

УДК 664.959(043.3)

Применение процесса ультрафильтрации для очистки хондроитинсульфатов, выделенных из морских гидробионтов

М.Н. Порцель¹, В.Ю. Новиков¹, И.Н. Коновалова¹, Н.М. Путинцев¹,
Е.В. Шошина²

¹ Технологический факультет МГТУ, кафедра химии

² Биологический факультет МГТУ, кафедра биологии

Аннотация. Разработана технология очистки хондроитинсульфата от белковых и низкомолекулярных загрязнений с применением процесса ультрафильтрации. Использование явления полиэлектролитного набухания хондроитинсульфата в растворе и разделение хондроитинсульфата и загрязнений на мембранах даёт возможность получать обессоленный полисахарид с заданным диапазоном молекулярной массы, с высокой степенью очистки от примесей белка и аминокислот.

Abstract. The technology of purification of the chondroitin sulfate from low molecular weight protein contaminants using ultrafiltration process has been worked out. Using polyelectrolyte swelling effect in a solution of chondroitin sulfate, and the separation of contaminants on the membranes makes it possible to obtain demineralized polysaccharide with a given range of molecular weight and a high degree of purification from protein and amino acids impurities.

Ключевые слова: хондроитинсульфат, ультрафильтрация
Key words: chondroitin sulfate, ultrafiltration

1. Введение

Сульфатированный полисахарид хондроитинсульфат содержится главным образом в хрящевой ткани. Макромолекулы хондроитинсульфата состоят из чередующихся звеньев N-ацетил-галактозамина и глюкуроновой кислоты (Nadanaka, 1999). Свойства хондроитинсульфата определяют упругость и эластичность хрящевой ткани. Препараты, содержащие хондроитинсульфат, широко используются при лечении заболеваний суставов и позвоночника (Deal, Moskowitz, 1999; Hardingham, 1998; Bana et al., 2006). В настоящее время коммерческие препараты хондроитинсульфата получают из хрящевой ткани млекопитающих. В некоторых регионах земного шара в качестве сырья используют ткани гидробионтов (Takai, Kono, 2003; Jo, 2005).

Известные технологии получения хондроитинсульфта включают стадии растворения хряща в щелочной среде, ферментативный гидролиз, осаждения полисахарида из раствора и сушки. Технология реализуется по-разному: изменяется последовательность, количество операций, температурные режимы, природа и концентрации используемых реагентов (Takai, Kono, 2003; Tadashi, 2004; Khare et al., 2004).

Для промышленного получения хондроитинсульфата авторами предложен процесс мембранного разделения (ультрафильтрации) для очистки хондроитинсульфата от белковых и других примесей (солей, аминокислот, низкомолекулярных пептидов). Изменяя ионную силу раствора и, соответственно, гидродинамический радиус макромолекулы, можно добиться удержания молекул хондроитинсульфата на мембране, либо проникновения полисахарида через её поры. Мембраны с большим молекулярно-массовым порогом задерживания способны разделить хондроитинсульфат и белковые молекулы, с меньшим – обеспечить обессоливание раствора и очистку от низкомолекулярных примесей, таких как аминокислоты.

2. Материалы и методы

Подготовленное сырье, хрящевую ткань сёмги, измельчали и загружали в реакционную емкость, в которой проводили щелочной, затем ферментативный гидролиз.

Растворение щелочерастворимых веществ, включая белки и хондроитинсульфат, проводили в растворе NaOH с концентрацией 0,2 моль/дм³ при температуре 50 °С в течение 3 часов при постоянном перемешивании. Такие условия щелочного гидролиза позволяют предотвратить разрушение хондроитинсульфата.

После окончания щелочного гидролиза смесь нейтрализовали до pH 7 и отделяли нерастворившийся осадок фильтрованием или центрифугированием.

Проведение щелочного гидролиза способствует отделению нерастворившихся примесей и, как следствие, позволяет получить более чистый хондроитинсульфат и увеличить его выход.

В полученный после щелочной обработки и нейтрализации раствор добавляли ферментный препарат (ФП) или предварительно приготовленный раствор ФП, полученный из гепатопанкреаса камчатского краба, по технологии, разработанной в ПИНРО (г. Мурманск). Ферментативный гидролиз белков проводили при оптимальных для данного ФП температуре инкубационной смеси и продолжительности обработки (при использовании ФП из гепатопанкреаса камчатского краба – температура от 45 до 55 °С, продолжительность гидролиза от 4 до 8 ч). Ферменты, обладающие протеолитической активностью, не оказывают влияния на хондроитинсульфат, содержащийся в гидролизате. Твердый осадок, полученный после ферментализации, отделяли. Полученный после щелочной и ферментативной обработки сырья гидролизат хрящевой ткани содержит продукты расщепления белков, соли, высокомолекулярные полисахариды (хондроитинсульфат, гиалуроновую кислоту, дерматан сульфат, кератан сульфат).

Для разделения смеси солей, аминокислот, низкомолекулярных пептидов и целевого полисахарида – хондроитинсульфата, содержащихся в гидролизате хрящевой ткани, использовали процесс ультрафильтрации на мембранах с различными молекулярно-массовыми пределами задерживания. В работе использовали установку ультрафильтрационную полуволоконную УП-1 НПП 225000, насос шланговый БНШ-600.15, сменные полуволоконные аппараты: УВА-50 ПА и УВА-5 ПА. На рис. 1 приведена схема аппарата для ультрафильтрации.

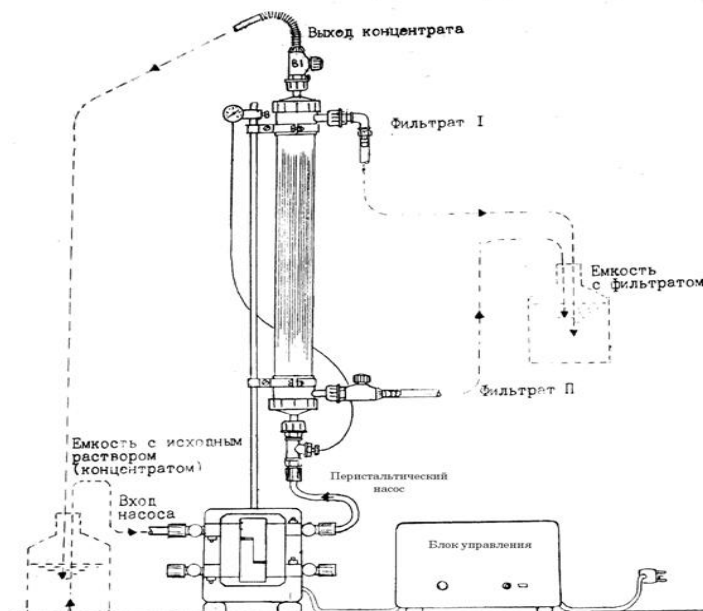


Рис. 1. Схема аппарата для ультрафильтрации

Процесс ультрафильтрации на мембранах состоял из трёх стадий. На первой стадии раствор пропускали через ультрафильтрационную мембрану с молекулярно-массовым пределом задерживания менее 50 кДа для отделения оставшихся после гидролиза высокомолекулярных белков и взвешенных частиц. После этого полученный раствор хондроитинсульфата, низкомолекулярных пептидов, аминокислот и солей разделяли на мембране с молекулярно-массовым пределом задерживания 5 кДа, обеспечивающей задержание молекул хондроитинсульфата и отделение молекул солей, аминокислот и низкомолекулярных пептидов.

Методом дисперсии светорассеяния был определен гидродинамический радиус макромолекул хондроитинсульфата из хрящей сёмги (Деркач, 2003). Было установлено, что при концентрации NaCl 0,001 моль/дм³ молекулы хондроитинсульфата изменяют гидродинамический радиус. Так, гидродинамический радиус молекулы хондроитинсульфата в дистиллированной воде составляет 457 нм, после введения NaCl с концентрацией 0,05 моль/дм³ – 376 нм. Таким образом, максимальный гидродинамический радиус молекул хондроитинсульфата наблюдается в дистиллированной воде, поэтому удержанный на мембране с молекулярно-массовым пределом задерживания 5 кДа раствор хондроитинсульфата промывали дистиллированной водой. В результате этой операции концентрация соли

снижается, и поэтому значительно увеличивается гидродинамический радиус молекулы хондроитинсульфата. Полученный раствор переносится на мембрану с молекулярно-массовым пределом задерживания 50 кДа, где высокомолекулярные фракции хондроитинсульфата концентрируются, а низкомолекулярные пептиды и аминокислоты проходят через неё. Сконцентрированный на этой мембране раствор хондроитинсульфата далее использовали для выделения сухого препарата хондроитинсульфата. Выделение сухого хондроитинсульфата из концентрированного раствора проводили методом осаждения при добавлении к раствору избытка осадителя – этилового спирта с концентрацией 96 %.

Осаждение хондроитинсульфата из раствора проводили не менее 20 часов при температуре -20 ± 2 °С. Нерастворимый в этаноле хондроитинсульфат начинает выпадать в осадок сразу после добавления этанола. Для извлечения осадка использовали центрифугу Beckman, скорость центрифуги – 5000 с^{-1} , температура – минус 3 °С.

Осадок представлял собой густую тягучую субстанцию кремового цвета. Сушка осадка проводилась в сушильном шкафу при температуре 60 ± 5 °С до постоянной массы.

3. Результаты и обсуждение

Полученный по ультрафильтрационной технологии хондроитинсульфат из хрящей сёмги сравнивали с хондроитинсульфатом, полученным по известной технологии (Takai, Kono, 2003). Для сравнения были выбраны следующие показатели: молекулярно-массовое распределение, среднемассовая молекулярная масса (ММ), оптическая ($[\alpha]_D^{20}$) и поверхностная активность (G) растворов хондроитинсульфата. В табл. 1 приведены значения этих параметров.

Таблица 1. Среднемассовая молекулярная масса, оптическая и поверхностная активность хондроитинсульфата, полученного по известной технологии и по разработанной мембранной технологии

| Показатель | Известная технология | Технология, включающая ультрафильтрационную очистку |
|-------------------------------|----------------------|---|
| ММ, кДа | 60 | 100 |
| $[\alpha]_D^{20}$, ° | -30,4 | -20,5 |
| G, Дж×м/моль ×10 ³ | 55,9 | 22,5 |

Снижение поверхностной активности раствора хондроитинсульфата, полученного с применением процесса очистки на ультрафильтрационных мембранах, по сравнению с G образцов, полученных по известной технологии, обусловлено, по-видимому, уменьшением количества остаточного белка в препарате. Ранее было установлено, что хондроитинсульфат, полученный из сёмги, может содержать А и С модификации хондроитинсульфата (Крылов и др., 2011). Величина удельной оптической активности образца хондроитинсульфата, выделенного с помощью ультрафильтрации, имеет значения, близкие к $[\alpha]_D^{20}$ для чистого препарата хондроитинсульфата С (от -12 до -18°) (Komano, 1962). Отклонение $[\alpha]_D^{20}$ от этих значений по всей видимости обусловлено наличием в полученном препарате некоторого количества хондроитинсульфата А (для него $[\alpha]_D^{20}$ составляет от -28 до -32°) (Komano, 1962). В полученном препарате хондроитинсульфата возможно также наличие мономеров – N-ацетил-галактозамина и глюкуроновой кислоты, которые также влияют на величину $[\alpha]_D^{20}$.

На рис. 2 приведены молекулярно-массовые распределения хондроитинсульфата, полученного по известной технологии и с применением процесса ультрафильтрации.

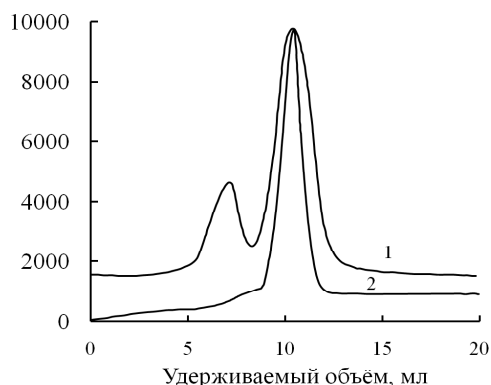


Рис. 2. Молекулярно-массовое распределение хондроитинсульфата, полученного разными способами; 1 – по известной технологии, 2 – с применением ультрафильтрации

Хондроитинсульфат, полученный по технологии с использованием ультрафильтрации, характеризуется более узким молекулярно-массовым распределением. Диапазон молекулярно-массового распределения в данном случае можно контролировать на стадии мембранной обработки.

Характеристики хондроитинсульфата, полученного из хрящевой ткани сёмги по разработанной технологии, в соответствии требованиями ТУ "Хондроитинсульфат из тканей морских гидробионтов. Полуфабрикат" приведены в табл. 2.

Таблица 2. Характеристика хондроитинсульфата, полученного по разработанной технологии

| Наименование показателя | Требования ТУ 928013-00472182-11 | Значение показателя |
|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|
| Массовая доля воды, % не более | 10 | 9±0,5 |
| Массовая доля ХС, % не менее | 70 | 75±5 |
| Массовая доля сульфатов, % не менее | 15 | 17±2 |

4. Выводы

Показано, что с помощью ультрафильтрационных мембран повышается степень очистки хондроитинсульфата, полученного из хрящевой ткани сёмги. Установлено, что макромолекулы хондроитинсульфата в значительной степени способны изменять гидродинамический радиус при изменении ионной силы раствора (например, при изменении концентрации NaCl). Высокая степень очистки хондроитинсульфата от примесей достигается путем последовательного пропускания гидролизата, полученного из хрящевой ткани морских гидробионтов, через мембраны, имеющие различный молекулярно-массовый предел задерживания.

Научно-исследовательская работа выполнена в рамках реализации ФЦП "Научные и научно-исследовательские кадры инновационной России на 2009-2013 гг."

Литература

- Bana G., Jamard B., Verrouil E., Mazieres B.** Chondroitin sulfate in the management of hip and knee osteoarthritis: An overview. *Advances in Pharmacology*, N 53, p.507-522, 2006.
- Deal C.L., Moskowitz R.W.** Nutraceuticals as therapeutic agents in osteoarthritis. The role of glucosamine, chondroitin sulfate and collagen hydrolysate. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, v.25, N 2, p.379-395, 1999.
- Hardingham T.** Chondroitin sulfate and joint disease. *Osteoarthritis and Cartilage*, N 6 (suppl. A), p.3-5, 1998.
- Jo J.-H.** Optimization of shark (*Squatina oculata*) cartilage hydrolysis for the preparation of chondroitin sulfate. *The Food Science and Biotechnology*, N 14 (5), p.651-655, 2005.
- Khare A., Houliston S., Black T.** Isolating chondroitin sulfate. Patent US 20040146993A1. МПК C12P019/30; A61K031/737. № 10/704866; заявл. 10.10.2003; опубл.: 29.07.2004.
- Komano T.** Studies on the chemical structure of mucopolysaccharides. *Kyoto, Kyoto University*, p.106, 1962.
- Nadanaka S.** Chondroitin sulfate: structure, function, and biosynthesis. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, N 11, p.233-238, 1999.
- Tadashi E.** Sodium chondroitin sulfate, chondroitin-sulfate-containing material and processes for producing the same. Patent WO/2004/039994, МПК A61K 47/36. № 2002-319418; заявл. 01.11.2002; опубл. 13.05.2004.
- Takai M., Kono H.** Salmon-origin chondroitin sulfate. Patent US 20030162744, МПК A61K 031/737, C08B 037/00. № 220539; заявл. 17.12.2002; опубл. 28.08.2003.
- Деркач С.Р.** Нефелометрический метод анализа. Метод. указания к лабораторным работам по курсу коллоидной химии. *Мурманск, МГТУ*, 23 с., 2003.
- Крылов В.Б., Грачев А.А., Устюжанина Н.Е., Ушакова Н.А., Преображенская М.Е., Козлова Н.И., Порцель М.Н., Коновалова И.Н., Новиков В.Ю., Зиеберт Х.Х., Шашков А.С., Нифантьев Н.Э.** Предварительная структурная характеристика, противовоспалительная и антикоагулянтная активности хондроитинсульфатов из хрящей морских рыб. *Изв. акад. наук, Сер. Химия*, № 4, с.731-738, 2011.