



УДК :582.661.21:547.9

Голиб НАЗАРОВ,

М.н.с, Институт биоорганической химии им. акад. А.С.Садыкова АН РУз

E-mail: abdishukurovich.nazarov.91@mail.ru.

Сарвиноз НАЗАРОВА,

Базовый докторант Ташкентский химико-технологический институт

Дурдона РАСУЛОВА,

Ассистент Ташкентский государственный технологический университет

Малика РАЗИКОВА,

Базовый докторант Ташкентский государственный технологический университет

Дилобар МИРЗАЕВА,

Доцент Ташкентский государственный технологический университет

Дилобар МИРХОДЖАЕВА,

Доцент Ташкентский государственный технологический университет

На основе рецензии доцента Института Биорганической Химии У.Ишимова

РАЗДЕЛЕНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СЕРИЦИНА БЕЛКА ИЗ ШЕЛКА

Аннотация

Белок серицин получали из шелка водной экстракцией. Изучено влияние серицина на водную среду и температуру. Метод Лоури был использован для определения общего содержания белка в растворах, полученных из шелка под воздействием четырех различных температур. Белок серицин был выделен в чистом виде. Проведены ИК-спектрометрический и УФ-спектрометрический анализ серицина. Исследование количества аминокислот в белке серицина проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: Шелк, фиброин, серицин, Лоури, спектрометрия, хроматографии.

SEPARATION AND PHYSICO-CHEMICAL ANALYSIS OF SILK PROTEIN SERICINE

Annotation

Sericin protein was obtained from silk by water extraction. The effect of sericin on the aquatic environment and temperature has been studied. Lowry's method was used to determine the total protein content of solutions obtained from silk at four different temperatures. Sericin protein was isolated in pure form. IR-spectrometric and UV-spectrometric analysis of sericin was carried out. The study of the amount of amino acids in the sericin protein was carried out using high performance liquid chromatography.

Key words: Silk, fibroin, sericin, Lowry, spectrometry, chromatography.

IPAKDAN SERITSIN OQSILINI AJRATISH VA FIZIK-KIMYOVIY TAHLIL QILISH

Annotatsiya

Seritsin oqsili ipakdan suvli ekstraksiya yo'li bilan olingan. Seritsinning suv muhiti va haroratga ta'siri o'rganildi. Louri usuli to'rt xil harorat ta'sirida ipakdan olingan eritmalarning umumiy oqsil tarkibini aniqlash uchun ishlatilgan. Seritsin oqsili sof shaklda ajratilgan. Seritsinning IQ va UB-spektrometrik tahlillari o'tkazildi. Seritsin oqsilidagi aminokislotalar miqdorini o'rganish yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi yordamida amalga oshirildi.

Kalit so'zlar: Ipak, fibroin, seritsin, Louri, spektrometriya, xromatografiya.

Введение. Шелк, коконное волокно - это тонкое, прочное, блестящее, волокно, которое представляет собой натуральное текстильное сырье, образованное из жидкости, которая выходит из двух шелковых желез тутового шелкопряда. Шелк состоит из двух нелипких, покрытых серицином и склеенных волокон, которые окружают кокон тутового шелкопряда. Шелк содержит два типа белков, фиброин и серицин [1].

Содержание серицина в волокне шелка-сырца составляет 20-30%. Он состоит из 18 аминокислот. Есть разные способы отделить серицин от шелка. Растворимость, молекулярная масса и восстановление желеобразных свойств серицина зависят от методов обработки. Серицин используется как высокопотенциальный биоматериал, широко используемый в медицине, фармацевтике, косметике, биосорбентах и других областях. Серицин очень подходит для биомедицинских и фармацевтических применений [1].

В фармацевтической промышленности эффективно использование белка серицина вместо ϵ -аминоэнановой кислоты, которая играет важную роль в производстве антикоагулянтов [9].

Белок серицин также широко используется в производстве косметики, кремов, шампуней и масок для лица [4].

Серицин имеет структуру, аналогичную фиброину, за исключением того, что он более растворим в горячей воде, чем фиброин. Благодаря многополярным группам в молекуле хорошая гидратация ослабляет межмолекулярные связи, вызывая набухание и растворение.

Растворенная молекула серицина переходит из структуры в глобулярное состояние [5].

Серицин состоит из полярной боковой цепи, состоящей из гидроксильных, карбоксильных и аминоксильных групп, которые позволяют формировать улучшенные биоразлагаемые материалы путем сшивания, сополимеризации и смешивания с другими полимерами [8].

Некоторые ученые разделили капсулу кокона на два класса: α -серицин и β -серицин. Наружная оболочка капсулы состоит из α -серицина и внутреннего слоя из β -серицина. β -серицин содержит меньше С и Н и больше Н и О, чем β -серицин. Растворимость α -серицина выше, чем растворимость β -серицина в горячей воде [10].

Целью. Целью этого исследования был выбор наиболее подходящий метода отделения белка серицина от шелка, проведение ИК-спектра анализа серицина и изучение белка серицина с помощью УФ-спектрофотометрии.

Материалы и методы: Получения белка серицина из шелка водной экстракцией.

Серицин нерастворим в спирте, эфире, ацетоне, бензоле и подобных растворителях, но растворим в воде, водных растворах щелочей и кислот. меньше, чем pH=4 [12].

Мы выбрали метод водной экстракции, как наиболее простой и эффективный метод выделения серицина, при этом суть метода объясняется следующим образом.

Вода попадает в серицин, вызывая его набухание, отделение и частичное таяние. Плавление серицина объясняется большим количеством полярных групп в его цепи.

(-NH, -NH₂, -OH, -COOH).

Серицин не имеет критической температуры плавления, он состоит из полидисперсных молекул [13].

Верхние слои кокона содержат более короткие и более длинные внутренние молекулы серицина, поэтому серицин в верхних слоях кокона начинает таять при 70 °С. Внутренние слои плавятся при 80 °С и выше. Равномерное распределение полярных групп в элементной цепи серицина значительно облегчает гидратацию и разрыв отдельных частей цепей [14].

Светорастворимость серицина определяется количеством веществ, выделяемых при кипячении оболочки в воде в течение 7,5 мин. Это обычно называется температурой плавления серицина и определяется по следующей формуле.

$$P = \frac{m_0 - m_b}{m_0} \cdot 100$$

где: m_b - масса высушенной скорлупы после кипячения;

m_0 - масса сухой корочки до закипания.

Определение количества общих белков. Метод Лоури был использован для определения общего содержания белка в растворах, полученных из шелка под воздействием четырех различных температур [17]. Образцы с цветовой реакцией обнаруживаются на современном спектрофотометре при длине волны 670 nm. Результаты представлены в табличной форме ниже:

ИК-спектрофотометрия. ИК-спектры серицин снимались на ИК- спектрофотометре Инфракрасный Фурье-спектрометр «IRTracer-100» (SHIMADZU CORP., Япония, 2017) в комплекте с приставкой нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) MIRacle-10 с призмой diamond/ZnSe (спектральный диапазон по шкале волновых чисел - 4000÷400 см⁻¹; разрешение - 4 см⁻¹, чувствительность соотношение сигнал/шум - 60,000:1; скорость сканирования - 20 спектров в секунду).

УФ - спектрофотометрия. Измеряли 10 мг белка серицина, добавляли 10 мг воды, растворяли в ультразвуковой водяной бане в течение 5 минут и исследовали состав на спектрофотометре UV-1280 UV-VIS при длине волны 400 nm.

Анализ ВЭЖХ ФТК-производных аминокислот. Синтез ФТК (фенилтиокарбонил) производных аминокислот проводили по методу Steven A., Cohen Daviel

Идентификацию ФТК-аминокислот проводят на хроматографе Agilent Technologies 1200 на колонке 75x4.6 mm Discovery HS C18. Раствор А: 0,14М CH₃COONa + 0,05% ТЭА pH 6,4, В:CH₃CN. Скорость потока 1,2 мл/мин, поглощение 269nm. Градиент %В/мин: 1-6%/0-2,5мин; 6-30%/2,51-40мин; 30-60%/40,1-45мин; 60-60%/45,1-50мин; 60-0%/50,1-55мин.

Результаты и наблюдение. Температура плавления серицина составляет 12-15%, в зависимости от породы тутового шелкопряда и исходного метода обработки коконов. Он варьируется даже в пределах одной партии коконов. Средняя растворимость серии из 50 скорлуп коконов составляет 4,39%. Температура плавления отдельных серий оболочек коконов колеблется от 2,51 до 6,29% [15]. Шелк полностью лишен серицина при кипячении в воде при 100 °С в течение одного часа. При понижении температуры и повышении концентрации водного раствора серицина превращается из золя (коллоидного раствора) в гель, то есть желатинизируется.

Таблица 1.

Зависимость температуры и продолжительности выдержки в воде от плавления и набухания корки относительно исходной массы, %

Непрерывный увлажнение, мин	Температура воды, °С							
	45-50		65-70		90-95		Кипения	
	зыбь	таяние	зыбь	таяние	зыбь	таяние	зыбь	таяние
1	-	-	-	-	86.1	2.29	123.7	4.77
3	43.4	0.79	46.4	2.06	86.9	3.15	106.2	5.46
5	42.4	0.97	49.6	2.52	96.6	4.23	101.8	5.23
10	49.3	1.21	58.4	2.12	107.7	4.18	105.6	7.21
30	53.5	1.28	62.3	2.87	-	-	93.1	8.51

Результаты электрофотометрических исследований и изучения концентрации растворов и интенсивности светорассеяния показали, что серицин во внешнем слое оболочки лучше растворяется, чем во внутреннем слое. Серицин во внешнем слое состоит из части крупных молекул, а внутренний слой состоит из части более низких молекул.

Общее количество белков. Растворы композиции шелка, подвергнутые воздействию четырех различных температур, окрашивали с использованием методом Лоури для количественного анализа белков, а общее содержание белка измеряли на спектрофотометре UV-VIS.

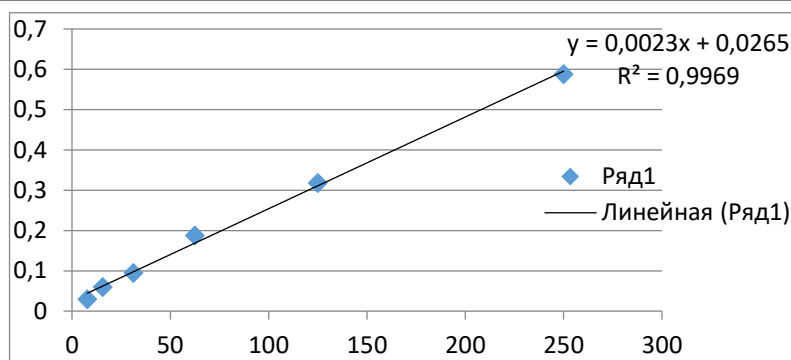


Рис 1. Калибровочная кривая для определения количества белка по методу Лоури.

Таблица 2.

Общее количество белка в полученных образцах

Образцы:	Количество мкг/мл
образец контроль	0,00
образец 1 (45-50 °C)	214,9
образец 2 (65-70 °C)	363,6
образец 3 (90-95 °C)	680,4
Точка кипения	793,9

Результаты ИК-спектр белка серицина. Частоты колебаний валентности, принадлежащие группам NH, наблюдались в серицине при 3431-3339 см^{-1} . Частоты валентных колебаний, принадлежащие группам C = O в молекуле, наблюдались при 1678 см^{-1} . При 1593 см^{-1} наблюдалась вибрация, соответствующая частоте деформационных колебаний групп NH_2 . При 1464 см^{-1} частоты деформации, принадлежащие метиленовым группам ($-\text{CH}_2-$), проявлялись в интенсивном состоянии частоты колебаний, соответствующие связям N-C в молекуле серицина, наблюдались с умеренной интенсивностью при 1153-1064 см^{-1} .

Кроме того, колебательные частоты, соответствующие четырем чередующимся производным бензола, наблюдались в областях 787-706 см^{-1} рис. 1

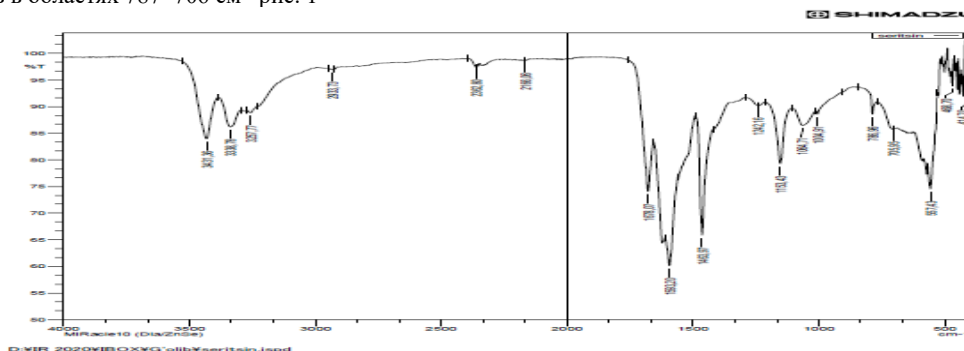


Рис 2. ИК-спектр белка серицина

Результаты УФ-спектр белка серицина. Из литературы известно, что полосы, принадлежащие хромофорным группам в белке серицина, показывают очень низкую линию поглощения. $\pi \rightarrow \pi^*$ и $n \rightarrow \pi^*$ - полосы, возникающие в результате электронных переходов. Рис. 2.

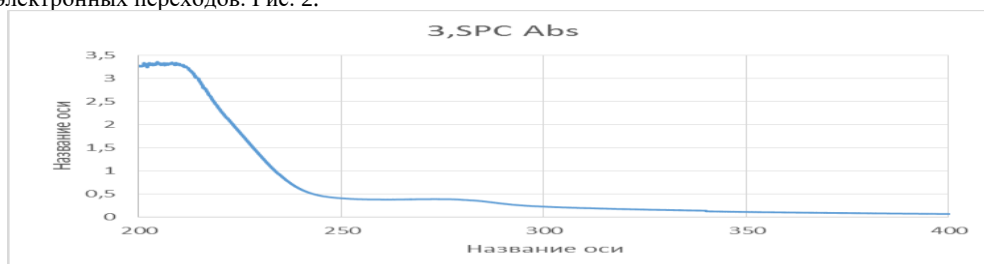


Рис. 3. УФ-спектральный анализ белка серицина.

Результаты исследования количества аминокислот в белке серицина

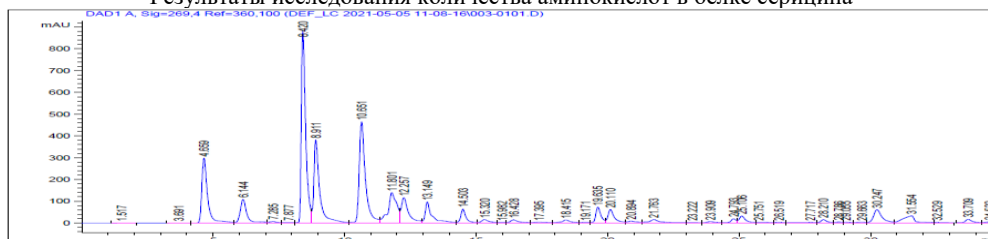


Рис. 4. Анализ ВЭЖХ ФТК-производных аминокислот.

Полученные результаты :

Таблица 3.

Аминокислоты	Концентрации аминокислот (мг/гр)
Аспарагиновая к-та	74,4733
Глутаминовая к-та	38,02548
Серин	124,8733
Глицин	67,66889
Аспарагин	0
Глутамин	0
Цистеин	22,57732
Треонин	66,94187
Аргенин	30,23438
Аланин	15,51818
Пролин	7,235063
Тирозин	23,56349
Валин	13,56771
Метионин	10,85398
Изолейцин	7,181743
Лейцин	8,274313
Гистидин	2,539063
Триптофан	0
Фенилаланин	39,9443
Лизин HCl	12,01273
Итого	565,4851

Было обнаружено, что белок серицин содержит в основном большое количество аминокислоты серина. Кроме того, было обнаружено, что глицин и треонин значительно выше, чем другие аминокислоты.

Вывод. В этом исследовании мы выделили белок серицин из шелка путем водной экстракции. Мы обнаружили, что температура воды имеет прямое влияние на высвобождение серицина и других водорастворимых биохимических веществ в шелке. Мы провели различные спектральные анализы белка серицина, выделенного в чистом виде. В заключение можно сказать следующее:

1. Белок серицин представляет собой смесь по крайней мере двух модификаций в водном растворе. Они разделены на фракционированные отложения.

2. Серицин - амфотерное вещество с химической точки зрения. Изoeлектрическая точка серицина составляет 4,3 при pH=3,9, что указывает на высокую кислотность серицина.

3. Серная кислота, соли (сульфат меди, хлорид железа), фосфор вольфрама, молибденовая фосфорная кислота коагулируют из водных растворов под действием спирта, ацетона и др.

4. Белок серицин экономичен, учитывая, что сырье для выделения серицина недорого и в дефиците.

5. Серицин широко используется в фармацевтической промышленности, а также в производстве косметики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rajput S. K. and Mukesh Kumar. Singh Sericin – A Unique Biomaterial. IOSR Journal of Polymer and Textile Engineering (IOSR-JPTE) e-ISSN: 2348-019X, p-ISSN: 2348-0181, Volume 2, Issue 3 (May - Jun. 2015), PP 29-35.
2. Padamwar M.N and Pawar A.P, Silk Sericin and its application, Journal of Scientific & Industrial Research, vol. 63, April 2004, pp 323-329.
3. Komatsu K, silk(its formation, structure, character and utilization), the polymeric materials encyclopedia (CRC Press) 1996.
4. Wu J,-H, Wang Z, & Xu S,-Y, (2007). Preparation and characterization of sericin powder extracted from silk industry wastewater. Food chemistry, 103, 1255-1262.
5. Gulrajani M.L. (2005) Sericin: A bio-molecule of value. Souvenir 20th congress of the International sericulture commission, Bangalore, India 15-18th December 2005. Pp. 21-29.
6. Takasu Y, Yamada H., Tsubouchi K., 2002. Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, bombyxmori. Bombyx mori, bioscience, biotech, biochem., 66, 2715-2718.
7. Park C.J.; Ryoo J.; Ki, C.S.; Kim, J.W.; Kim I.S.; Bae D.G.; Um, I.C. Effect of molecular weight on the structure and mechanical properties of silk sericin gel, film, and sponge. Int. J. Biol. Macromol. 2018, 119, 821–832.
8. Wang, R.; Zhu, Y.; Shi, Z.; Jiang, W.; Liu, X.; Ni, Q.-Q. Degumming of raw silk via steam treatment.
9. J. Clean. Prod. 2018, 203, 492–497. [CrossRef].
10. Craig, C.L. Evolution of arthropod silks. Annu. Rev. Entomol. 1997, 42, 231–267. [CrossRef].
11. Ude A.; Eshkoor R.; Zulkifili R.; Ari_n, A.; Dzuraidah, A.; Azhari C. Bombyx mori silk fibre and its composite: A review of contemporary developments. Mater. Des. 2014, 57, 298–305 [CrossRef].
12. Kundu S.C.; Dash B.C.; Dash R.; Kaplan D.L. Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: Potential for biomedical and biotechnological applications. Prog. Polym. Sci. 2008, 33, 998–1012.[CrossRef].