



*Physics is an ever young science, Varna, October, 27 – 29, 2017*  
*Физиката – вечно млада наука, Варна, 27 – 29 октомври 2017 г.*

## ПОЛУЧАВАНЕ НА ПОЛИЕЛЕКТРОЛИТНИ КОМПЛЕКСИ ОТ ХИТОЗАН И КАЗЕИН

**Антоанета Маринова, Теменужка Йовчева, Ася Виранева,  
Иван Бодуров, Мария Марудова**  
*Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“*

**Резюме.** През последните десетилетия се провеждат интензивни изследвания върху взаимодействията между полиелектролитите и възможностите за образуване на полиелектролитни комплекси (ПЕК). Основната цел на тези изследвания е да се проучат свойствата на ПЕК и да се разширят приложенията им при решаването на различни технологични и екологични проблеми. Интересът към природните полиелектролити – полизахариди, протеини, аминокиселини, ДНК и т.н., се увеличава поради ролята им в живите организми, тяхната бионаличност, биоразградимост и употребата им във фармацията и медицината. В настоящото изследване за получаване на нов комплекс между полиамфолита казеин и природния поликатион хитозан са използвани електростатичните взаимодействия на привличане между противоположно заредени полиелектролити. Комплексът казеин/хитозан е получен при смесването на кисели разтвори на хитозан с основни разтвори на казеин. Добивът на комплекса е определен чрез вискометрични, спектроскопични и гравиметрични методи. Установена е оптималната стехиометрия на комплексите при различно рН.

**Keywords:** polyelectrolyte complexes; chitosan; casein; pH

## Въведение

При смесване на водни разтвори на противоположно заредени полиелектролити в резултат на електростатично взаимодействие се образуват полиелектролитни комплекси. В зависимост от молекулната маса, линейната плътност на зарядите и концентрацията на партньорите получените комплекси могат да бъдат под формата на аморфни утайки (Wang & Schlenoff, 2014), коацервати (Jha et al., 2014.) и гелове (Laaser et al., 2016). Нерастворими комплекси се получават при пълна неутрализация на заряда – стехиометрични комплекси (Xia & Dubin, 1994; Le et al., 2017; Tolstoguzov, 1997). Растворими комплекси се образуват при частична неутрализация на заряда. Резултантният заряд върху комплекса позволява разтварянето му вследствие на взаимодействие с молекулите на разтворителя.

Най-важните фактори, влияещи върху комплексообразуването, са: структура и концентрация на комплексообразуващите партньори, рН и йонна сила на средата, плътност и разпределение на заряда и стехиометрично отношение между партньорите (Xia, 1994). рН е ключово при образуването на комплекси на слаби полиелектролити, тъй като то влияе върху степента на йонизация на функционалните им групи. Йонната сила на разтвора регулира електростатичното взаимодействие между полиелектролитите. При ниска йонна сила концентрацията на електролита има малък ефект върху комплексообразуването. При висока йонна сила зарядът, носен от полиелектролитите, се екранира и по този начин намалява привличането между макромолекулите. Оказва се обаче, че в някои случаи образуването на комплекси е намалено поради ниска йонна сила. Предполага се, че поради увеличаване на заряда върху макромолекулите те се намират в „разтегната“ конформация, която затруднява комплексообразуването (Priftis et al., 2014).

В настоящата работа е получен и охарактеризиран нов полиелектролитен комплекс на базата на два природни слаби полиелектролита – хитозан и казеин. Хитозанът е уникален полизахарид, който съдържа положително заредени аминогрупи и е единственият природен катионен полимер (Rinaudo, 2006). Поради наличието на amino- и карбоксилни групи в неговата структура казеинът проявява полиамфолитно поведение (Liu & Guo, 2008). В кисела среда той се отнася като поликатион, а в алкална – като полианион. При стойности на рН, близки до изоелектричната точка – рН 4.6, отношението между положително заредените аминогрупи и отрицателно заредените карбоксилни групи е близко до единица (Walker, 2016).

## Материали и методи

### Материали

За изследванията е използван високомолекулен хитозан (молекулна маса 600 000 – 800 000 g/mol), който е закупен от Acros Organics. Казеинът е под форма на натриева сол и е купен от Sigma-Aldrich Chemie, Germany.

*Получаване и охарактеризиране на полиелектролитни комплекси между казеин и хитозан*

Полиелектролитните комплекси казеин/хитозан са получени чрез смесване на 1% разтвори на партньорите в буферни разтвори при температура 25°C. Полимерните разтвори са смесвани в масови съотношения 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 и 9:1. При изследване на влиянието на рН върху комплексообразуването са използвани разтвори на хитозан с рН 3, рН 4 и рН 5 и разтвори на казеин с рН 10. Всички разтвори са с еднаква йонна сила – 0.1 mol/l. Смесите престояват 24 h при стайна температура, след което са центрофугирани в продължение на 40 min при обороти 4000 rpm. Добивът на комплекса е определен гравиметрично, като утайката е изсушена до постоянно тегло и претеглена. Специфичният вискозитет на супернатанта е определен при температура 25°C чрез вискозиметър тип „Убелоде“ с вътрешен диаметър на капиларата 0.40 mm, при който не е правена корекция за скоростния градиент на изтичане.

Турбидиметричните измервания са проведени с 0.1% разтвори на партньорите при вече описаните рН и йонна сила. Поглъщането на смесите е измерено със спектрофотометър ThermoSpectronic при дължина на вълната 420 nm и стайна температура. Измерванията са проведени 15 min след смесването на разтворите и са повторени след 24 h. При това не се наблюдават съществени различия в измерваните стойности. Ето защо се налага изводът, че при условията на експеримента получените частици са стабилни и не се утаяват.

### **Резултати и обсъждане**

Поради полиамфолитния си характер при подходящо рН казеинът е способен да комплексообразува както с поликатиони, така и с полианиони. Съществена за комплексообразуването му с хитозана е степента на йонизация на карбоксилните групи. Ето защо е необходимо разтворите на казеин да бъдат в областта на основни рН. От друга страна, е известно, че  $pK_a$  на хитозана е 6.4 (Kong et al., 2010) и неговите разтвори следва да бъдат в киселата рН област.

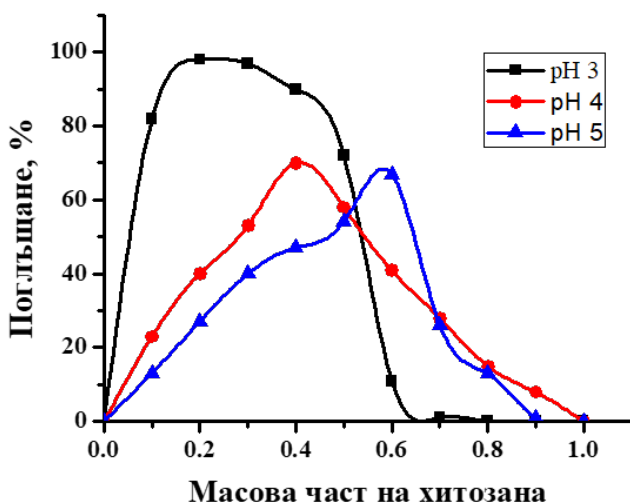
Комплексите на хитозан и казеин са получени чрез смесване на водни разтвори на двата полиелектролита. Установено е, че при смесването на разтвори с концентрация, по-голяма от 2 %, ПЕК се получава под формата на гел, а под тази концентрация – под формата на бяла утайка. При концентрации, по-ниски от 0,1%, не се наблюдава утайка, но мътноста на разтвора се променя. Вероятно при тези условия възникват частици с наноразмери, които не могат да бъдат наблюдавани с невъоръжено око.

Образуването на комплекс беше доказано вискозиметрично, гравиметрично и турбидиметрично. При смесване на 1% разтвори на двата полиелектролита вследствие на образуването на комплекс част от партньорите се отделят под формата на утайка и вискозитетът на супернатанта се понижава. В проти-

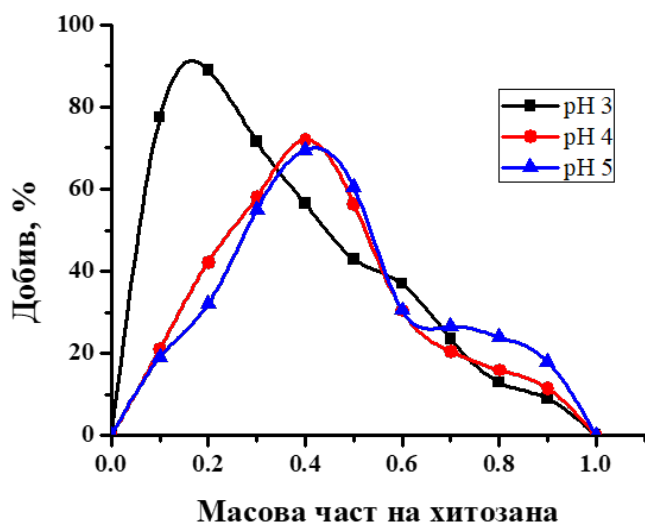
вовес мътността на 0.1 % разтвор нараства и достига максимум при същото масово отношение между партньорите, при което се наблюдава минимална стойност на вискозитета. Добивът на комплекса, определен чрез гравиметрични измервания, е максимален отново при същото масово отношение. Следователно екстремумите в изследваните зависимости съответстват на оптимално комплексообразуване.

Изследвано е влиянието на рН върху комплексообразуването между хитозан и казеин. Комплекс възниква за разтвори на хитозан в рН интервала 3 – 5, а за казеина – в интервала 8 – 12. рН на средата значително променя масовото отношение между партньорите, при което комплексообразуването е максимално (фиг. 1 и фиг. 2).

Поглъщането на разтворите и големината на добива са максимални при разтвор с рН 3 и масова част на хитозана 0.2. С увеличаване на рН екстремумът при всички изследвани зависимости (турбидиметрични, вискозиметрични и гравиметрични) има по-ниски стойности и се измества към по-големите масови части на хитозан. Следователно при тези рН комплексообразуването е по-слабо проявено. Наблюдаваната силна чувствителност на комплексообразуването към изменението на рН се дължи на факта, че и двата партньора са слаби полиелектролити и рН съществено променя степента на йонизация на реактивоспособните групи.



Фигура 1. Зависимост на поглъщането на хитозан/казеин ПЕК от масовата част на партньорите и рН на средата



**Фигура 2.** Зависимост на добива на хитозан/казеин ПЕК от масовата част на партньорите и рН на средата

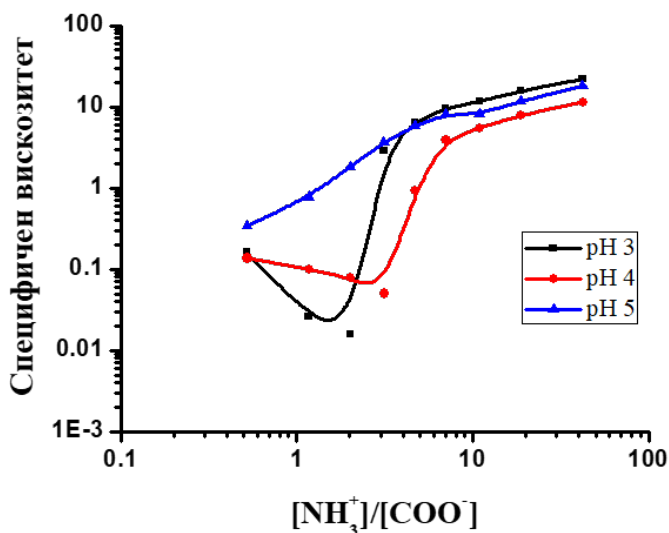
За оценка на степента на йонизация на карбоксилните и аминогрупите са използвани зависимостите (Carnal & Stoll, 2011).

$$\alpha\% = \frac{100}{1 + 10^{(\text{pK}_a - \text{pH})}} \quad (1)$$

$$\alpha\% = \frac{100}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_a)}} \quad (2)$$

Установено е, че степента на йонизация на  $\text{COO}^-$  групи в изследвания рН диапазон се променя в много малки граници и е много близка до 100%, а степента на протониране на  $\text{NH}_2$  групите варира от приблизително 100 % при рН 3 до 96 % при рН 5.

За по-добро разбиране на механизмите на комплексобразуването между хитозана и казеина при всички изследвани рН е изчислено отношението на реалните съществуващи заряди  $[\text{NH}_3^+]/[\text{COO}^-]$ . При това са взети под внимание степените на йонизация и протониране на съответните активни групи, както и данните за състава на партньорите. Зависимостта на специфичния вискозитет на супернатанта от отношението на положителните и отрицателните заряди при различни рН е представена на фиг. 3.



**Фигура 3.** Зависимост на специфичния вискозитет на супернатанта от отношението на зарядите на хитозана и казеина

При всички изследвани рН комплексът е нестехиометричен и се образува в излишък на положителни заряди. Отношението на положителните и отрицателните заряди, при което комплексообразуването е максимално, е различно за различните рН. С нарастване на рН на хитозана от 3 до 5 минимумът на специфичния вискозитет се премества към по-голямо отношение на положителните към отрицателните заряди.

Наблюдаваното явление може да бъде обяснено с факта, че образуването на комплекс зависи не само от отношението на положителните и отрицателните заряди, но и от плътността на заряда за всеки от партньорите. При рН 5 плътността на заряда на хитозана е по-ниска, отколкото при рН 3, при което същото отношение между карбоксилатните йони и положително заредените йони в хитозана се реализира при по-голяма масова част на хитозана. Броят на хитозановите молекули е по-голям, но зарядът върху една отделна молекула е недостатъчен, за да предизвика достатъчно силно електростатично взаимодействие и образуване на комплекс. Поради това в комплексообразуването се включват повече молекули.

Друг факт, потвърждаващ влиянието на плътността на заряда върху комплексообразуването, е промяната в структурата на комплекса при различните рН. Комплексът е под формата на гел при високи рН и се преобразува в неразтворима утайка при рН 3. Плътността на заряда влияе върху вида на свързване на партньорите. При ниска плътност на заряда макромолекулите са предимно омержени и

образуват гел, докато при висока плътност на заряда те взаимодействат по ципов механизъм, при което възникват плътни неразтворими утайки.

### **Заклучение**

В настоящата работа за първи път е показано, че в резултат на електростатичното взаимодействие между противоположно заредени макромолекули е образуван нов ПЕК между полиамфолита казеин и слабата полибаза хитозан. Комплексите могат да възникват в широк рН интервал от рН=3 до рН=5 за хитозана и над 8 за казеина. При всички рН комплексите са нестехиометрични. Образуват се в излишък на положителни заряди, които се неутрализират от противойоните в разтвора.

Основна роля за механизма на комплексообразуване играе плътността на положителните и отрицателните заряди. Тя се регулира посредством промяна на рН. При ниска плътност на заряда (гранични стойности на рН, при които се наблюдава комплексообразуване) комплексът възниква под формата на гел, докато при висока плътност на заряда възникват водонеразтворими утайки.

**Благодарности.** Изследването е проведено с финансовата подкрепа на договор ДФНИ Б02/7 към Фонд „Научни изследвания“.

### **REFERENCES**

- Carnal, F. & Stoll, S. (2011). Adsorption of weak polyelectrolytes on charged nanoparticles: impact of salt valency, pH, and nanoparticle charge density — Monte Carlo simulations. *J. Phys. Chem., B*, 115, 12007 – 12018.
- Jha, P.K., Desai, P.S., Li, J. & Larson, R.G. (2014). pH and salt effects on the associative phase separation of oppositely charged polyelectrolytes. *Polymers*, 6, 1414 – 1436.
- Kong, M., Chen, X.G., Xing, K. & Park, H.J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int. J. Food Microbiol.*, 144, 51 – 63.
- Laaser, J.E., Lohmann, E., Jiang, Y., Reineke, T.M. & Lodge, T.P. (2016). Architecture-dependent Stabilization of polyelectrolyte complexes between polyanions and cationic triblock terpolymer micelles. *Macromolecules*, 49, 6644 – 6654.
- Le, X.T., Rioux, L.-E. & Turgeon, S.L. (2017). Formation and functional properties of protein–polysaccharide electrostatic hydrogels in comparison to protein or polysaccharide hydrogels. *Adv. Coll. & Interface Sci.*, 239, 127 – 135.
- Liu, Y. & Guo, R. (2008). pH-dependent structures and properties of casein micelles. *Biophys. Chem.*, 136(2 – 3), 67 – 73.

- Priftis, D., Xia, X., Margossian, K.O., Perry, S.L., Leon, L., Qin, J., de Pablo, J. & Tirrell, M. (2014). Ternary, tunable polyelectrolyte complex fluids driven by complex coacervation. *Macromolecules*, *47*, 3076 – 3085.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress Polymer Sci.*, *31*, 603 – 632.
- Tolstoguzov, V.B. (1997). Protein-polysaccharide interactions (pp.171-198). In: Damodaran, S. & Paraf, A. (Eds.). *Food proteins and their applications*. New York: Marcel Dekker.
- Walker, G.C. (2016). Net charge of trace proteins. *Nature Nanotech.*, *11*, 739 – 740.
- Wang, Q. & Schlenoff, J.B. (2014). The polyelectrolyte complex/coacervate continuum. *Macromolecules*, *47*, 3108 – 3116.
- Xia, J. & Dubin, P.L., (1994). Protein-polyelectrolyte complexes (pp. 247–271). In: Dubin, P., Bock, J., Davis, R., Schulz, D.N. & Thies, C. (Eds.). *Macromolecular complexes in chemistry and biology*. Berlin: Springer.

## POLYELECTROLYTE COMPLEX FORMATION OF CHITOSAN AND CASEIN

**Abstract.** In the recent decades, intensive studies have been performed on the interactions between polyelectrolytes and the possibilities for polyelectrolyte complex (PEC) formation. The main purpose of these studies is to investigate the properties of PECs and to extend their application in solving different technological and environmental problems. The interest in natural polyelectrolytes - polysaccharides, proteins, amino acids, DNA, etc., has been increased due to their role in living organisms, their bioavailability, biodegradability and uses in pharmacy and medicine. In the present study attractive, electrostatic interactions between oppositely charged polyelectrolytes have been used to prepare a novel complex between a polyampholyte casein and a natural polycation — chitosan. The complex casein/chitosan is formed during the mixing of acid chitosan solutions and basic casein solutions. The complex yield was investigated by viscometric, spectroscopic and gravimetric methods. The optimum stoichiometry of the complexes at different pH has been determined.

✉ **Prof. Dr. T. A. Yovcheva (corresponding author)**  
Faculty of Physics and Technology  
University of Plovdiv  
24, Tzar Assen St.  
4000 Plovdiv, Bulgaria  
E-mail: yovchevat@gmail.com