



УДК 547.458.04

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ХИТИНЕ ОМАРА
НА ЕГО ХАРАКТЕРИСТИКИ

Гарсиа Алонсо И., Овьеда Вега Д., Хенрикез Р. Д.

Институт экспериментальной химии и биологии
Академии наук Кубы, Куба, Гавана

Проведено сравнение хитинов из кальцифицированной кутикулы и из гибких межсегментных тканей омара. Показано, что ионы Ca^{2+} в хитине влияют как на термостабильность полисахарида, так и на связывание хитина с белками.

Характеристики хитина зависят как от источника, так и от способа выделения. Проведенные нашей группой калориметрические исследования свойств хитина из панциря омара на межличиночной стадии показали, что температура теплового разложения этого полимера выше, чем у других мукополисахаридов [1]. В то время как влияние жесткости процесса выделения хитина на его термические свойства уже исследовано [2], роль следовых количеств Ca^{2+} , содержащегося в нем, до сих пор не изучена.

В работе использовали хитин из панциря омара *Panulirus argus* межличиночной стадии, полученный из кальцифицированной кутикулы (тип К) и из гибкой межсегментной ткани (тип Т). На рис. 1 представлены ИК-спектры обоих образцов, в которых нет значительных различий.

Мы провели калориметрический анализ обоих образцов хитина. Из рис. 2 видно, что температура разложения хитина Т из некальцифицированной ткани ниже, чем у образца хитина К (ср. кривые 1, 2 рис. 2).

Поскольку основное различие исследуемых образцов кутикул состояло в различном содержании Ca^{2+} , мы решили исследовать роль этих ионов при помощи модельной системы, полученной путем помещения хитина Т в 1% водный раствор CaCl_2 . Через 1 ч осадок отделили центрифугированием, отмыли и высушили при 20°C , после чего вновь была снята кривая нагревания. Как видно из рис. 2, пик дифференциальной термограммы полученного образца сместился в сторону более высоких температур по

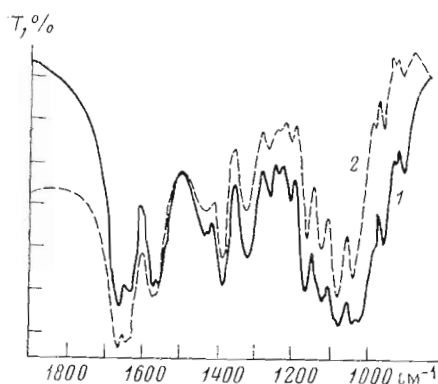


Рис. 1

Рис. 1. ИК-спектры хитинов типа К (1) и Т (2)

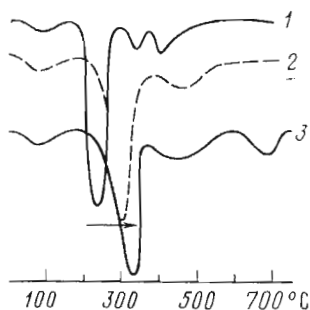


Рис. 2

Рис. 2. Дифференциальные термограммы хитинов типа Т (1), К (2) и некальцифицированного хитина Т после его выдерживания в растворе CaCl_2 (3)

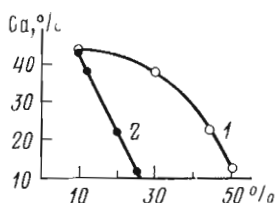


Рис. 3. Зависимость между количеством Ca (определен в доле) и содержанием белка (1) и хитина (2) в панцире омара

сравнению с исходным полимером. Это наводит на мысль о том, что включение ионов Ca^{2+} способствует возрастанию термостабильности хитина.

С другой стороны, было установлено, что в хитине из кальцифицированной кутикулы остается 0,02% Ca, возможно, в виде Ca^{2+} -полимерных комплексов, которые легко подвергаются разрушению при действии химических агентов: 0,25 М растворов сахарозы, EDTA, MgCl_2 , LiCl, KSCN и HCl.

Интересно, что в нативной структуре межлиночного панциря омара помимо основных структурных элементов — столбиков солей Ca и хитиновых спиралей — во внутренней эндокутикуле, основным компонентом которой является полисахарид, можно наблюдать также более высокое содержание Ca^{2+} (показано методом электронной микроскопии). Эти результаты значительно отличаются от данных, полученных нами при морфологических исследованиях панциря креветки [3]. Другим экспериментальным подтверждением Ca^{2+} -хитинового взаимодействия может служить обнаруженная высокая степень корреляции между содержанием обоих компонентов на различных стадиях линьки (рис. 3).

Однако роль Ca^{2+} не ограничивается увеличением термостабильности и, возможно, повышением жесткости полисахаридной цепи. Как было показано в работе [4], кутикулы ракообразных состоят из хитин-белковых ассоциатов, а в работах [5–7] исследовались различные предполагаемые центры связывания в таких комплексах. Тем не менее активное участие Ca^{2+} в связывании обоих полимеров не рассматривалось.

В ходе наших опытов выяснилось, что даже при таком жестком воздействии, как обработка в течение 48 ч 4% раствором NaOH при 100°С, которое должно было бы привести к гидролизу ковалентных связей между белком и хитином [8], в полимере остается еще 20% исходного количества белка. В твердом остатке содержались главным образом Gly и Asp (таблица), а такие аминокислоты, как Lys, Phe, Thr, Ile, Leu, Gly и His, устраняются щелочной обработкой в меньшей степени (относительно исходного состава).

Однако практически весь белок и 30% органических веществ удаляются при воздействии EDTA. Последующая щелочная обработка не требуется. Таким образом, максимальное удаление белка раствором EDTA — результат выделения не только физически ассоциированного белка, но и белковых фракций, связанных с хитиновой матрицей в виде кальцифицированных комплексов.

Содержание аминокислотных остатков в хитине после его обработки щелочью *

Аминокислота	г/100 г твердого остатка	Относительно исходного количества в панцире, %	Аминокислота	г/100 г твердого остатка	Относительно исходного количества в панцире, %
Lys	0,096	19,2	Gly	0,185	15,4
His	0,111	34,7	Ala	0,098	8,8
Arg	0,048	10,9	Val	0,110	10,8
Asp	0,118	9,3	Ile	0,096	23,4
Thr	0,047	7,6	Leu	0,042	7,5
Ser	0,039	4,1	Tyr	0,099	27,5
Glu	0,069	4,2	Phe	0,089	18,5

* 4% NaOH, 48 ч, 100°С.

Авторы благодарят д-ра Хозе Фернандеса за получение ИК-спектров, д-ра Дитера Пауля за микроскопические измерения, Лиц. Карлоса Фуентеса за определение содержания Са.

Экспериментальная часть

Для получения хитинов двух типов использовали кальцифицированные кутикулы и гибкие межсегментные ткани из панциря омара *Panulirus argus*. Выделение проводили последовательными мягкими воздействиями кислоты и щелочи по стандартным методикам. ИК-спектры записывали на спектрофотометре Unicam SP-200. Таблетки образцов готовили путем измельчения с КВг.

Для термического анализа применяли дифференциальный калориметр МОМ со скоростью нагрева 10° С/мин. Концентрацию Са определяли на атомном абсорбционном спектрофотометре Pye Unicam SP-90-A.

Морфологические исследования и анализ распределения Са проводили при помощи электронного микроскопа Jeol JSM-V-3, снабженного дополнительной системой Edax для анализа дисперсии рентгеновских лучей.

Аминокислотный состав определяли после кислотного гидролиза на приборе Hitachi K1a 5.

ЛИТЕРАТУРА

1. *García Alonso I. et al.* Informe Científico Técnico № 165. Acad. Cienc. de Cuba, 1981, 14 pp.
2. *García Alonso I. et al.* Boletín Información Científica I. Q. B. E., 1982, v. 2, № 1, p. 28-39.
3. *García Alonso I. et al.* Estudio del exoesqueleto del camarón. (don't published).
4. *Muzzarelli R. A. A.* Chitin. Oxford: Pergamon Press, 1977.
5. *Jeuniaux Ch.* Traite de Zoologie/Ed. Grasse P. P., 1975, t. VII, fasc. III, p. 31-44.
6. *Hunt S., Nixon M.* Comp. Biochem. and Physiol., 1981, v. 68B, p. 535-546.
7. *Brine C. J.* Proc. Sec. Int. Conf. on Chitin/Chitosan, 1982, p. 105-110.
8. *Austin P. R. et al.* Science, 1981, v. 212, p. 749-753.

Поступила в редакцию
25.XI.1983

EFFECT OF CALCIUM IN LOBSTER CHITIN ON ITS CHARACTERISTICS

GARCÍA ALONSO I., OVIEDO VEGA D., HENRIQUES R. D.

*Instituto de Química y Biología Experimental. A.C.C. Ave 26
No. 1605, Plaza, Ciudad de La Habana, Cuba*

Chitins from the lobster calcified cuticle and flexible intersegmental tissues were compared. The Ca²⁺ ions in chitin were shown to affect both the polysaccharide thermostability and chitin binding to proteins.