КУРСОВАЯ РАБОТА

на тему: **«Получение сорбционных материалов**

**с биогенными элементами».**

Выполнила студентка МБХФ отд. химия

5 курса группы Бекдурдыева К.

Научный руководитель

к.б.н. Филь А.А.

**СОДЕРЖАНИЕ**

Введение 3

Теоретическая часть

1.1. Особенности органических полимерных носителей, используемых для иммобилизации биологически активных веществ 5

1.2. Модифицирование поверхности твердых носителей макромолекулами биополимеров 10

1.3. Использование сорбционных материалов в медицине и медицинской промышленности 14

Методическая часть

2.1.Характеристика реагентов используемых для получения 18

сорбентов

2.2. Получение казеина 18

2.3. Метод определения удельной адсорбции энтеросорбента по иону кобальта (II) 19

Экспериментальная часть

3.1. Синтез энтеросорбентов 20

3.2. Исследования сорбционной емкости разработанных сорбентов относительно ионов кобальта (II) 24

Заключение 26

Список используемой литературы 27

**Введение**

 Одно из основных направлений биотехнологии предусматривает разработку сорбционных материалов и дальнейшее их применение в биохимии (разделение и очистка веществ), экологии (мониторинг окружающей среды), в медицине и медицинской промышленности в качестве незаменимых материалов для гемо - и энтеросорбции.

 Метод энтеросорбции начал активно соперничать с гемосорбцией (управляемое выделение из крови нежелательных компонентов-токсинов, экзогенных ядов, вредных продуктов метаболизма) в связи с рядом преимуществ, основными из которых являются:

* отсутствие необходимости оперативного вмешательства и связанного с этим риска возможных осложнений, характерных для гемосорбции;
* отсутствие прямого повреждающего контакта с биологическими жидкостями (кровь, лимфа);
* возможность широкого использования сорбционной терапии при амбулаторном лечении в полевых и обычных домашних условиях.

В связи с высокими требованиями к чистоте биотехнологических продуктов все более актуальной становится задача использования новых сорбционных материалов в хроматографии. Ключевым моментом в этом вопросе является создание механически стабильных сорбентов, способных обеспечивать высокий выход биологически активных целевых продуктов и обладающих способностью к многократному использованию.

 Для решения выше изложенных задач наиболее перспективными являются энтеросорбенты, например белки, которые в организме высших животных выполняют транспортные функции. Белки, являясь полисорбентами из-за присутствия большого числа возможных центров связывания, расположенных в боковых радикалах аминокислот обладают вместе с тем определенной специфичностью. Блокирование отдельных функциональных групп белков посредством использования растворов с блокираторами (ингибиторами или лигандами), а так же иммобилизация их на жесткой матрице позволит получить энтеросорбенты обладающие специфичностью, стабильностью и высокой сорбционной емкостью.

 Таким образом, цель данной научно-исследовательской работы - разработка биотехнологии сорбционных материалов на основе белковых систем, иммобилизованных на жесткой матрице с введением в них биогенных элементов.

 В связи с поставленной целью нами решались следующие задачи:

- синтез сорбента на основе микрокристаллической целлюлозы, модифицированной белковым комплексом казеина;

- исследование сорбционных свойств разработанных сорбентов на примере ионов кобальта (II);

**Теоретическая часть**

**1.1. Особенности органических полимерных носителей, используемых для иммобилизации биологически активных веществ**

Целлюлоза – наиболее высокомолекулярный полисахарид, линейный β-1,4-глюкан (С6Н10О5)n с видовой специфичностью и степенью полимеризации [23].

Дополнительные данные, полученные методами частичного гидролиза и ацидолиза [11] позволяют утверждать, что вероятность появления других типов связей в молекуле целлюлозы не превышают одной связи на 1000 моноглюкозидных звеньев. Степень полимеризации природных препаратов целлюлозы, полученных в мягких условиях, может превышать 10000, что соответствует уровню значений молекулярной массы порядка 106 [24].. При более жестких режимах обработки, имеющих место при выделении целлюлозы из древесины, величина степени полимеризации существенно падает и обычно колеблется в пределах 300-5500 [4], приводя к соответствующему снижению среднего значения молекулярной массы.

Анализ экспериментальных теплот сгорания свидетельствует о физической и химической неоднородности целлюлозы. Химическая неоднородность обусловлена в основном наличием в макромолекулах целлюлозы “чужих” звеньев, представляющих собой остатки изомерных полисахаридов (маннана, галактана) или окисленных фрагментов полимерной цепи [19].. Физическая же неоднородность вызвана главным образом адсорбированной водой [17].

Для целлюлозы характерны высокая степень гидрофильности и склонность к образованию многочисленных водородных связей между нитями полимеров. Наличие множества гидроксильных групп позволяет легко модифицировать целлюлозу путем химического присоединения разнообразных заместителей (таблица 1). Так известен способ получения иммуносорбента, включающий обработку пористых целлюлозных шариков метапериодатом натрия [10]. В результате обработки на поверхности сорбента образуются альдегидные группы, количество которых не снижается при хранении в течение двух лет. Авторы [9] предложили получать сорбент путем хлорирования целлюлозного волокнистого материала хлорокисью фосфата в среде диметилформамида при нагревании. Данный носитель может найти применение при очистке сточных вод, фармакологических растворов от тяжелых металлов, а также для концентрирования тяжелых металлов при анализе объектов окружающей среды.

Особый интерес представляет введение в макромолекулу целлюлозы или других полисахаридов сульфгидрильной группы, что придает препаратам целлюлозы электронно-обменные свойства. Были также синтезированы производные, содержащие хлор, йод, нитрильные, амидные и алифатические аминогруппы [15].

Предложен способ [20] модификации полисахаридов обработкой диизоцианатами с последующей дополнительной обработкой бифункциональными или монофункциональными соединениями в стехиометрическом избытке. В качестве бифункциональных соединений используют алифатические диамины и дикарбоновые кислоты С2-С8, а в качестве монофункциональных соединений – алифатические спирты С2-С8.

В качестве нерастворимого полисахарида применяли целлюлозу, агарозу, декстран, хитин, крахмал и их производные в виде порошков или гранул. Реакция с диизоцианатом проводилась в безводных органических растворителях, не содержащих подвижных атомов водорода, например, в диоксане, ацетоне, хлороформе. В зависимости от длины алифатической цепочки получали носители с различной отдаленностью функциональных групп (-NH2, СООН и др.) от полисахаридной матрицы.

Таблица 1

Некоторые производные целлюлозы

|  |  |
| --- | --- |
| Заместитель по ОН-группе | Название препарата |
| O(CH2)2NH2 | Аминоэтилцеллюлоза |
| OPO3H | Фосфорилцеллюлоза |
| O(CH2)2N(C2H5)2 | Диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ) |
| OCH2COOH | Карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) |
| OCO⎯C6H4⎯NH2 | п-Аминобензоилцеллюлоза |
| OCOCH2Br | Бромацетилцеллюлоза |
| OCH2CONHNH2 | Гидразидкарбоксиметилцеллюлоза |
| O(CH2)2SO3H | Сульфоэтилцеллюлоза |

Вместе с тем сама целлюлоза химически достаточно инертна и не вступает в реакцию с белками, нуклеиновыми кислотами и их компонентами. Этого нельзя сказать о возможности сорбции биологических молекул на целлюлозе [5]. Целлюлоза неустойчива к воздействию сильных кислот, щелочей и окислителей. Рабочий интервал рН составляет 3-10. Целлюлоза охотно атакуется микроорганизмами даже на холоду, поэтому ее водные суспензии хранят в присутствии антисептиков.

Согласно результатов рентгенографических исследований микрофибрилла целлюлозы образована протяженными, высококристаллическими элементарными фибриллами, находящимися в своеобразной матрице из значительно менее упорядоченных макромолекулярных образований. Водородные связи между линейными цепями целлюлозы на отдельных участках могут образовывать псевдокристаллические структуры, которые чередуются с более рыхлыми, аморфными областями – “порами”. Так формируются макроскопические нити целлюлозы, легко набухающие в поперечном направлении. “Кристаллические” участки мало доступны для присоединения модифицирующих заместителей, которые из-за этого располагаются главным образом на поверхности нитей и в порах. В целом получается микрогетерогенная структура, характер которой зависит от исходного материала и технологии обработки целлюлозы.

Весьма существенно влияние сушки на свойства целлюлозы. При удалении воды образуется множество дополнительных водородных связей на аморфных участках матрицы, так что объем пор резко уменьшается.

Для повышения жесткости проводят частичный кислотный гидролиз целлюлозы, разрушающий аморфные участки матрицы. На место разрушенных аморфных участков для сохранения пористости между “кристаллическими” участками вводят химические сшивки, одновременно увеличивая степень “кристалличности” и размеры пор. Такая микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) помимо повышенной жесткости, более гомогенна, что обеспечивает более высокую по сравнению с обычной (волокнистой) целлюлозой сорбционную емкость. Существуют различные способы гидролиза целлюлозы. В работе Брыляков В.М., Хасанханова М.Н., Шаповалов О.И. (1974) с целью повышения выхода и качества сорбента обработку целлюлозы раствором кислоты проводили в присутствии 40-70% раствора диметилсульфоксида. Другие авторы предлагают обработку целлюлозного сырья 3-5% водным раствором азотной, серной или соляной кислоты с фракцией синтетических жирных кислот С17-С20, взятой в количестве 0,2-0,5% от массы целлюлозного сырья, при 96-98○С [12].

Высокий спрос на МКЦ в химической, фармацевтической промышленности требует расширения сырьевой базы. В работе [16] предложен способ, позволяющий повысить выход МКЦ за счет использования отходов фильтрующих материалов, производства триацетатцеллюлозной основы фотопленок, которые обрабатываются 9-12% раствором азотной кислоты в течение 6 часов с дальнейшей обработкой 12%раствором натриевой щелочи при (-7°) – (-10°)С.

С целью получения тонкодисперсной МКЦ предложен способ [18] уменьшения размеров частиц и увеличения их однородности за счет того, что целлюлозу предварительно обрабатывают 67-73% азотной кислотой, а затем – водой до образования 3-12% концентрации оставшейся в ней кислоты и выдерживают полученную систему при 18-20°С 10-20 минут. Полученную таким способом целлюлозу подвергают гидролитической деструкции при температуре кипения кислоты в течение 10-25 минут.

МКЦ по своим свойствам близка к натуральной целлюлозе, встречающейся в виде естественного компонента в пищевых продуктах, она нетоксична и совершенно безвредна, не имеет побочных явлений и противопоказаний [21]. МКЦ, как и другие пищевые волокна, действует на организм человека двумя путями: механическим и сорбционным. В желудке МКЦ впитывает жидкость, разбухает. В тонком кишечнике МКЦ очищает механическим путем его слизистую оболочку от “грязевой” пленки. Помимо этого на протяжении всего желудочно-кишечного тракта МКЦ сорбирует вредные для организма вещества, тяжелые металлы, радионуклиды и т.п. МКЦ используют при отравлении (вместо активированного угля), в целях нормализации пищеварения, при диабете, атеросклерозе, ишемической болезни сердца, гастроэнтерологических заболеваниях, для профилактики и приостановления роста новообразований, образования камней в желудочном пузыре, почках и др.

**1.2. Модифицирование поверхности твердых носителей макромолекулами биополимеров**

Белки, являясь одним из важнейших классов соединений, с химической точки зрения представляет собой высокомолекулярные соединения, состоящие из α– аминокислот. Именно этот факт послужил основой для использования их в качестве компонента для модифицирования поверхности сорбентов. Решение этого вопроса основывается на применении казеина в качестве белкового компонента для иммобилизации на твердом носителе.

Казеин – белок молока, фосфопротеин. В чистом виде представляет собой белый аморфный гигроскопический порошок без запаха и вкуса. Казеин проявляет широкий диапазон функциональных свойств, например, термостабильность, способность связывать воду, коагулировать. Кроме того, его адгезионные и поверхностно-активные свойства в большей степени обусловлены уникальным расположением гидрофобно-гидрофильных структур в молекуле белка, что играет существенную роль в вопросе иммобилизации.

Казеин состоит из смеси различных фракций, разделение которых осуществляют по степени растворимости в различных веществах при разной температуре, а также по электрофоретической подвижности (Тетин А., 1979).

Не фракционированный казеин.

Группа белков – фосфопротеиды, осаждаемая из сырого молока при подкислении его до рН 4,6 при 200С. Содержит фосфор.

Группа αS-казеинов.

Основная группа белков казеина, осаждаемая в 0,4М растворе CaCl2 при рН=7 и температуре 0 – 40С, нерастворима в 406 М растворе мочевины. Обладает наибольшей из всех фракций казеина электрофоретической подвижностью, подразделяется на αS1-,αS2- и αS0-казеины.

αS1 – основная фракция αS-казеинов, подобно β-казеину не содержит цистеина.

αS2-имеет общие свойства как с αS1-казеином, так и χ-казеином. Подобно χ-казеину αS2 содержит два остатка цистеина, но как и αS1-казеин αS2 – казеин нерастворим в присутствии ионов кальция.

αS0- содержание этой фракции около 10% содержания αS1-казеина. Структура идентична структуре αS1-казеина (исключение составляет расположение фосфатной группы).

Казеин

Группа

αS-казеинов

(43-45%)

β-Казеин

(24-35%)

Группа

γ-казеинов

(3-7%)

χ-Казеин

(8-15%)

αS1

αS2

αS0

γ1

γ2

γ3

*Содержание фракций казеина приведено в процентах от содержания общего казеина.*

β-казеин.

Фракция растворима в 4,6 М растворе мочевины, но нерастворима в 3,3 М растворе мочевины при рН 4,6. В отличие от αS1- и αS2-казеинов эта фракция растворима при низких температурах и может в значительных количествах переходить из мицелл казеина в плазму. Это наиболее гидрофобная фракция казеина.

χ-казеин.

Фракция растворима в 0,4М растворе CaCl2 при рН 7,0 и температуре 0-40С. Отличительные свойства: имеет хорошую растворимость, не осаждается ионами кальция, что объясняется наличием в его молекуле большого количества лиофильных ОН-групп. Содержит три углевода: галактозу, галактозамин и N-ацетилнейраминовую (сиаловую) кислоту.

Группа γ - казеинов.

Фракция растворима в3,3 М растворе мочевины, но нерастворима в1,7М растворе мочевины при рН 4,7 после добавления (NH4)2SO4.

 γ1-фракция идентична фрагменту β - казеина, состоящему из аминокислотных остатков в положении 29-209.

 γ2-идентичен фрагменту β - казеина, состоящему из аминокислотных остатков в положении 106-209.

 γ3-идентичен фрагменту β- казеина, состоящему из аминокислотных остатков в положении 108-209 (Дьяченко П.Ф., 1959).

В нативном казеине [3] содержится 15,4% азота и 0,11% фосфора; много незаменимых аминокислот, таких как лейцин (9,2г), лизин (8,2г), аланин (масса указана в граммах аминокислоты на 100 г белка).

В некоторых работах иммобилизацию молекул белка осуществляли на производных целлюлозы (сульфанилэтилового эфира целлюлозы, аминоэтилцеллюлозы, диальдегидцеллюлозы), поверхность которых была модифицирована глутаровым альдегидом. В качестве белка использовали инсулин, рибозофосфатизомеразу, желатину, фермент протеазу Bacillus subtilis. Полученные иммобилизованные препараты отличались стабильностью и достаточно высоким процентом сохранения активности.

Способ получения иммобилизованного осахаривающего ферментного препарата включает в себя связывание осахаривающего фермента с нерастворимым носителем с помощью глутарового альдегида.

В качестве носителя используются гранулированный казеин, а связывание осуществляли в водной среде в присутствии яичного альбумина при соотношении компонентов : носитель (0,02-0,2):1; фермент: альбумин (0,2-1,5):1; глутаровый альдегид: фермент с альбумином (0,2-0,4):1. Для иммобилизации используют аминоглюкозидазу или – амилазу. Глутаровый альдегид используют в виде 50% водного раствора. Предпочтительный размер частиц казеина составил 100-500 мкм.

Таблица 2

Содержание аминокислотных остатков

**в отдельных фракциях казеина**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Аминокислота | αS1 | β | γ | χ |
| Аспарагиновая кислота | 14-16 | 9-10 | 9 | 11-12 |
| Глутаминовая кислота | 38-41 | 37-39 | 39 | 27 |
| Гистидин | 5 | 5-6 | 6-7 | 3 |
| Аргинин | 5-6 | 4-5 | 3-4 | 5 |
| Лизин | 14-15 | 11-12 | 12 | 9 |
| Глицин | 9-10 | 5 | 5 | 3 |
| Серин | 13-14 | 13-15 | 12-13 | 12-13 |
| Треонин | 5 | 9 | 10 | 13-14 |
| Аланин | 8-9 | 5-6 | 6 | 13-14 |
| Цистин | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Метионин | 5 | 6 | 7 | 2 |
| Валин | 10-11 | 18-19 | 20 | 11 |
| Лейцин | 14-17 | 21 | 23 | 8 |
| Изолейцин | 11 | 10 | 8 | 11-12 |
| Пролин | 17-18 | 33-35 | 40-41 | 19 |
| Фенилаланин | 6-8 | 9 | 11 | 4 |
| Тирозин | 10 | 3-4 | 5 | 8 |
| Триптофан | 2 | 1 | 1 | 1 |

 Полученный ферментный препарат представляет собой гранулированный казеин, покрытый белковым слоем альбумина, проницаемым для жидкости, и в этом же слое осахаривающий фермент поперечно сшит с альбумином яйца с помощью глутарового альдегида и сохранял ферментативную активность в переделах 53-67,8%

**1.3. Использование сорбционных материалов в медицине и медицинской промышленности**

Одно из основных направлений биотехнологии предусматривает разработку сорбционных материалов и дальнейшее их применение в медицине и медицинской промышленности в качестве незаменимых материалов для гемо - и энтеросорбции.

В зависимости от того, каким комплексом характеристик обладает тот или иной сорбент проявляются его терапевтические свойства как энтеросорбента. Анализируя предъявляемые нормативными документами и клинической практикой требования к энтеросорбентам, можно выделить комплекс свойств, присущих как бы “идеальному” энтеросорбенту:

* полная безвредность и нетоксичность;
* высокая биосовместимость с тканями, кровью и другими биосубстратами организма;
* неповреждающее действие на слизистые оболочки ротовой полости, пищевода, желудочно-кишечного тракта;
* избирательная сорбция среднемолекулярных токсичных метаболитов;
* высокая адсорбционная емкость;

Проблему создания эффективного и безопасного энтеросорбента, предназначенного для очищения организма от токсических веществ (шлаков), которые продуцируются при различных заболеваниях, уже в течение многих лет решают ученые разных стран.

Энтеросорбенты — продукты, используемые для связывания метаболитов, токсинов и других веществ в пищеварительном тракте. Они перспективны при решении проблем регулирования питания человека, для снижения поступления в организм экологически вредных веществ (в том числе радионуклидов, пестицидов, тяжелых металлов), профилактики и лечения ряда заболеваний.

Разработан способ энтеросорбции из водных растворов таких вредных веществ и соединений, как формальдегид, фенол, нитраты, нитриты, ионы свинца и др., в котором в качестве энтеросорбентов использованы пищевые волокна из различного растительного сырья. Было установлено, что за процесс связывания указанных веществ ответственны положительно и отрицательно заряженные группировки лигнина, гемицеллюлоз, пектиновых и белковых веществ, входящих в состав пищевых волокон (ПВ).

Пищевые волокна представляют собой сложный комплекс биополимеров линейной и разветвленной структуры с большой молекулярной массой. Присутствие первичных и вторичных гидроксильных (целлюлоза, гемицеллюлозы), фенольных (лигнин), карбоксильных групп (гемицеллюлозы, пектиновые вещества) обусловливает межмолекулярное взаимодействие (водородные связи) различной плотности упаковки, способность сорбировать воду и другие полярные молекулы и ионы. Поэтому для ПВ характерны водоудерживающая способность, ионообменные и другие особенности. ПВ способны взаимодействуют с белками, ферментами, гормонами, продуктами распада углеводов, пептидами и аминокислотами, жирными и другими кислотами в процессе пищеварения в желудочно-кишечном тракте человека. Характер этих превращений зависит от состава ПВ, содержания в них полимеров, их строения, взаимосвязи и плотности межмолекулярной упаковки, соотношения аморфных и кристаллических участков волокон [6].

Результаты оценки сорбционной способности ПВ, выделенных из различных видов растительного сырья, показывают, что найдена новая группа энтеросорбентов, обладающих как ионитной, так и молекулярной сорбцией. Они способны связывать ионы свинца, кадмия и других тяжелых металлов, нитраты, нитриты, аммиак, радионуклиды (стронций, цезий) и целый ряд органических веществ, в том числе фенолы, формальдегид, карбамид и другие.

Если препараты полифепан, билигнин, активированный уголь рекомендуется использовать только периодически, то ПВ возможно добавлять в пищу систематически. Помимо сорбции экологически вредных веществ (ЭВВ), пищевые волокна оказывают и общее положительное действие на работу желудочно-кишечного тракта, снижают поступление в организм холестерина, используются при [6]. Концентраты ПВ, выделенные из различных видов растительного сырья, обладают разной способностью связывать ЭВВ. Очевидно, ПВ оболочек гороха, жома сахарной свеклы, жмыха семян винограда и люцерны значительно превосходят по сорбции свинца такие известные энтеросорбенты, как билигнин, полифепан, карболен. В меньшей мере они связывают нитраты, нитриты и в значительной — формальдегид, карбамид и другие вещества.

Основным сорбирующим началом в ПВ является лигнин. Эффективен комплекс целлюлозы с гемицеллюлозами. Целлюлоза обладает хорошей сорбционной способностью по отношению к нитратам, карбамиду, меньшей — к другим ЭВВ [6].

В настоящее время в биологии и медицине активно развивается учение о микроэлементозах. Медики уже давно обратили внимание на то, что многие болезни связаны с недостаточностью поступления и содержания в организме определенных макро- и микроэлементов. Микроэлементы - это группа химических элементов, которые содержатся в организме человека в очень малых количествах.

Микроэлементы являются важнейшими катализаторами различных биохимических процессов, обмена веществ, играют значительную роль в адаптации организма. Из 92 встречающихся в природе элементов 81 обнаружен в организме человека.

Одним из жизненно необходимых элементов является кобальт. Кобальт относится к числу биологически активных элементов и всегда содержится в организме человека и животных. Он оказывает существенное влияние на процессы кроветворения. Входя в состав водорастворимого витамина В12 (цианкобаламин), кобальт весьма активно влияет на поступление азотистых веществ, увеличения содержания хлорофилла и аскорбиновый кислоты. Кобальт активирует ряд ферментов, усиливает биосинтез белков и нуклеиновых кислот. Кобальт влияет на синтез мышечных белков, на миелинизацию нервных волокон. Недостаточное поступление солей кобальта в организм приводит к неполному усвоению кальция и фосфора. Он способствует включению иона железа в молекулу гемоглобина.

В отличие от некоторых других микроэлементов кобальт не может накапливаться в организме, и поэтому он постоянно должен поступать с пищей. Компенсировать недостаток кобальта можно с помощью некоторых пищевых продуктов, например винограда. Содержание кобальта в различных пищевых продуктах незначительно. Однако обычно смешанные пищевые рационы вполне удовлетворяют организм в кобальте. Кобальт содержится в незначительных количествах в мясе, рыбе, яйцах, молочных продуктах, картофеле, воде. Более богаты кобальтом печень, почки, а также свекла, горох, земляника, клубника. Суточная потребность организма человека 0,1 – 0,2 мг.

Медики убедительно показывают, что макро- и микроэлементы, поступающие с пищей, не компенсируют их дефицит в организме, и для обеспечения восполнения требуются специальные препараты - биологически активные добавки.

**Методическая часть**

**2.1.Характеристика реагентов используемых для получения**

**сорбентов**

Казеин - белок молока, фосфопротеин. В чистом виде представляет собой белый аморфный гигроскопичный порошок без запаха и вкуса, нерастворимый в воде, спирте и эфире, но растворимый в некоторых органических солях.

Из материалов органической природы нами использовался неионогенный гидрофильный полисахарид - микрокристаллическая целлюлоза производства Lachema (Chemapol, Praha-Сechoslovakia), (C6H10O5) n,  с молекулярным весом (162,14)n.

Выбор микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) в качестве носителя обусловлен, прежде всего, ее доступностью и наличием реакционно-способных групп, легко вступающих в химические реакции. МКЦ - продукт модификации природной целлюлозы, получаемый путем гидролитической деструкции.

МКЦ нерастворима в воде, но растворима в аммиачных растворах солей меди, отличается высокой гидрофильностью и хорошими сорбционными свойствами. МКЦ - легкосыпучий порошок белого цвета, по своим свойствам близка к природной целлюлозе, абсолютно безвредна и нетоксична.

**2.2. Получение казеина.**

 50 г сухого молока растирают в 450 мл воды, где уже растворено 3 г лимонной кислоты. Раствор взбивают, затем центрифугируют. Так повторяют несколько раз (отмывка). Полученный осадок высушивают в сушильном шкафу.

**2.3. Метод определения удельной адсорбции энтеросорбента по иону кобальта (II).**

Адсорбционную емкость энтеросорбентов относительно ионов Co2+ определяли по количеству сорбированных ионов металла из стандартных растворов хлорида кобальта [2].

Для количественного определения ионов кобальта в растворе строили градуировочный график. Для этого в пробирки объемом по 10 см3 вносили по 0,005 см3 стандартных водных растворов хлорида кобальта, содержащих 2, 4, 6, и 8 см3 в 1 мл раствора; 0,3 г сухого роданида аммония, 2 см3 воды и доводили объем смеси до 5 см3 пропиловым спиртом. После перемешивания измеряли оптическую плотность относительно контроля в качестве, которого выступал раствор, не содержащий ионов кобальта, на ФЭК-М при длине волны 590 нм.

Удельную адсорбцию Co2+ из раствора на поверхность энтеросорбента определяли следующим образом: в колбы на 100 см3 помещали по две части сухого энтеросорбента и добавляли десятикратный раствор хлорида кобальта известной концентрации (0,2 М; 0,4 М; 0,6 М). Количество несвязавшихся с энтеросорбентом ионов Co2+ определяли спектрофотометрическим методом, описанным выше.

Удельную адсорбцию энтеросорбентов рассчитывали по формуле: , где

где *Снач* и *Сравн* – исходная и равновесная концентрации иона кобальта, моль/л ;

V- обьем раствора CoCl2, см3;

m- масса навески энтеросорбента, г.

**2.4. Метод определения удельной адсорбции энтеросорбента по иону железа (III).**

 Адсорбционную емкость энтеросорбентов относительно ионов Fe определяли по количеству сорбированных ионов металла из стандартных растворов хлорида железа.

 Для количественного определения ионов железа в растворе проводили титрование. Для этого отбирали пипеткой 5 мл раствора хлорида железа и переносили в колбу для титрования емкостью 100 мл. Осторожно нейтрализовали раствор, прибавляя по каплям при энергичном перемешивании 25%-ный раствор аммиака до появления слабой мути, которую растворяли в 1-2 каплях 6 М соляной кислоты. Затем прибавляли к раствору 2 мл 4 М раствора соляной кислоты , растворяли дистиллированной водой до объема 25 мл, нагревали, добавили 2 капли раствора сульфосалициловой кислоты и титровали раствором ЭДТА до перехода красно-фиолетовой окраски сульфосалицилата железа в светло-желтую ( или бесцветную) характерную для комплексоната железа.

 Удельную адсорбцию рассчитывали по формуле:

, где

 где Снач и Сравн- исходная и равновесные концетрации иона железа, моль/л;

 V- обьем раствора хлорида железа, см3;

 m- масса навески энтеросорбента, г.

**2.5. Метод определения удельной адсорбции энтеросорбента по иону магния (II).**

 Адсорбционную емкость энтеросорбентов относительно ионов Mg определяли по количеству сорбированных ионов металла из стандартных растворов сульфата магния.

 Для количественного определения ионов магния в растворе проводили титрование . Для этого отбирали пипеткой 5 мл раствора сульфата магния, переносили в колбу для титрования емкостью 100 мл, прибавляли 2 мл аммиачного буферного раствора и равное количество дистиллированной воды. Прибавляли на кончике шпателя 20-30 мг эриохромого черного Т, перемешивали до полного растворения индикатора. Титровали полученный раствор раствором ЭДТА до изменения окраски раствора из винно-красной в синюю.

 Рассчитывали удельную адсорбцию по формуле:

, где

 где Снач и Сравн- исходная и равновесная концентрации иона магния, моль/л;

 V- объем раствора сульфата магния, см3;

 m- масса навески энтеросорбента, г.

Экспериментальная часть

3.1. Синтез энтеросорбентов

На начальном этапе целью исследования явилось получение сорбционных материалов и использование их в качестве энтеросорбентов в медицинских целях.

Получение энтеросорбентов предполагает правильный выбор носителя для иммобилизации. При этом важно учитывать наличие таких положительных свойств твердых матриц как: развитая удельная поверхность, термостабильность, механическая устойчивость, малое изменение объема гранул при изменении рН или ионной силы, наличие функциональных групп, пригодных для селективной химической модификации и устойчивость к воздействию микроорганизмов.

В настоящее время предлагается огромный выбор биокатализаторов, которые могут быть использованы в биотехнологии и медицине в качестве энтеросорбентов, а также для селективного извлечения катионов и анионов из водных (или жидких) сред [13].

На данном этапе исследований перед нами стояла задача получения базового полифункционального сорбента, обладающего высокой сорбционной емкостью и специфичностью, который удовлетворял бы всем вышеперечисленным требованиям, предъявляемым к сорбционным материалам.

Поставленная задача решается способом, включающим гетерогенизацию поверхности микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) природным высокомолекулярным соединением казеином.

Технология получения казеина представлена в виде схемы на рисунке 1.

Сухое молоко

Вода

Лимонная кислота

Гомогенизация

Центрифугирование

Белковый комплекс

Полисахаридный комплекс

Рисунок 1 – Схема получения казеина из сухого молока

Выбор микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) в качестве носителя обусловлен, прежде всего, ее доступностью и наличием реакционно-способных групп, легко вступающих в химические реакции, а также тем, что она естественным образом улучшает самоочищение кишечника. Обладая тонизирующим действием на ткани кишечника, усиливает перистальтику и помогает избавиться от контаменантов и слизи, тем самым, улучшая усвоение питательных веществ и воды.

Высокоразвитая поверхность МКЦ, активные концевые группы, образующиеся при гидролитическом расщеплении глюкозидных связей высокополимерной целлюлозы, наличие силанольных групп ≡Si-OH на поверхности аэросила, являются определяющим фактором в процессе модификации поверхности носителя белковыми лигандами.

Использование казеина для активации поверхности носителя обусловлено рядом положительных свойств белкового комплекса: присутствие фосфора в виде фосфосериновых групп, которые определяют анионный характер казеина в нейтральной среде, высокое содержание некоторых аминокислот (глутаминовая кислота, лейцин, пролин) и неполярных остатков отвечает за нерастворимость казеина в воде на уровне изоэлектрической точки (рН 4,6) [1]. Кроме того, первичная структура пептидной цепи отличается присутствием двух контрастных зон: концевая последовательность –NH2 имеет в целом основной и гидрофобный характер; концевая последовательность –СООН является кислой и гидрофильной; и обусловливает ряд важных физико-химических свойств казеинов [7], одно из которых состоит в высокой адсорбционной способности.

Согласно физико-химическим свойствам, казеин является кислотным белком, поэтому хорошо растворяется в растворах щелочей с образованием казеинатов. При концентрации гидроксида натрия ниже 5 % невозможно достичь полного растворения казеина, выше 15 % - может наступить необратимая денатурация белка.

Концентрация казеина для модификации поверхности аэросила выбирается с учетом стерического фактора. Менее 1 мас.% казеина использовать нецелесообразно, т.к. остаются не задействованы в процессе модификации все функциональные группы аэросила. Использование более 15 мас.% казеина недопустимо в связи с конкуренцией молекул казеина за право обладанием центрами связывания, находящихся на поверхности кремнезема.

Проведен синтез энтеросорбентов на основе микрокристаллической целлюлозы и казеина.

Технология получения энтеросорбента включает в себя 6 стадий и представлена на рисунке 2.

Жесткой матрицы для иммобилизации казеина служила МКЦ - неионогенный гидрофильный полисахарид. Модификацию поверхности МКЦ казеином проводили в соответствии с методикой изложенной в работе [14].

*Стадия 1* характеризует процесс получения казеина из сухого молока.

*Стадия 2* включает растворение навески казеина в растворителе. На этой стадии в раствор казеина вводится неорганический газообразователь гидрокарбонат аммония в количестве не более 1-3% по массе. Введение гидрокарбоната аммония позволит исключить загрязнение сорбента контаменантами.

Фракционирование белков молока

Приготовление раствора казеина и введение газообразователя NH4HCO3

Иммобилизация казеина на МКЦ Содержание казеина 5 мас.%, 10 мас.%.

Испарение растворителя

t≤30-350C (вакуум)

Высушивание твердофазного сорбента, t≤50÷600C (вакуум)

Стабилизация сорбента подкисленным раствором ацетона (pH~4,6)

Рисунок 2 - Схема получение сорбента на основе микрокристаллической целлюлозы

*Стадия 3* включает суспензирование навески МКЦ и раствора казеина с неорганическим газообразователем.

*Стадии 4,5* отражают сушку сорбента под вакуумом при t=500 С до испарения растворителя.

*Стадия 6* включает стабилизацию сорбента подкисленным раствором ацетона.

**3.2. Исследования сорбционной емкости разработанных сорбентов относительно ионов кобальта (II)**

Для синтезированных сорбентов были проведены анализы сорбционной емкости относительно ионов кобальта.

Кобальт в качестве микроэлемента весьма активно влияет на поступление в организм азотистых веществ, увеличения содержания хлорофилла и аскорбиновый кислоты, активирует ряд ферментов, усиливает биосинтез белков и нуклеиновых кислот. Он является связующим звеном между сорбентом и сорбированным препаратом. Именно поэтому, нами были проведены исследования по получению кобальтсодержащих энтеросорбентов. На рисунке 3 представлены данные по удельной адсорбции выше представленных сорбентов относительно ионов кобальта.

**Рисунок 3 - Удельная адсорбция относительно ионов Со2+  компонентов, составляющих структуру сорбента и самого сорбента на основе микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) и казеина**

Для данных кривых было получено критериальное уравнение и рассчитана вероятность степени аппроксимации.

Y = -75397x5 + 64191x4 - 20021x3 + 2761,9x2 - 157,67x + 3,2388

R2 = 0,8572

Анализируя кривые адсорбции относительно ионов Со2+  (рис.3) на поверхность сорбента из раствора можно сделать вывод, что процент связывания ионов кобальта с сорбентом на основе МКЦ и казеина выше, чем отдельных компонентов сорбента. Данное обстоятельство можно объяснить не только процессами, связанными с наличием активных групп, входящих в состав казеинового комплекса, но и самой структурой сорбционной матрицы. Кроме того, ионы кобальта оказывают незначительное влияние на мицеллу казеина, тем самым, не нарушая имеющих место межмолекулярных взаимодействий. При этом адсорбционные процессы протекают по классической схеме локализованной адсорбции (кривая адсорбции казеина относительно ионов Со2+ рис. 3) .

Сопоставляя полученные результаты адсорбционных процессов, протекающих на поверхности компонентов, входящих в состав сорбента МКЦ + казеин, и самого сорбента можно сделать выводы, что казеин, гетерогенизированный на поверхности носителя, значительно увеличивает процент адсорбции. Этот результат наглядно демонстрирует рис.3.

**3.3 Исследование сорбционной емкости сорбентов**

**относительно ионов железа (II).**

 Для исследования брали 2г сорбента МКЦ+5 мас.% казеин, заливали 5мл хлорида железа (III) известной концентрации (0,1М; 0,5М; 1М). По истечении 24ч раствор отфильтровали.

 Нами была рассчитана удельная адсорбция, данные которой представлены на рисунке.

Рисунок 4 - Удельная адсорбция сорбентов на основе МКЦ с различным содержанием казеина относительно ионов Fe(III)

Для данных кривых было получено критериальное уравнение и рассчитана вероятность степени аппроксимации.

Y = -34701x4 + 7206,5x3 - 494,08x2 + 13,629x - 0,1088

R2 = 1

 Анализируя кривые адсорбции относительно ионов Fe (рис.4) на поверхность сорбента из раствора можно сделать вывод, что процент связывания ионов железа с сорбентом на основе МКЦ и казеина выше, чем отдельных компонентов сорбента. Это обстоятельство объясняется структурой сорбционной матрицы. Кроме того, ионы железа оказывают незначительное влияние на мицеллу казеина, не нарушая межмолекулярных взаимодействий.

Нами была рассчитана сорбционная емкость разработанных сорбентов относительно различных концентраций ионов железа. Данные сорбционной емкости представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Сорбционная емкость энтеросорбентов, относительно различных концентраций ионов железа

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

**3.4 Исследование сорбционной емкости сорбентов**

**относительно ионов магния (II).**

Для исследования брали 2г сорбента с 5%-ным содержанием казеина залили 5мл сульфата магния известной концентрации (0,1М; 0,5М; 1М). По истечении 24ч исследуемый раствор отфильтровали и проводили титрование. Нами была рассчитана удельная адсорбция. На рисунке 5 представлены данные по удельной адсорбции представленных сорбентов относительно ионов магния (II).

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В соответствии с целью и поставленными задачами проведенных исследований по одному из основных направлений биотехнологии – разработке новых сорбционных материалов с заданными свойствами– удалось разработать матрицы, которые обладают рядом преимуществ: развитой удельной поверхностью, термостабильностью, механической устойчивостью, малым изменением объема гранул при изменении рН или ионной силы, наличием функциональных групп, пригодных для селективной иммобилизации.

Разработана технология получения энтеросорбентов на основе микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) путем гетерогенизации поверхности природным высокомолекулярным соединением белковой природы - казеином.

Исследована сорбционная емкость разработанных сорбентов относительно ионов кобальта. Полученные данные показали, что сорбционная емкость больше у самого сорбента, в отличие от компонентов сорбента. Данное обстоятельство можно объяснить не только процессами, связанными с наличием активных групп, входящих в состав казеинового комплекса, но и самой структурой сорбционной матрицы.

**Список используемой литературы**

1. Алексеева Н.Ю., Аристова В.П., Патратий А.П. Состав и свойства молока как сырья для молочной промышленности: Справочник. - М.: Агропромиздат, 1986. - С.238.
2. Белявская Т.А., Большова Т.А., Брыкина Г.Д. Хроматография неорганических веществ. М.: Высшая школа, 1986 г. – 296 с.
3. Горбатова К.К. Биохимия молока. - М.: Пищевая пром-ть, 1980. - 354 с.
4. Глегг Р.Е., Танг Л.Дж., Бруэр Р.Дж.Д. Фракционирование .- Целлюлоза и ее производные. Под ред. Н.Байклза, Л.Сегала. - М.: Мир, 1974. - Т.1. - С.382-412.
5. Давидова Е.Г., Рачинская В.В. Сорбция белков на ионообменных целюлозах // Прикладная биохимия и микробиология. -1977.- Т.3. - №3. -С.341-345.
6. Дудкин М.С., Щелкунов Л.Ф. Пищевые волокна и новые продукты питания (обзор) // Вопр. питания. - 1998. - №2. - C. 35 – 41.
7. Измайлова В.Н., Ребиндер П А. Структурообразование в белковых системах. – М.: Наука,1974. – С.68.
8. Иммергут Э.Х. Целлюлоза. - M.: Лесная промышленность, 1967. -С.114-117.
9. Каравайко Г.И., Галицкая Н.Б., Авакян З.А. Способ получения твердых биосорбентов для извлечения металлов // RV 2045574.C12N11/08. – 1995.
10. Колотуша Т.Т., Полонская И.Н., Белякова Л.А. и др. Способ получения носителей для иммобилизации органических соединений // AC №1153975.B 01I 20/10. – 1985.
11. Кочетков Н.К., Бочков А.Ф., Дмитриев Б.А. и др. Химия углеводов. - М.: Химия. - 1967. – 350с.
12. Куличинский Ю.Л., Малашенко Т.А., Фирсова В.И. Способ получения белкового сорбента// SU 1680715,С08 Н1/00, В01J20/30, С08 I5/20/-1991.
13. Кунижев С.М., Денисова Е.В. Информационный листок «Биофильтры нового поколения». – Ставрополь: Изд-во СГУ, 2001. 2 с.
14. Кунижев С.М., Серов А.В., Денисова Е.В., Аполохова С.Ф., Воробьева О.В., Анисенко О.В. // Заявка 2002105544 (РФ) Способ получения сорбентов. Положительное решение от 7 марта 2002. 7 с.
15. Лишевская М.О., Вирник А.Д., Роговин З.А. Введение новых функциональных групп в макромолекулу модифицированной целлюлозы, содержащей ароматические аминогруппы. – Москва, 1963. – 165с.
16. Макушин Е.М., Тур Л.Т. Способ получения сорбента // АС 615089 С 08 В 15/00. – 1978.
17. Матюшин Ю.Н., Корчатова Л.И., Сопин В.Ф. Исследование влияния условий высушивания целлюлозы на теплоту ее сгорания. I Всесоюзная конференция по синтезу целлюлозы и его регуляции.: Тез.докл. – Казан, 1980. - С 36.
18. Раскин М.Н., Егоров А.Е., Васильева Г.Г., Кательникова Н.Е., Петропавловский Г.А. Способ получения МКЦ // АС № (11) 751808 30.07.80. Бюл. №28.
19. Роговин З.А., Шорыгина Н.Н. Химия целлюлозы и ее спутников. - М.: Госхимиздат, 1953.- .678с.
20. Степанова З.Н., Грищенко С.И., Стручак С.В., и др. Способ получения сорбента для аффинной хроматографии //SV 1578137.C08B15/00,B01I20/24.20/30. – 1990.
21. Тарчевский И.А., Марченко Г.Н. Биосинтез и структура целлюлозы. – М.: Наука, 1985. – 279 с.
22. Тетин А. Химия и физика молока. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 624 с.
23. Черкасов А.Н., Пасечник В.А. Мембраны и сорбенты в биотехнологии. - Л.: Химия, 1991. - 240с.
24. Marx-Figini M., Schulz G.V. Die Viskosimetrische Molekulargewichts bestimung von Cellulosen und Cellulosennitraten unter Standartbedigungen. – Makromol. Chem., 1962. - Bd.54. - S.102-118.