

Научная статья

УДК 543.64/544.1:577.112.7

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-4-547-556>



Молекулярная масса и молекулярно-массовое распределение белка серицина, экстрагированного из отходов коконов *Bombyx mori*

Замира Умаралиевна Шерова, Абубакр Саидкулович Насриддинов,
Шавкат Ёрович Холов, Сураё Рахматжоновна Усманова,
Зайниддин Камарович Мухидинов

Институт химии им. В. И. Никитина НАН Республики Таджикистан,

г. Душанбе, Республика Таджикистан

Автор, ответственный за переписку: Мухидинов Зайниддин Камарович, zainy@mail.ru

Аннотация. Серицин шелка представляет собой глобулярный водорастворимый белок, который обволакивает шелковые волокна, склеивая их и обеспечивая сцепление кокона. Выделение серицина из раствора экстракта производилось двумя способами: первый образец получен концентрированием отфильтрованного экстракта при низком давлении (СНД), второй образец – ультрафильтрацией (СУФ) с применением мембраны. В данной работе был использован метод высокоэффективной эксклюзионной жидкостной хроматографии с применением вискозиметрического и рефрактометрического детекторов для определения молекулярной массы и конформации полипептидов серицина, полученного из коконов тутового шелкопряда *Bombyx mori*. Рассмотрены процессы агрегации белка серицина шелка при разных стрессовых условиях его выделения из раствора. Показано, что макромолекулы серицина присутствуют в виде монодисперсного полипептида при низких концентрациях и агрегируются в концентрациях более 1–2 мг/мл. Полученные данные указывают на то, что не только параметры процесса экстракции влияют на молекулярную массу и агрегативное поведение белка, но и условия выделения его из раствора, включая температуру, давление и степень концентрирования. Результаты данной работы подтверждают и дополняют сведения о влиянии различных факторов на ассоциацию белковых макромолекул в растворе и согласуются с данными других авторов. Полученные фракции серицина могут найти множество применений, включая материалы для тканевой инженерии, покрытий для модификации поверхности, среды для культивирования клеток, в косметике, а также в качестве пищевых добавок и медицинских биоматериалов.

Ключевые слова: серицин, молекулярная масса, гидродинамический радиус, агрегация, концентрирование, ультрафильтрация

Для цитирования: Шерова З. У., Насриддинов А. С., Холов Ш. Ё., Усманова С. Р., Мухидинов З. К. Молекулярная масса и молекулярно-массовое распределение белка серицина, экстрагированного из отходов коконов *Bombyx mori* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 4. С. 547–556. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-4-547-556>.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Molecular weight and molecular weight distribution of sericin protein extracted from cocoon waste of *Bombyx mori*

Zamira U. Sherova, Abubakr S. Nasriddinov, Shavkat E. Kholov,
Surayo R. Usmanova, Zayniddin K. Muhidinov

V. I. Nikitin Institute of Chemistry NAS Republic of Tajikistan,

Dushanbe, Republic of Tajikistan

Corresponding author: Zayniddin K. Muhidinov, zainy@mail.ru

Abstract. Silk sericin comprises a globular water-soluble protein that surrounds silk fibres, sticking them together and providing cocoon adhesion. Sericin was isolated from the extract solution in two ways: the first sample was obtained by concentrating the filtered extract at low pressure (SLP); the second sample was obtained by ultrafiltration (SUF) using a membrane. In this work, the size exclusion-high-performance liquid chromatography involving viscometry and refractive index detectors was used to determine the molecular

weight and conformation of sericin polypeptides obtained from cocoons of the *Bombyx mori* silkworm. The aggregation processes of silk sericin protein under various isolation conditions from the solution were considered. It was shown that sericin macromolecules are present as a monodisperse polypeptide at low concentrations, which aggregates at concentrations greater than 1–2 mg/ml. The obtained data indicate that, along with the parameters of the extraction process, the conditions for its isolation from the solution, including temperature, pressure and degree of concentration, affect the molecular weight and aggregative behaviour of the protein. The results confirm and complement previously obtained data on the influence of various factors on the association of protein macromolecules in solution. The resulting sericin fractions can find many applications, including materials for tissue engineering, coatings for surface modification, cell culture media, cosmetics, as well as food additives and medical biomaterials.

Keywords: sericin, molecular weight, hydrodynamic radius, aggregation, concentration, ultrafiltration

For citation: Sherova Z. U., Nasriddinov A. S., Kholov Sh. E., Usmanova S. R., Muhidinov Z. K. Molecular weight and molecular weight distribution of sericin protein extracted from cocoon waste of *Bombyx mori*. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(4):547-556. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-4-547-556>.

ВВЕДЕНИЕ

Многолетняя история использования шелковых нитей в хирургии сделала белок шелка широко известным как биосовместимый материал [1–6]. Белок шелка был обнаружен в железах семейства членистоногих, таких как шелкопряды, пауки и пчелы. Тем не менее большинство биоматериалов на основе шелка получают из шелковых нитей тутового шелкопряда *Bombyx mori* из-за его богатого источника, в частности фиброина и серицина [1, 5, 6].

Кроме того, серицин обладает неотъемлемыми биологическими свойствами, что делает возможным его использование в качестве компонента фармацевтических составов с рядом биомедицинских применений, таких как противоопухолевые, противомикробные препараты, антиоксиданты, и в качестве каркасов для восстановления тканей, серицин также принимает участие в молекулярных механизмах, связанных с регуляцией факторов транскрипции, в снижении воспалительных сигнальных молекул, стимуляции апоптоза, миграции и пролиферации мезенхимальных клеток [6–8].

В последнее время регенерированный фиброин шелка представляется одним из наиболее изученных материалов на основе шелка для тканевой инженерии. Однако он требует сложного процесса подготовки и со временем непреодолимо денатурирует до твердого состояния, что является самой большой проблемой для производства в больших масштабах и широкого использования его в качестве коммерческого материала. Результаты недавних исследований [1–4] показали, что серицин в этом плане может заменить фиброин, быть наиболее подходящим биоматериалом для тканевой инженерии. Выявлено, что серицин способен поглощать УФ-излучения в диапазоне 223–300 нм, ингибировать тирозиназу, противостоять свободным радикалам и сохранять набухаемость аналогично гиалуроновой кислоте, что является важным свойством биоматериала для тканевой инженерии. Авторами [1] на основе клеточного эксперимента на фибробластах человека установлено, что серицин (0,05 масс. %) может стимулировать пролиферацию клеток и, очевидно, повышать экспрессию коллагена типа I, коллагена типа III и гиалуронидазы I по сравнению с контролем через 7 дней,

что может вполне заменить регенерированный фиброин шелка.

Серицин шелка (СШ) представляет собой глобулярный водорастворимый белок, составляющий от 25 до 30% массы белка шелка в коконах тутового шелкопряда. Этот белок обволакивает шелковые волокна, склеивая их и обеспечивая сцепление кокона. Серицин – аморфное семейство белков, преимущественно существует в конформации случайного клубка. СШ представляет собой гидрофильный гликопротеин, в основном состоящий из серина, глицина, аспарагиновой и глютаминовой кислот с различными флавоноидами и каротиноидами, которые действуют как гуммирующие агенты [3, 8].

Молекулярная масса серицина колеблется от 20 до 310 кДа, а его структура и молекулярная масса зависят от метода экстракции и способа его очистки из раствора [3]. Серицин, полученный из водорастворимого компонента шелка тутового шелкопряда, состоит из полипептидов с молекулярной массой 60–130 кДа и особенно богат аспарагиновой кислотой и серином с высоким содержанием гидроксильных, карбоксильных и аминокислотных групп. С другой стороны, фиброин шелка (ФШ), основной компонент шелкового волокна, состоит из полипептидов тяжелой и легкой цепей с молекулярной массой 25–350 кДа, а его аминокислотный состав – в основном из глицина, аланина, серина и высокого содержания тирозина [1].

Абсолютная характеристика белков в растворе важна и желательна в различных отраслях промышленности. Например, в фармацевтике или биотехнологии продукты на белковой основе должны быть однородными и без присутствия агрегатов. Было обнаружено, что химическая агрегация молекул тестируемых соединений – одна из причин получения ложноположительных результатов при скрининге свойств многих новых лекарств [9] среди прочих.

Авторы [10] для определения молекулярной массы ФШ применили простой метод – УФ-спектроскопию. Экспериментально найдена прямая зависимость молекулярной массы от оптической плотности водных растворов ФШ при длине волны 275 нм при различных концентрациях. С использованием значения тангенса угла, прямой линии, полученной по этой зависимости, было определе-

но, что молекулярная масса ФШ равна 411,7 кДа, что намного выше приведенных данных, найденных известной аналитической методикой [1–5].

Расшифровка молекулярной основы неправильной укладки и агрегации белка является важным шагом на пути к полному пониманию факторов, вызывающих возникновение нервных заболеваний, и приводит к разработке эффективных терапевтических стратегий [11]. В связи с этим анализ агрегации белка в растворе предлагает отличный инструмент для изучения патологических процессов нарушения правильных конформаций белка в контролируемых условиях.

Арамвит и соавторы [12] продемонстрировали, что метод экстракции шелка в растворах кислоты, щелочи и мочевины влияет на физические (термическое поведение) и биологические свойства (ингибирование ферментов). Серицин, экстрагированный различными методами, имеет разную молекулярную массу: экстрагированный мочевиной показал четкие полосы с молекулярной массой в диапазоне от 10 до >225 кДа; кислотная и щелочная экстракции – различимые полосы в диапазоне 50–150 кДа и 15–75 кДа соответственно. Экстрагированные образцы серицина отличались дзета-потенциалом (плотность заряда на коллоидных частицах) и размерами частиц: серицин, экстрагированный в щелочном растворе, имел самые большие коллоидные частицы, но низкий отрицательный заряд, в то время как средний размер коллоидных частиц серицина, экстрагированного мочевиной, был низким за счет высокого заряда на поверхности коллоидных частиц. Однако серицин, полученный мочевиной, был токсичным по отношению к живым клеткам фибробласта.

А. Куриока и соавторы [13] также сообщили о различиях в активности белка-ингибитора трипсина, когда экстракция проводилась в водном, кислом и щелочном растворах. Широкий диапазон молекулярной массы серицина от 10 до 400 кДа был получен в работах [14, 15] в зависимости от методов экстракции, температуры, pH и времени обработки.

Ю. Такасу и др. [16] охарактеризовали фракции серицина свежих коконов тутового шелкопряда путем растворения белка в насыщенном водном растворе тиоцианата лития, содержащем 2-меркаптоэтанол. Методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) были обнаружены 3 основных полипептида с молекулярной массой 400, 250 и 150 кДа, что соответствует серицину, присутствующему в средней, передней и задней частях шелковой железы.

В работе [17] щелочной электролитный раствор, содержащий серицин, был разделен ультрафильтрацией на ретентат с широким диапазоном высокомолекулярных фракций, составляющим 10 масс. % оболочки кокона. Далее нанофильтрацией фильтрат был разделен на воду и ретентат, содержащий олигопептиды и свободные аминокислоты, которые можно использовать непосредственно в качестве пищевых добавок или биологических питательных сред. Электрофорез SDS-PAGE и высокоэффективная эксклюзионная жидкостная хроматогра-

фия (ВЭЭЖХ) показали, что молекулярная масса этих пептидов серицина находится в диапазоне 0,2–60; 0,2–30 и 0,2–15 кДа.

Существует большое методологическое разнообразие, позволяющее охарактеризовать состояние белка в растворе. Молекулярные зонды, флуоресценция, определение мутности, светорассеяние и другие представляют собой очень распространенные средства для мониторинга конформационного состояния белка в режиме реального времени [11].

Многоугловое лазерное рассеяние света (МУЛС) является абсолютным методом определения молярной массы биополимеров в растворе [18]. Кроме того, это чрезвычайно чувствительный метод для определения того, насколько макромолекулы образовали какие-либо агрегаты, потому что сигнал, полученный от детектора светорассеяния, прямо пропорционален средней молярной массе (M_w) измеряемого образца, умноженной на его концентрацию.

Различные агрегированные состояния белка были разделены на несколько пиков с помощью ВЭЭЖХ, и анализ молекулярного веса этих пиков был определен детектором МУЛС одновременно. Обнаруженные молекулярные массы по МУЛС очень хорошо коррелировали с известными данными для мономера, димера, тримера и высших олигомеров этого белка. Как и ожидалось, в большинстве буферных систем белок вел себя аналогично необработанному контролю [19]. Однако методом МУЛС было обнаружено, что в 2-х разных мобильных фазах молекулярная масса была ниже или выше, чем ожидалось, что свидетельствует о концентрационной или pH зависимой диссоциации или ассоциации белковых субъединиц.

Понимание влияния структурных изменений и взаимодействий белка на механизмы их агрегации может привести к улучшению стратегий снижения агрегации и вязкости раствора. В данной работе исследована ненативная агрегация белка серицина в условиях его выделения из раствора при повышенных концентрациях. Для определения молекулярной массы и конформационных состояний макромолекулы серицина, полученного из отходов коконов тутового шелкопряда, нами был использован метод ВЭЭЖХ с применением вискозиметрического и рефрактометрического детекторов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В эксперименте использовали серицин, экстрагированный 0,5%-м раствором Na_2CO_3 из коконных оболочек тутового шелкопряда *Bombyx mori* при температуре 80 °C и в течение 30 мин с последующей водной экстракцией при температуре 90 °C в течение 3 ч. Выделение серицина из раствора экстракта производилось двумя способами: первый образец получен концентрированием отфильтрованного экстракта 500 мл при низком давлении (НД) на ротационном испарителе, а второй образец – ультрафильтрацией (УФ) такого же объема с применением плоских мембран УАМ 175, характеризующихся отсечками по молекулярной массе 15–20 кДа. Далее в концентрированный раствор

каждого образца определенного объема добавляли этиловый спирт в соотношении 1/3 и оставляли для осаждения серицина на сутки. Конечная концентрация этанола в смеси составила в среднем $60,0 \pm 1,7\%$. Через сутки осадок серицина отделяли центрифугированием, декантировали спиртом, высушивали при комнатной температуре и измельчали на шаровой мельнице. Полученный таким образом белок назван СНД. Концентрат второго образца, названный СУФ, получали так же, как и в первом случае. Спиртовые растворы упаривали досуха и получали спирторастворимые части белка серицина – образцы ССНД и ССУФ соответственно. Из фильтрата после УФ также получен белок, обозначенный как ФУФ.

Молярную массу (M_w) и молекулярно-массовое распределение (ММР) образцов серицина анализировали на ВЭЭЖХ с помощью системы доставки высокого давления (Waters, США), встроенного 2-канального вакуумного дегазатора, последовательно соединенного с дифференциальным вискозиметром модели ViscoStar (Wyatt Technology, США), дифференциальным рефрактометром (RI 2410, Waters, США), двумя эксклюзионными колонками PL-Aquagel OH-60 и OH-40, системой автоматического введения пробы (717 Plus Auto Injector, Waters, США).

Сухие образцы серицина (~2 мг/мл) растворяли в подвижной фазе (0,05 М NaNO_3), центрифугировали при 20 000 г в течение 30 мин и фильтровали через мембранный фильтр (Millex HV 0,22 мкм, Millipore Corp., США). Скорость потока составляла 0,8 мл/мин, а объем инъекции – 100 мкл. Образцы запускали в 3-кратной повторности.

Выход фракции белка из колонки обнаруживали последовательно с помощью детекторов ViscoStar и RI 2410 (Waters, США). Электронные выходы обоих детекторов были подключены к отдельным последовательным портам одного и того же персонального компьютера таким образом, чтобы данные могли одновременно собираться и обрабатываться программным обеспечением ASTRA 5.3.4.20 (Wyatt Technology, США) и Breeze (Waters, США).

Колонки калибровали с использованием серии стандартных образцов Pullulan (Showa Denko K. K., Япония) со значениями M_w 788; 667; 404; 112; 47,3 и 22,8 кДа соответственно [20]. Значения M_w , M_n и M_z для серицина были получены с использованием универсальной калибровки. Среднее значение приращения показателя преломления (равное 0,185 мл/г) от концентрации (dn/dc) было взято из литературы [21].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные образцы серицина представляли собой мягкие, шелковистые на ощупь однородной консистенции порошки и отличались цветом (табл. 1, рис. 1): сконцентрированные вакуум-выпарным способом и выделенные из спиртового осадка СНД сероватого цвета; образец из спиртового раствора ССНД светло-коричневого цвета; образец, полученный после ультрафильтрации и выделенный из спиртового осадка СУФ, сероватого цвета; об-

разец из спиртового раствора ССУФ коричневого цвета, а серицин, полученный из УФ-фильтрата, темно-коричневого цвета.

Таблица 1. Выход фракций серицина, полученного разными способами

Table 1. Yield of the sericin fraction obtained by different methods

Фракции серицина	(г)	Выход (%)
СНД	4,2569	12,16
ССНД	1,3822	3,95
СУФ	0,4054	1,16
ССУФ	1,8654	5,33
ФУФ	3,0637	8,75
Всего	10,9736	31,35



Рис. 1. Образцы серицина
Fig. 1. Sericin samples

Наибольшая фракция белка получена выпариванием раствора экстракта в виде осадка (12,16%) и растворимой в спирте (3,95%) фракцией. Во втором случае при концентрировании раствора экстракта в УФ-ретентате осаждением спиртом выделено всего 1,16% белка, т. к. в процессе УФ основная часть белка (8,75%) прошла через мембрану, это привело к снижению концентрации белка в ретентате и к низкому выходу в спиртовом осадке. Другая часть белка восстановлена из спиртового раствора (5,33%).

На рис. 2 представлены кривые ВЭЭЖХ, полученные из образцов серицина СНД и СУФ, генерируемые программой ASTRA как зависимости молекулярной массы от объема элюирования. Как видно из профиля хроматограммы ВЭЭЖХ, СНД (красная линия) элюируется в виде 2-х пиков с широким ММР, хотя первый большой пик несимметричен и имеет небольшое плечо в начале. Это говорит о том,

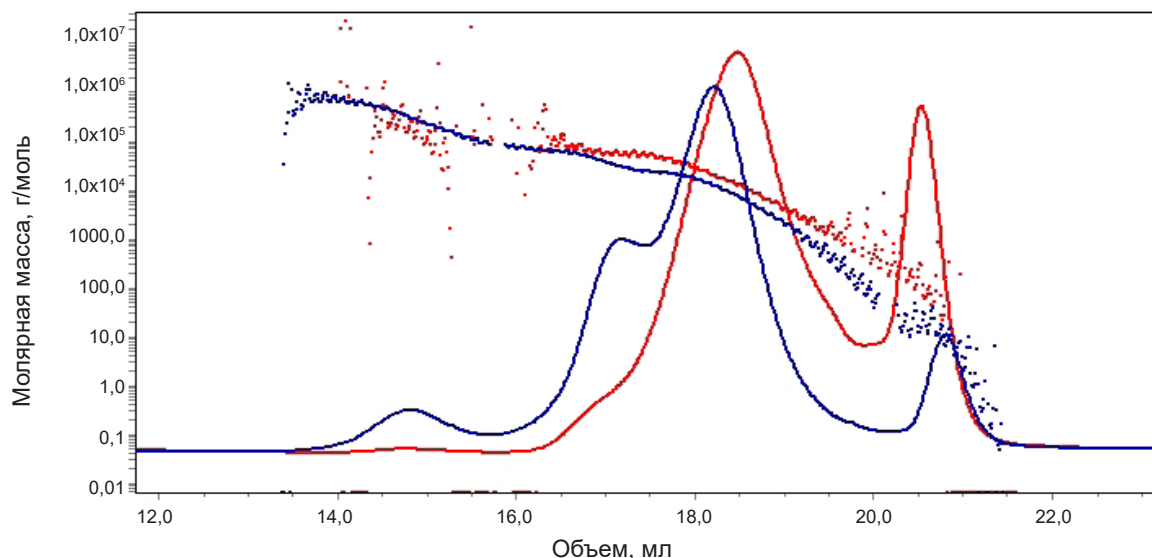


Рис. 2. ВЭЭЖХ профиль элюирования образцов серицина СНД (красная линия) и СУФ (синяя линия) и кривые их молекулярно-массового распределения соответственно

Fig. 2. HPSEC profile of elution of sericin samples SLP (red line) and SUF (blue line) and molecular weight distribution curves, respectively

что в данном образце имеется и третья фракция в небольшом количестве. В то время как профиль элюирования образца СУФ продемонстрировал более четкое разделение 4-х фракций полипептидов серицина в более широкое полимодальное распределение по MMP.

Представленная картина распределения белка по фракциям хорошо видна на кривых дифференциальной зависимости массовой фракции белка от их молекулярной массы (рис. 3), полученной с помощью программы ASTRA. Основная доля фракции полипептидов приходится на среднюю фракцию с молекулярной массой около 20 кДа. ВЭЭЖХ, хроматографический анализ молекулярной массы и MMP серицина, полученный ультрафильтрацией

СУФ при комнатной температуре по сравнению с образцом СНД, полученным вакуум-выпариванием при температуре 50–60 °С, указывают на большой диапазон распределений макромолекул белка по массе. Значения M_w варьируются от менее 1 до более 600 кДа, что указывает на очень широкое распределение значений молекулярной массы в первом образце по сравнению со вторым.

Детальный анализ результатов ВЭЭЖХ, полученных с помощью программы ASTRA, приводится в табл. 2, где представлен выход агрегированных частиц (микрогель – MG, %), полученных центрифугированием исходного раствора белка (2 мг/мл), выход образца из хроматографической колонки (R, %), средневесовая молекулярная масса (M_w , кДа),

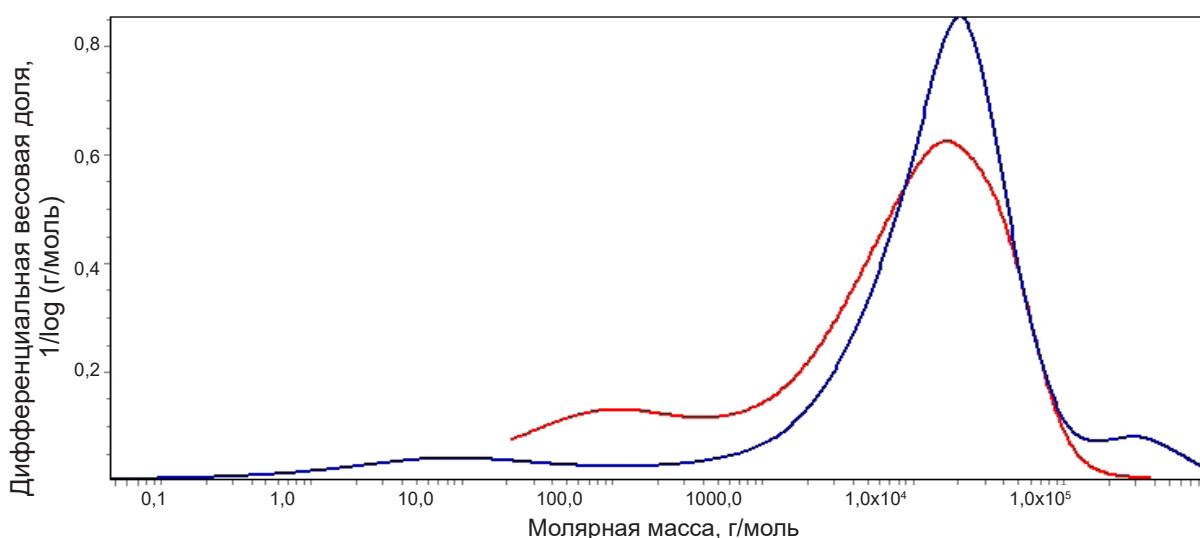


Рис. 3. Дифференциальные кривые распределения образцов серицина СНД (красная линия) и СУФ (синяя линия) по молекулярной массе

Fig. 3. Differential curves of the molecular weight distribution of sericin samples: SLP (red line) and SUF (blue line)

значения полидисперсности для каждой фракции полимера (M_w/M_n), характеристическая вязкость ($[\eta]$) и гидродинамический радиус ($R_h(w)$).

Таблица 2. Выход агрегированных частиц (микродель – MG, %) и образца из хроматографической колонки (R, %), средневесовая молекулярная масса (M_w , кДа), значения полидисперсности (M_w/M_n), характеристическая вязкость ($[\eta]$, мл/г) и гидродинамический радиус ($R_h(w)$, нм) образцов серицина

Table 2. Yield of aggregated particles (microgel – MG, %) and the samples from the chromatographic column (R, %), weight average molecular weight (M_w , kDa), polydispersity index (M_w/M_n), intrinsic viscosity ($[\eta]$, ml/g) and hydrodynamic radius ($R_h(w)$, nm) of sericin samples

Образцы серицина	MG, %	R, %	M_w , кДа	M_w/M_n	$[\eta]$, мл/г	$R_h(w)$, нм
СНД Пик-1		0,10	202,7	1,12	117,6	15,1
СНД Пик-2	39,22	44,30	19,38	3,4	5,7	2,4
СНД Пик-3		15,60	1,74	1,94	0,8	0,3
СУФ Пик -1		3,53	296,8	1,38	69	14,7
СУФ Пик-2	25,34	40,90	19,8	6,1	15	3,4
СУФ Пик-3		4,90	0,12	1,9	2,9	0,2
ССУФ	29,56	72,00	53,10	2,16	7,90	3,30
ФУФ	31,84	63,50	32,90	5,66	3,20	1,90

Значения характеристической вязкости и гидродинамического радиуса для первого образца ССУФ изменялись в соответствии с их M_w . Однако высокое значение индекса полидисперсности, низкие значения характеристической вязкости и гидродинамического радиуса для второго образца ФУФ говорят о его высокой степени агрегации, скорее возникшей при сушке раствора фильтрата.

Все полученные образцы имели высокий процент агрегированных либо денатурированных фракций при нейтральном pH в растворе подвижной фазы (0,05 M NaNO₃), которые были получены с помощью центрифугирования раствора до введения их в колонку ЭЖХ и составили 39,22; 25,34; 29,56 и 31,84% для образцов СНД, СУФ, ССУФ и ФУФ соответственно. Среди данных образцов серицина фракции СНД, выделенные водно-спиртовым раствором, и растворимая фракция в этой смеси имели наибольшее количество агрегированных фракций.

Как и следовало ожидать, из данных, приведенных в табл. 2, оба образца серицина выделяются спиртом в виде 3-х макромолекулярных популяций, которые элюируются при различных объемах (время удерживания на эксклюзивных сорбентах в колонке). Высокомолекулярные (пик 1) и низкомолекулярные фракции (пик 3) представляли небольшую долю макромолекулы белка, молекулярная масса которых соответственно была 202,7 и 1,74 кДа для образца СНД и 296,8 и 0,12 кДа для образца СУФ соответственно. Высокомолекулярные фракции также отличались высокими значениями

характеристической вязкости и гидродинамического радиуса, в то время как низкомолекулярные фракции имели низкие значения этих параметров. Согласно известным данным [1], эти фракции можно отнести к полипептидам тяжелой и легкой цепей макромолекулы ФШ, которые сопутствуют серицину при экстракции.

Основная часть фракции полипептидов серицина, выделенная разными методами, приходится на фракцию, которая элюировалась вторым пиком для обоих образцов и составляла 44,3 и 40,9% от исходного количества растворенного белка серицина. Эти фракции почти не отличались по M_w , полидисперсности и гидродинамическим характеристикам. M_w для этих фракций была почти одинаковой (19,4 и 19,8 кДа), хотя оба образца полидисперсные в отличие от высоко- и низкомолекулярных фракций.

Растворимая в водно-спиртовом растворе фракция представляла собой полипептид с $M_w = 53,1$ кДа и мономодальным ММР. Фракция серицина, прошедшая через мембранный фильтр с пропускающими по массе макромолекулами менее 20 кДа, отличалась от предыдущей фракции полидисперсностью и имела $M_w = 32,9$ кДа. Значения характеристической вязкости и гидродинамического радиуса для первого образца ССУФ изменялись в соответствии с их M_w . Однако высокое значение индекса полидисперсности, низкие значения характеристической вязкости и гидродинамического радиуса для второго образца ФУФ говорят о его высокой степени агрегации, возникшей, скорее всего, при сушке раствора фильтрата.

Биологические свойства, состав и молекулярный размер серицина зависят от метода его получения, а также, как показали данные настоящей работы, и от способа его выделения из раствора. Серицин является своего рода природным водорастворимым белком, его растворимость в растворе зависит от наличия поверхностных гидрофильных групп. При добавлении этанола, который является менее полярным растворителем, чем вода, сначала снижается растворимость высокомолекулярных фракций, происходит их коагуляция, которая захватывает с собой часть и других макромолекул. Данный метод выделения белка является более мягким процессом и широко используется в промышленности, имеет ряд преимуществ по сравнению с низкотемпературными и кислотными методами [22].

Как было показано ранее, серицин, экстрагированный различными методами, имеет разную молекулярную массу: экстрагированный мочевиной показал четкие полосы с молекулярной массой в диапазоне от 10 до >225 кДа; кислотная и щелочная экстракции – полосы в диапазоне 50–150 кДа и 15–75 кДа; экстракция водным раствором тиоцианата лития – 3 основных полипептида с молекулярной массой 400, 250 и 150 кДа соответственно [12–16].

Кроме того, в данной работе нами была оценена форма молекул серицина СНД и СУФ в растворе на основе их молярных масс и гидродинамических радиусов, полученных из характеристической вязкости с помощью программы ASTRA. Наклон кривой

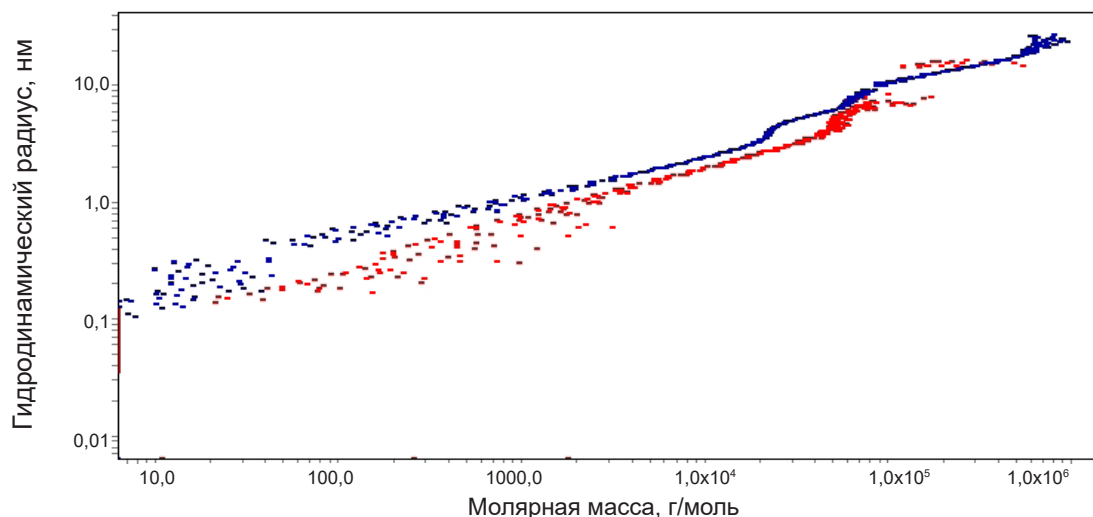


Рис. 4. Зависимость гидродинамического радиуса ($R_h(w)$) от молекулярной массы (конформационный график)

Fig. 4. Hydrodynamic radius ($R_h(w)$) versus molecular weight (conformation plot)

на этом графике (рис. 4) позволяет оценить форму макромолекулы белка [23]. Для серицина СНД и СУФ наклон, равный 0,23 и 0,26 соответственно, указывает на свернутую конформацию белка в сферической форме, что еще раз подтверждает агрегацию данного белка в растворе при исследуемых концентрациях (1–2 мг/мл).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты, полученные в данной работе, подтверждают и дополняют сведения о влиянии различных факторов на ассоциацию белковых макромолекул в растворе. Наши данные указывают на то, что не только параметры процесса экстракции серицина шелка влияют на молекулярную массу и агрегативное поведение белка, но и на условия выделения его из раствора, вклю-

чая температуру, давление и степень концентрирования на УФ-мембране. Как видно из полученных данных, полипептиды серицина присутствуют в виде изолированной β -конформации в низких концентрациях, они агрегированы в концентрациях более 1–2 мг/мл. Данные хорошо согласуются с результатами, полученными другими авторами в работах, которые приводятся во введении.

Производимые таким образом белковые продукты могут найти множество применений, включая материалы для тканевой инженерии, покрытий для модификации поверхности, среды для культивирования клеток и в качестве пищевых добавок. Низкомолекулярные продукты переработки шелковых отходов можно использовать непосредственно в продуктах здорового питания, косметике и медицинских биоматериалах.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Su D., Ding S., Shi W., Huang X., Jiang L. *Bombyx mori* silk-based materials with implication in skin repair: Sericin versus regenerated silk fibroin // *Journal of Biomaterials Applications*. 2019. Vol. 34, no. 1. P. 36–46. <https://doi.org/10.1177/0885328219844978>.
2. Das G., Shin H. S., Campos E. V. R., Fraceto L. F., Rodriguez-Torres M. P., Mariano K. C. F., et al. Sericin based nanoformulations: a comprehensive review on molecular mechanisms of interaction with organisms to biological applications // *Journal of Nanobiotechnology*. 2021. Vol. 19. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00774-y>.
3. Costa F., Silva R., Boccacini A. Fibrous protein-based biomaterials (silk, keratin, elastin, and resilin proteins) for tissue regeneration and repair // *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair*. 2018. P. 175–204. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100803-4.00007-3>.
4. Yin Z., Kuang D., Wang S. Swellable silk fibroin microneedles for transdermal drug delivery // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017. Vol. 106. P. 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.178>.
5. Jena K., Pandey J. P., Kumari R. Tasar silk fiber waste sericin: new source for anti-elastase, anti-tyrosinase and anti-oxidant compounds // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. Vol. 114. P. 1102–1108. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.058>.
6. Kunz R. I., Brancalho R. M., Ribeiro L. F., Natali M. R. M. Silkworm sericin: properties and biomedical applications // *BioMed Research International*. 2016. P. 8175701. <https://doi.org/10.1155/2016/8175701>.
7. Noosak C., Jantorn P., Meesane J., Voravuthikunchai S., Saeloh D. Dualfunctional bioactive silk sericin for osteoblast responses and osteomyelitis treatment // *Plos One*. 2022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264795>.
8. Kumar M., Janani G., Fontaine M. J., Kaplan D. L., Mandal B. B. Silk-based encapsulation materials to enhance pancreatic cell functions // *Transplantation, Bioengineering, and Regeneration of the Endocrine Pancreas*. 2020. Vol. 2. P. 329–337. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814831-0.00024-5>.
9. Inoue S., Tsuda H., Tanaka T. Nanostructure of natural fibrous protein: in vitro nanofabric formation

of *Samia cynthia ricini* wild silk fibroin by self-assembling // Nano Letters. 2003. Vol. 3, no. 10. P. 1329–1332. <https://doi.org/10.1021/nl0340327>.

10. Eshchanov K., Baltayeva M. Determination of the molecular mass of hydrolyzed fibroin obtained from natural silk fibroin by spectrophotometry // Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry. 2022. Vol. 9, no. 1. P. 115–120. <https://doi.org/10.18596/jotcsa.969482>.

11. Villar-Piqué A., Schmitz M., Candelise N., Ventura S., Llorens F., Zerr I. Molecular and clinical aspects of protein aggregation assays in neurodegenerative Diseases // Molecular Neurobiology. 2018. Vol. 55. P. 7588–7605. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0926-y>.

12. Aramwit P., Damringasakkul S., Kanokpanont S., Srichana T. Properties and anti-tyrosinase activity of sericin from various extraction methods // Biotechnology and Applied Biochemistry. 2010. Vol. 55. P. 91–98. <http://doi.org/10.1042/BA20090186>.

13. Kurioka A., Kurioka F., Yamazaki M. Characterization of sericin powder prepared from citric acid degraded sericin polypeptides of silkworm, *Bombyx mori* // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2004. Vol. 68, no. 4. P. 774–780. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.774>.

14. Aramwit P., Sirtientong T., Srichana T. Potential applications of silk sericin a natural protein from textile industry by-products // Waste Management & Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy. 2012. Vol. 30, no. 3. P. 217–224. <https://doi.org/10.1177/0734242X11404733>.

15. Gimenes M. L., Silva V. R., Vieira M. G. A., Silva M. G. C., Scheer A. P. High molecular sericin from *Bombyx mori* cocoons: extraction and recovering by ultrafiltration // International Journal of Chemical Engineering and Applications. 2014. Vol. 5, no. 3. P. 266–271. <https://doi.org/10.7763/IJCEA.2014.V5.391>.

16. Takasu Y., Yamada H., Tsubouchi K. Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori* // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 2002. Vol. 66, no. 12. P. 2715–2718. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.2715>.

17. Wu M.-H., Yue J.-X., Zhang Y.-Q. Ultrafiltration recovery of sericin from the alkaline waste of silk floss processing and controlled enzymatic hydrolysis // Journal of Cleaner Production. 2014. Vol. 76. P. 154–160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.03.068>.

18. Some D., Amartely H., Tsadok A., Lebendiker M. Characterization of proteins by size-exclusion chromatography coupled to multi-angle light scattering (SEC-MALS) // Journal of Visualized Experiments. 2019. Vol. 148. P. e59615. <https://doi.org/10.3791/59615>.

19. Barnett G. V., Perhacs J. M., Das T. K., Kar S. R. Submicron protein particle characterization using resistive pulse sensing and conventional light scattering based approaches // Pharmaceutical Research. 2018. Vol. 35, no. 58. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2306-0>.

20. Muhidinov Z. K., Teshaev Kh., Jonmurodov A., Khalikov D., Fishman M. Physico-chemical characterization of pectic polysaccharides from various sources obtained by steam assisted flash extraction (SAFE) // Macromolecular Symposia. 2012. Vol. 317-318, no. 1. P. 142–148. <https://doi.org/10.1002/masy.201100108>.

21. Strop P., Brunger A. T. Refractive index-based determination of detergent concentration and its application to the study of membrane proteins // Protein Science: a Publication of the Protein Society. 2005. Vol. 14, no. 8. P. 2207–2211. <http://doi.org/10.1110/ps.051543805>.

22. Da Silva T. L., Da Silva Junior A. C., Ribani M., Vieira M. G. A., Gimenes M. L., Da Silva M. G. C. Evaluation of molecular weight distribution of sericin in solutions concentrated via precipitation by ethanol and precipitation by freezing/thawing // Chemical Engineering Transactions. 2014. Vol. 38. P. 103–108. <http://doi.org/10.3303/CET1438018>.

23. Насриддинов А. С., Ашуров А. И., Холов Ш. Ё., Исмоилов И. Б., Усманова С. Р., Мухидинов З. К. Самоагрегирующие свойства инулина в разбавленном растворе // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 1. С. 38–49. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-1-38-49>.

REFERENCES

1. Su D., Ding S., Shi W., Huang X., Jiang L. *Bombyx mori* silk-based materials with implication in skin repair: Sericin versus regenerated silk fibroin. *Journal of Biomaterials Applications*. 2019;34(1):36-46. <https://doi.org/10.1177/0885328219844978>.

2. Das G., Shin H. S., Campos E. V. R., Fraceto L. F., Rodriguez-Torres M. P., Mariano K. C. F., et al. Sericin based nanoformulations: a comprehensive review on molecular mechanisms of interaction with organisms to biological applications. *Journal of Nanobiotechnology*. 2021;19. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00774-y>.

3. Costa F., Silva R., Boccaccini A. Fibrous protein-based biomaterials (silk, keratin, elastin, and resilin proteins) for tissue regeneration and repair. *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair*. 2018;175-204. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100803-4.00007-3>.

4. Yin Z., Kuang D., Wang S. Swellable silk fibroin microneedles for transdermal drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;106:48-56. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.178>.

5. Jena K., Pandey J. P., Kumari R. Tasar silk fiber waste sericin: new source for anti-elastase, anti-tyrosinase and anti-oxidant compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;114:1102-1108. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.058>.

6. Kunz R. I., Brancalhão R. M., Ribeiro L. F., Natali M. R. M. Silkworm sericin: properties and biomedical applications. *BioMed Research International*. 2016;8175701. <https://doi.org/10.1155/2016/8175701>.

7. Noosak C., Jantorn P., Meesane J., Voravuthikunchai S., Saeloh D. Dualfunctional bioactive silk sericin for osteoblast responses and osteomyelitis treatment. *Plos One*. 2022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264795>.

8. Kumar M., Janani G., Fontaine M. J., Kaplan D. L., Mandal B. B. Silk-based encapsulation materials to enhance pancreatic cell functions. *Transplantation, Bioengineering, and Regeneration of the Endocrine Pancreas*. 2020;2:329-337. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814831-0.00024-5>.
9. Inoue S., Tsuda H., Tanaka T. Nanostructure of natural fibrous protein: in vitro nanofabric formation of *Samia cynthia ricini* wild silk fibroin by self-assembling. *Nano Letters*. 2003;3(10):1329-1332. <https://doi.org/10.1021/nl0340327>.
10. Eshchanov K., Baltayeva M. Determination of the molecular mass of hydrolyzed fibroin obtained from natural silk fibroin by spectrophotometry. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*. 2022;9(1):115-120. <https://doi.org/10.18596/jotcsa.969482>.
11. Villar-Piqué A., Schmitz M., Candelise N., Ventura S., Llorens F., Zerr I. Molecular and clinical aspects of protein aggregation assays in neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*. 2018;55:7588-7605. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0926-y>.
12. Aramwit P., Damringasakkul S., Kanokpanont S., Srichana T. Properties and anti-tyrosinase activity of sericin from various extraction methods. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2010;55:91-98. <http://doi.org/10.1042/BA20090186>.
13. Kurioka A., Kurioka F., Yamazaki M. Characterization of sericin powder prepared from citric acid degraded sericin polypeptides of silkworm, *Bombyx mori*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2004;68(4):774-780. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.774>.
14. Aramwit P., Sirtientong T., Srichana T. Potential applications of silk sericin a natural protein from textile industry by-products. *Waste Management & Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy*. 2012;30(3):217-224. <https://doi.org/10.1177/0734242X11404733>.
15. Gimenes M. L., Silva V. R., Vieira M. G. A., Silva M. G. C., Scheer A. P. High molecular sericin from *Bombyx mori* cocoons: extraction and recovering by ultrafiltration. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. 2014;5(3):266-271. <https://doi.org/10.7763/IJCEA.2014.V5.391>.
16. Takasu Y., Yamada H., Tsubouchi K. Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2002;66(12):2715-2718. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.2715>.
17. Wu M.-H., Yue J.-X., Zhang Y.-Q. Ultrafiltration recovery of sericin from the alkaline waste of silk floss processing and controlled enzymatic hydrolysis. *Journal of Cleaner Production*. 2014;76:154-160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.03.068>.
18. Some D., Amartely H., Tsadok A., Lebendiker M. Characterization of proteins by size-exclusion chromatography coupled to multi-angle light scattering (SEC-MALS). *Journal of Visualized Experiments*. 2019;148:e59615. <https://doi.org/10.3791/59615>.
19. Barnett G. V., Perhacs J. M., Das T. K., Kar S. R. Submicron protein particle characterization using resistive pulse sensing and conventional light scattering based approaches. *Pharmaceutical Research*. 2018;35(58). <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2306-0>.
20. Muhidinov Z. K., Teshayev Kh., Jonmurodov A., Khalikov D., Fishman M. Physico-chemical characterization of pectic polysaccharides from various sources obtained by steam assisted flash extraction (SAFE). *Macromolecular Symposia*. 2012;317-318(1):142-148. <https://doi.org/10.1002/masy.201100108>.
21. Strop P., Brunger A. T. Refractive index-based determination of detergent concentration and its application to the study of membrane proteins. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*. 2005;14(8):2207-2211. <http://doi.org/10.1110/ps.051543805>.
22. Da Silva T. L., Da Silva Junior A. C., Ribani M., Vieira M. G. A., Gimenes M. L., Da Silva M. G. C. Evaluation of molecular weight distribution of sericin in solutions concentrated via precipitation by ethanol and precipitation by freezing/thawing. *Chemical Engineering Transactions*. 2014;38:103-108. <http://doi.org/10.3303/CET1438018>.
23. Nasriddinov A. S., Ashurov A. I., Kholov Sh. E., Ismoilov I. B., Usmanova S. R., Mukhidinov Z. K. Self-aggregating properties of inulin in a dilute solution. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Bio-tekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(1):38-49. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-1-38-49>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

З. У. Шерова,
докторант,
Институт химии им. В. И. Никитина НАН
Республики Таджикистан,
734065, г. Душанбе, ул. Айни, 299/2,
Республика Таджикистан,
sh.zamira_95@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0387-6297>

А. С. Насриддинов,
к.х.н., докторант,
Институт химии им. В. И. Никитина НАН
Республики Таджикистан,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Zamira U. Sherova,
Doctoral Student,
V. I. Nikitin Institute of Chemistry NAS
of the Republic of Tajikistan,
299/2, Aini St., 734063, Dushanbe,
Republic of Tajikistan,
sh.zamira_95@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0387-6297>

Abubakr S. Nasriddinov,
Cand. Sci. (Chemistry), Doctoral Student,
V. I. Nikitin Institute of Chemistry NAS
of the Republic of Tajikistan,

734065, г. Душанбе, ул. Айни, 299/2,
Республика Таджикистан,
abubakr2583@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9897-2451>

Ш. Ё. Холов,
к.т.н., ведущий научный сотрудник,
Институт химии им. В. И. Никитина НАН
Республики Таджикистан,
734065, г. Душанбе, ул. Айни, 299/2,
Республика Таджикистан,
shavkat.kholov@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5601-3255>

С. Р. Усманова,
к.х.н., ведущий научный сотрудник,
Институт химии им. В. И. Никитина НАН
Республики Таджикистан,
734065, г. Душанбе, ул. Айни, 299/2,
Республика Таджикистан,
surayo.usmanova@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-4254-7699>

З. К. Мухидинов,
д.х.н., профессор, главный научный сотрудник,
Институт химии им. В. И. Никитина НАН
Республики Таджикистан,
734065, г. Душанбе, ул. Айни, 299/2,
Республика Таджикистан,
zainy@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0023-2229>

299/2, Aini St., 734063, Dushanbe,
Republic of Tajikistan,
abubakr2583@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9897-2451>

Shavkat E. Kholov,
Cand. Sci. (Engineering), Leading Researcher,
V. I. Nikitin Institute of Chemistry NAS
of the Republic of Tajikistan,
299/2, Aini St., 734063, Dushanbe,
Republic of Tajikistan,
shavkat.kholov@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5601-3255>

Surayo R. Usmanova,
Cand. Sci. (Chemistry), Leading Researcher,
V. I. Nikitin Institute of Chemistry NAS
of the Republic of Tajikistan,
299/2, Aini St., 734063, Dushanbe,
Republic of Tajikistan,
surayo.usmanova@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-4254-7699>

Zayniddin K. Muhidinov,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Chief Researcher,
V. I. Nikitin Institute of Chemistry NAS of the
Republic of Tajikistan,
299/2, Aini St., 734063, Dushanbe,
Republic of Tajikistan,
zainy@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0023-2229>

Вклад авторов

З. У. Шерова – проведение экспериментов; обработка полученных данных.
А. С. Насриддинов – научное руководство; получение и обработка полученных данных.
Ш. Ё. Холов – проведение экспериментов; обработка полученных данных.
Усманова С. Р. – концепция исследования; доработка текста.
З. К. Мухидинов – научное руководство; концепция исследования; развитие методологии; итоговые выводы.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 30.09.2022.
Одобрена после рецензирования 23.10.2022.
Принята к публикации 30.11.2022.

Contribution of the authors

Z. U. Sherova – conducting experiments; processing of received data.
A. S. Nasriddinov – scientific leadership; receiving and processing of received data.
Sh. E. Kholov – conducting experiments; processing of received data.
S. R. Usmanova – research concept; text revision.
Z. K. Muhidinov – scientific leadership; research concept; methodology development; final conclusions.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Information about the article

The article was submitted 30.09.2022.
Approved after reviewing 23.10.2022.
Accepted for publication 30.11.2022.