа



Типичный вид хроматограммы фракции хитозана 5-10 кДа

Хроматографическое оборудование

- Система HPLC «Sykam», Германия
- UV-детектор «Sykam», Германия
- RI-детектор «Knauer», Германия
- Дегазатор «Knauer», Германия
- Колоночный термостат «Bio-Rad», США
- Колонки UltraHydroGel-250 и
UltraHydroGel-500 «Waters», США
- Диасфер-Амин «ВиоХимМак», Россия
- Программа расчета Мультихром в.1.6 «Амперсент»,
Россия

Аналитический центр Российского хитинового общества

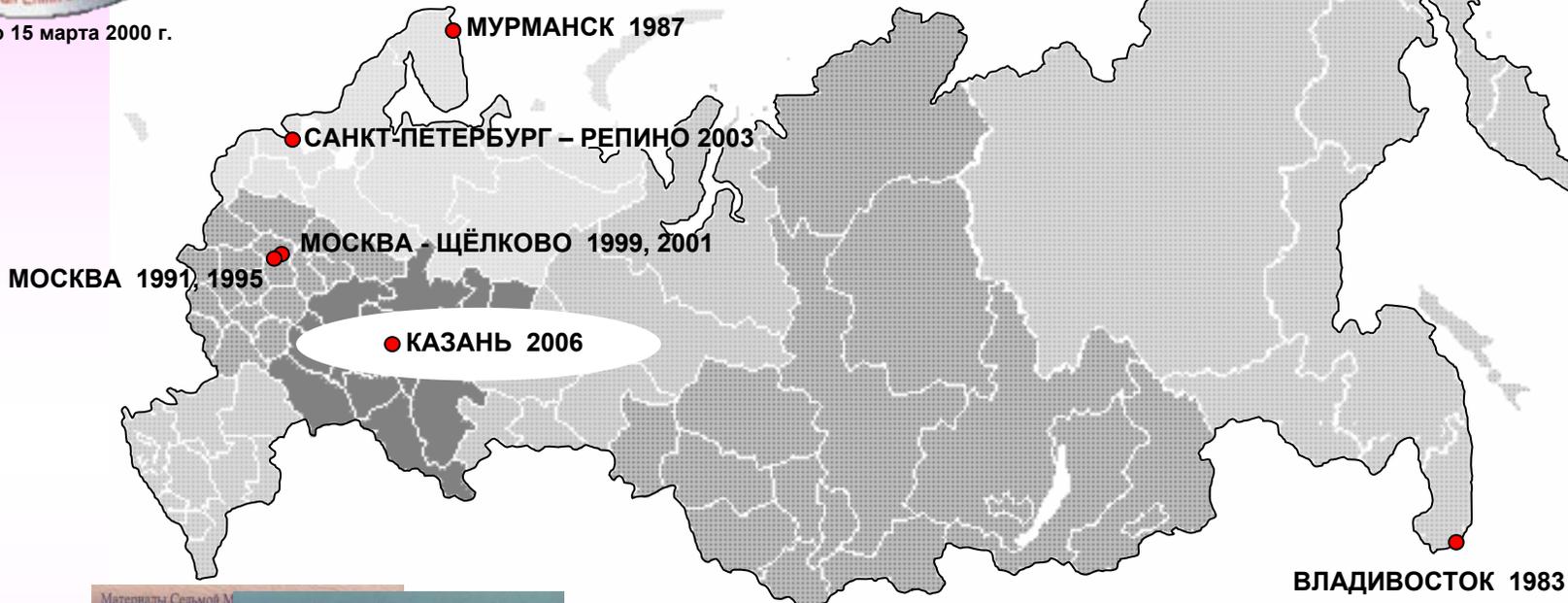
к.х.н. С.А.Лопатин, тел. 135 65 56



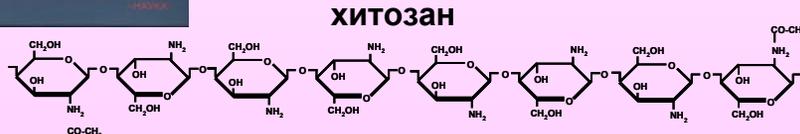
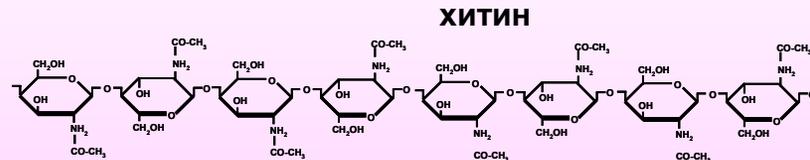


основано 15 марта 2000 г.

VIII Международная конференция СОВРЕМЕННЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ХИТИНА И ХИТОЗАНА Казань, 12-17 июня 2006



↑ масса, кг



A new idea **may** outweigh...



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ

БЮРО

ПОСТАНОВЛЕНИЕ

27 декабря 1999 года

№ 71

Москва

О частичном изменении структуры
и состава Научного совета РАН по
биотехнологии

Бюро Отделения физико-химической биологии РАН ПОСТАНОВЛЯЕТ:

1. Утвердить в структуре Научного совета РАН по биотехнологии новую секцию "Биотехнология хитина и хитозана".
2. Ввести в состав Научного совета по биотехнологии следующих ученых:
Варламова В.П. - д.х.н., Центр "Биоинженерия", председатель секции;
Даванкова В.А. - д.х.н., ИНЭОС им. А.Н. Несмеянова РАН;
Бабак В.Г. - д.х.н., ИНЭОС им. А.Н. Несмеянова РАН;
Нифантьева Н.Э. - д.х.н., ИОХ им. Н.Д.Зелинского РАН;
Вихорева Г.А. - д.х.н., Московская государственная текстильная академия;
Шпигун О.А. - д.х.н., МГУ им. М.В. Ломоносова;
Шеховцева Т.Н. - д.х.н., МГУ им. М.В. Ломоносова.

Академик-секретарь Отделения
академик



В.Т.Иванов

Ученый секретарь Отделения
кандидат биологических наук

В.В.Верзилов

Спасибо за внимание