

## ВПЛИВ ДЕЯКИХ ФАКТОРІВ НА ЕФЕКТИВНІСТЬ ЕКСТРАКЦІЇ КЕРАТИНІВ ВОВНЯНИХ ВОЛОКОН РІЗНОГО ТИПУ

В. Гавриляк, В. Михалюк\*

*Інститут біології тварин НААН України  
вул. В. Стуса, 38, Львів 79034, Україна  
e-mail: vasylyna.v.m@gmail.com*

Протеїни протягом багатьох років перебувають у центрі інтенсивних досліджень. Кератини – високоспеціалізовані фібрилярні протеїни, які дедалі більше використовуються для створення біоматеріалів медичного та біотехнологічного призначення. Досліджували вплив різних чинників на ефективність екстракції кератинів із вовняних волокон різної морфологічної будови. Встановлено, що дитіотреїтол є ефективнішим відновником, ніж 2-меркаптоетанол, а час екстракції в діапазоні 24–72 год і тип вовняних волокон суттєво не впливають на її ефективність. Результати електрофорезу за денатурувальних умов показали, що екстраговані кератини розділяються на 2 поліпептидні ланцюги із молекулярною масою в діапазоні 40–50 кДа та протеїни з молекулярною масою 10–30 кДа. Обраний спосіб екстракції забезпечує отримання мікрофібрилярних протеїнів із вовняних волокон. Отримані результати дають змогу вдосконалити методи і запропонувати нові схеми отримання кератинів, які послугують базою для створення біопрепаратів функціонального призначення.

*Ключові слова:* вовна, кератини, екстракція, дитіотреїтол, 2-меркаптоетанол.

Протеїни використовуються як біоматеріали для створення імплантів та носіїв ліків, для тканинної інженерії. Одним із найкраще досліджених протеїнів є колаген. Отримують біоматеріали і на основі еластину, фібриногену, фібронектину, фіброїну [1-2].

Упродовж останніх років увагу дослідників привернули кератини, які дедалі більше використовують як стартовий матеріал для створення біоматеріалів для медицини та біотехнологій. У літературі описані різноманітні способи виділення кератинів, проте їх неможливо отримати в нативному вигляді через велику кількість внутрішньомолекулярних і міжмолекулярних дисульфідних зв'язків [3]. Загалом ступінь екстракції кератинів і збереження їхніх властивостей залежать від низки чинників [4].

Тому мета наших досліджень полягала у порівнянні ефективності екстракції кератинів із вовняних волокон різної будови залежно від її тривалості й відновника.

### Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугували зразки вовняних волокон різних типів: тонкі (середній діаметр волокон 18 мкм), кросбредні (середній діаметр волокон 34 мкм) і напівгрубі остьові (середній діаметр волокна – 77,5 мкм). Волокна промивали у нейтральному мийному розчині, ретельно споліскували та висушували. Поверхневі ліпіди екстрагували в апараті Сокслетта тетрахлорметаном упродовж 5 годин.

Екстракцію кератину проводили за методом, описаним Nakamura [5]. Волокна поміщали у 25 мМ трис-НСІ буфер (рН 8,5), який містив 2,6 М тіосечовину, 5 М сечовину за температури 50 °С впродовж 24, 48 та 72 год. Як відновник використовували низькомолекулярні спирти 2-меркаптоетанол (2-МЕ) та дитіотреїтол (ДТТ). Після фільтрування розчин діалізували протягом 3 діб проти дейонізованої води та центрифугували при 12 000 g протягом 20 хв. Для визначення вмісту протеїну в супернатанті застосовували колори-

метричний метод з використанням реагента Бредфорда [6]. Концентрацію протеїну визначали за калібрувальним графіком, побудованим за стандартними розчинами сироваткового альбуміну фірми «Sigma». Електрофорез протеїнів проводили в 12,5 % поліакриламідному гелі в денатурувальних умовах з додецилсульфатом Na (ДСН) у буферній системі Леммлі [7]. Протеїни у гелі фарбували за допомогою 0,2 % Кумасі R-250 та відмивали розчином, що містив 7 % оцтову кислоту і 40 % етанол.

Статистичний аналіз результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними групами при  $P < 0,05$ .

### Результати та їхнє обговорення

Оскільки для створення біоматеріалів необхідні кератини зі збереженими природними властивостями, то актуальною є їхня цілеспрямована екстракція шляхом розриву міжмолекулярних дисульфідних зв'язків при збереженні ковалентних зв'язків поліпептидного ланцюга.

У результаті проведених досліджень із вовняних волокон різної будови були отримані водні розчини кератинів, при цьому до складу екстракційного середовища входила сечовина (для розриву нековалентних зв'язків), ДСН (для руйнування сильних міжмолекулярних взаємодій) та 2-МЕ і ДТТ (для розщеплення дисульфідних зв'язків) за рН 8,5. Як відомо, оптимальний діапазон рН, прийнятий для екстракції кератинів, є в межах 6,5–8,5, оскільки кератини не можуть розчинитися в кислому рН і, ймовірно, піддаються розкладу при лужному рН [8].

Результати проведених досліджень засвідчили, що за використання 2-МЕ вміст розчинного протеїну в екстрактах вовняних волокон коливався в межах 3,13–3,85 мг/мл (рис. 1). Характерно, що ефективність екстракції за цих умов суттєво не залежала від її тривалості, а також від морфології вовни за винятком кросбредних волокон за умов їх екстрагування впродовж 48 год за температури 50 °С.

Для порівняння впливу різних відновників на ефективність екстракції протеїнів із вовняних волокон ми замінили 2-МЕ на ДТТ. Як видно з рис. 2, за використання в екстракційній суміші дитіотреїтолу ефективність екстракції кератинів зросла більш ніж удвічі ( $P < 0,05$ – $0,001$ ), а вміст розчинного протеїну залежно від типу вовняного волокна змінювався в межах 7,15–7,83 мг/мл.



Рис. 1. Вміст розчинного протеїну в екстракті за використання 250 мМ 2-МЕ, мг/мл. Рис. 2. Вміст розчинного протеїну в екстракті за використання 250 мМ ДТТ, мг/мл.

**Примітка.** \* — різниці достовірні залежно від тривалості екстракції.

У результаті проведених досліджень також з'ясувалося, що для тонких вовняних волокон оптимальна тривалість екстракції становила 48 год, а для значно грубших, остьових

волокон — 72 год. Характерно, що для кросбредних волокон час екстракції суттєво не впливав на її ефективність.

Для електрофоретичного аналізу ми використали екстракт кератинів, отриманий після обробки вовняних волокон ДТТ за наявності тіосечовини та сечовини. Для розділення протеїнів був обраний варіант електрофорезу, запропонований Леммлі.

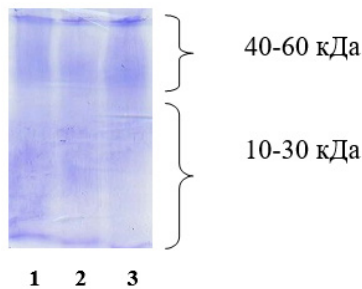


Рис. 3 — Електрофоретичний профіль кератинів, виділених із вовняних волокон різного типу після 48 год екстракції за умов використання ДТТ та температури 50 °С: 1— тонке волокно; 2— кросбредне; 3 — остьове.

Результати електрофорезу за денатурувальних умов показали, що екстраговані кератини розділяються на два поліпептидні ланцюги із молекулярною масою в діапазоні 40–50 кДа, які відповідають типу I і типу II протеїнів інтермедіальних філаментів (рис. 3). У низькомолекулярній ділянці виявлено смуги протеїнів із молекулярною масою 10–30 кДа – це кератин-асоційовані протеїни, які формують матрикс волокна. Отже, незалежно від морфологічної будови досліджуваних нами волокон, запропонований спосіб їх солюбілізації дав змогу отримати фракції мікрофібрилярних протеїнів, які є матрицею для створення нових кератиновмісних біокомпозитів [9].

Підсумовуючи результати досліджень, можна стверджувати, що використання в екстракційній суміші ДТТ замість 2-МЕ удвічі ефективніше, тому вибір відповідного відновника є суттєвим чинником у впливі на ефективність екстракції, ніж її тривалість. Обраний спосіб екстракції забезпечує отримання мікрофібрилярних протеїнів, які використовуються для створення біоматеріалів функціонального призначення.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Gupta P., Nayak K. K. Characteristics of protein-based biopolymer and its application // *Polymer Eng. Sci.* 2014. doi:10.1002/pen.23928
2. Chen P.-Y., McKittrick J., Meyers M. A. Biological materials: functional adaptations and bio-inspired designs // *Progress in Material Sciences.* 2012. Vol. 57. P. 1492–1704.
3. Naito S., Arai K. Type and location of SS linkages in human hair and their relation to fiber properties in water // *Journ. App. Polym. Sci.* 1996. Vol. 61. P. 1918–2113.
4. Inoue T., Kizawa K., Ito M. Characterization of soluble protein extracts from keratinized tissues: identification of ubiquitin universally distributed in hair, nail and stratum corneum // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001. Vol. 65, № 4. P. 895–900.
5. Nakamura A., Arimoto M., Takeuchi K., Fujii T. A rapid extraction procedure of human hair proteins and identification of phosphorylated species // *Biol. Pharm. Bull.* 2002. Vol. 25. P. 569.
6. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.
7. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub> // *Nature.* 1970. Vol. 227, № 1. P. 680–685.
8. Kakkar P., Madhan B., Shanmugan G. Extraction and characterization of keratin from bovine hoof. 2014. Vol. 3:596. doi:10.1186/2193-1801-3-596.
9. Li J., Liu X., Zhang J. Synthesis and characterization of wool keratin/hydroxyapatite nanocomposite // *Journ. Biomed. Materials Research. Part B. Applied Biomaterials.* 2012. Vol. 100 B, № 4. P. 896–902.

## IMPACT OF CERTAIN FACTORS ON THE EXTRACTION OF WOOL FIBER KERATINS OF DIFFERENT TYPES

V. Havrylyak, V. Mykhalyuk\*

*Institute of Animal Biology, NAAS of Ukraine*

*38, Vasyl Stus St., Lviv 79034, Ukraine*

*e-mail: vasylyna.v.m@gmail.com*

Keratins are highly fibrous proteins that are increasingly used to create biomaterials for medical and biotechnological application. We investigated the influence of various factors on the efficiency of extraction of keratins from wool fibers with different morphological structure. The results demonstrated that the dithiothreitol reducing agent is more effective than 2-mercaptoethanol and its performance is not affected by the extraction time in the range of 24-72 hours as well as type of wool fibers. The results of electrophoresis under denaturational conditions showed that extracted keratins divided into two polypeptide chains with molecular weight in the range of 40-50 kDa, which correspond to the type I and type II of intermediate filaments proteins. The protein groups with molecular weight of 10-30 kDa have been detected in the field of low molecular weight. There were keratin-associated proteins. The method of extraction provides a mode of the extraction of microfiber proteins from wool fibers. The results contributed the improvement of the existing methods and offer new patterns of keratins, which serve as the foundation of the development of functionally useful biological substances.

*Keywords:* wool, keratin, extraction, dithiothreitol, 2-mercaptoethanol.

## ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКЦИИ КЕРАТИНА ШЕРСТЯНОГО ВОЛОКНА

В. Гавриляк, В. Михалюк \*

*Институт биологии животных НААН Украины*

*ул. В. Стуса, 38, Львов 79034, Украина*

*e-mail: vasylyna.v.m@gmail.com*

Кератины – высокоспециализированные фибриллярные белки, которые все чаще используются для создания биоматериалов медицинского и биотехнологического назначения. Исследовали влияние различных факторов на эффективность экстракции кератинов из шерстяных волокон различного морфологического строения. Установлено, что дитиотреитол является более эффективным восстановителем, чем 2-меркаптоэтанол, а время экстракции в диапазоне 24-72 ч и тип шерстяных волокон существенно не влияют на ее эффективность. Результаты электрофореза в денатурирующих условиях показали, что извлеченные кератины разделяются на две полипептидные цепи с молекулярной массой в диапазоне 40-50 кДа и протеины с молекулярной массой 10-30 кДа. Выбранный способ экстракции обеспечивает получение микрофибриллярных протеинов из шерстяных волокон. Полученные результаты дают возможность усовершенствовать методы и предложить новые схемы получения кератинов, которые послужат базой для создания биопрепаратов функционального назначения.

*Ключевые слова:* шерсть, кератины, экстракция, дитиотреитол, 2-меркаптоэтанол.