

РТУТЬСВЯЗЫВАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕКТИНА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ МОРСКОЙ ТРАВЫ *ZOSTERA MARINA*¹

© 2006 г. М. Ю. Хотимченко¹, К. В. Ленская¹, М. Ю. Петракова¹,
Ю. С. Хотимченко², В. В. Ковалев²

¹Владивостокский государственный медицинский университет, Владивосток 690990;

²Институт биологии моря ДВО РАН, Владивосток 690041

e-mail: maxkhot@stl.ru

Статья принята к печати 3.05.2006 г.

Описана кинетика связывания ртути пектином, выделенным из морской травы *Zostera marina*, и определена его максимальная ртутьсвязывающая активность при pH от 2.0 до 6.0. Показано, что связывание ртути пектином в условиях *in vitro* не зависит от концентрации ионов водорода в среде. Максимальная ртутьсвязывающая активность, вычисленная с помощью уравнения Лэнгмюра, составляет 2.64 ммоль/г сухой массы пектина.

Ключевые слова: низкоэтерифицированный пектин, полисахариды, *Zostera marina*, тяжелые металлы, ртуть.

Mercury-binding activity of pectin extracted from the seagrass *Zostera marina*. M. Yu. Khotimchenko¹, K. V. Lenskaya¹, M. Yu. Petrakova¹, Yu. S. Khotimchenko², V. V. Kovalev² (¹Vladivostok State Medical University, Vladivostok 690990; ²Institute of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041)

The kinetics of mercury sorption by pectin extracted from the seagrass *Zostera marina* is described. Maximum mercury-binding activity was found in the pH range from 2.0 to 6.0. Binding of mercury ions by pectin *in vitro* was not dependent on the concentration of hydrogen ions in the medium. Maximum mercury-binding capacity calculated by the equation of Langmuir is 2.64 mmol/g of pectin dry weight. (Biologiya Morya, Vladivostok, 2006, vol. 32, no. 5, pp. 367–370).

Key words: low-esterified pectin, polysaccharides, *Zostera marina*, heavy metals, mercury.

Ртуть является высокотоксичным металлом, загрязняющим воздушную и водную среду. При этом приблизительно две трети ртути, находящейся в окружающей среде, антропогенного происхождения (Morel et al., 1998). Самый большой вклад в общий пул ртути, поступающей в внешнюю среду, вносит сжигание ископаемого топлива – нефти, природного газа и угля, которые содержат приблизительно 200 мкг/кг (0.2 ppm) ртути (Clarkson, 1993). Ртуть можно обнаружить в значительных количествах в отходах промышленных предприятий по производству электрических приборов и электронной техники, а также на производствах, использующих этот металл для процессов электролиза. Поступление ртути в естественные водоемы приводит к ее накоплению в тканях гидробионтов. Так, например, на территории США у многих видов пресноводных рыб отмечены концентрации ртути, превышающие 0.5 мкг/г сырой массы (Driscoll et al., 1994). В Японии описаны многочисленные случаи отравления людей (болезнь Минамата), обусловленного употреблением в пищу рыбы, пораженной ртутью (Harada, 1995). Ртуть может поступать в организм человека в составе вакцин, в которых соединения ртути играют роль консерванта, а также из материалов, применяемых в стоматологической практике (Khordi-Mood et al., 2001; Redwood et al., 2001).

Воздействие ртути на организм человека сопровождается грубым поражением центральной нервной системы, органов размножения, печени, почек и нарушением функций органов чувств (Clarkson, 1997; Yeh et al., 2004). Чтобы уменьшить поступление ртути во внешнюю среду с промышленными стоками, а также ослабить ее отрицательное воздействие на здоровье человека, необходимы материалы, эффективно связывающие ртуть и в то же время не влияющие негативно

на живые организмы. Источником таких материалов могут стать пектины – природные полисахариды, входящие в состав клеточной стенки высших растений, где они выполняют функцию цементирующего материала для волокон целлюлозы (Muralikrishna, Taranathan, 1994). Полимерная цепь пектина состоит из остатков D-галактуроновой кислоты, соединенных друг с другом $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -связью, между которыми встречаются остатки L-рамнозы, соединенные с галактуроновой кислотой $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -связью. От основной линейной цепи рамногалактуронана могут отходить боковые цепи, состоящие из нейтральных сахаров, таких как арабиноза, галактоза, галактопираноза, арабинофураноза, фукопираноза, апиоза и других, состав и содержание которых неодинаковы в разных растениях (Ridley et al., 2001).

Пектины используются, главным образом, в пищевой промышленности благодаря их желирующим свойствам (Thakur et al., 1997). Но они также способны связывать тяжелые металлы: железо (Kim et al., 1996), свинец, кадмий и медь (Сергущенко и др., 2004). Цель настоящей работы состояла в оценке ртутьсвязывающей активности пектина, полученного из морской травы *Zostera marina*.

Материал и методика. Морскую траву *Z. marina* собирали в чистых районах зал. Петра Великого Японского моря. Пектин выделяли по методике, включающей кислотный гидролиз сырья, экстракцию оксалатом аммония и осаждение полисахарида этиловым спиртом (Ovodova et al., 1968). Содержание галактуроновой кислоты в пектине определяли колориметрическим гидроксидифениловым методом (Blumenthal, Asboe-Haunsen, 1973). Степень этерификации устанавливали титриметрическим методом (Афанасьев и др., 1984). Характеристическую вязкость определяли в смеси 0.05 М

¹Работа выполнена при финансовой поддержке гранта ДВО РАН (проект № 06-III-А-05-468).

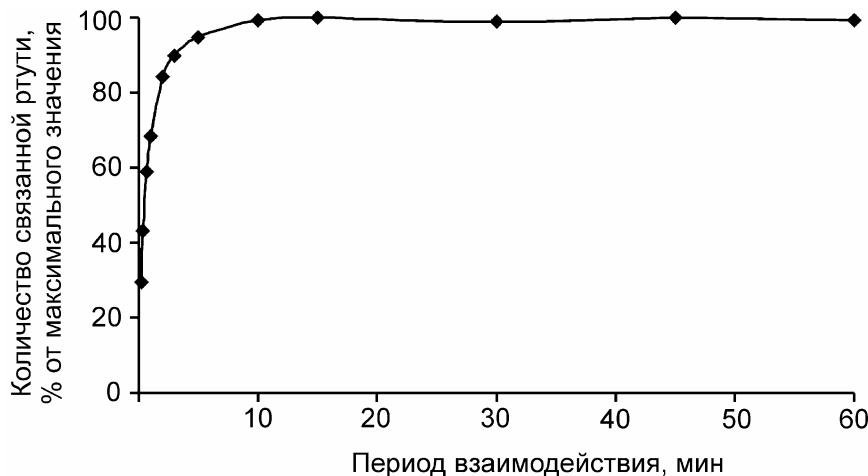


Рис. 1. Кинетика связывания ртути пектином, выделенным из морской травы *Zostera marina*, *in vitro* при начальной концентрации ртути в растворе 30 мМ и пектина 5 мг/мл при pH 2.0.

раствора хлористого натрия и 0.005 М раствора оксалата натрия при температуре 25.0°C и pH 6.0, используя визкозиметр Уббелода. С помощью уравнения Марка–Хаунка находили молекулярную массу, исходя из показателя характеристической вязкости (Kravtchenko, Pilnik, 1990).

Для определения ртутьсвязывающей способности пектина в пластиковую емкость объемом 30 мл, снабженную магнитной мешалкой и комбинированным стеклянным электродом для измерения pH, вносили от 0.85 до 1.85 мл 0.1 М раствора $Hg(NO_3)_2$, 1 мл 1.0 М ацетатного буфера с необходимым значением pH (для pH меньше 4.0 добавляли 1 мл 1.0 М раствора уксусной кислоты) и 5 мл раствора пектина (5.0 мг/мл). После образования геля пектата ртути pH среды корректировали по показаниям pH-метра добавлением 0.1 М раствора NaOH или HNO_3 (для pH меньше 4.0 добавлением 1.0 М раствора HNO_3). Объем смеси доводили до 20 мл добавлением дистиллированной воды, затем смесь перемешивали в течение заданного промежутка времени. После этого жидкую фазу отделяли фильтрацией через обеззоленный бумажный фильтр.

Концентрацию металла в фильтрате определяли титриметрическим методом, используя в качестве металлоиндикатора эриохром черный (Пилиленко, Пятницкий, 1990). Количество связавшейся ртути вычисляли по формуле:

$$q = V(C_i - C_f)/M,$$

где q – количество связавшейся с пектином ртути, ммоль/г сухой массы пектина; V – объем раствора в инкубационной емкости, л; C_i – начальная концентрация ртути в растворе, ммоль/л; C_f – конечная (равновесная) концентрация ртути в растворе; M – масса пектина, г.

Для изучения кинетики связывания ионов ртути пектином в пластиковую емкость объемом 300 мл, снабженную магнитной мешалкой, вносили 10 мл 0.1 М раствора $Hg(NO_3)_2$, 10 мл 1.0 М раствора уксусной кислоты и 80 мл дистиллированной воды. Затем при интенсивном перемешивании добавляли 100 мл раствора пектина (5 мг/мл) и через заданные промежутки времени отбирали по 20 мл смеси, которую фильтровали через капроновую сетку с размером ячей

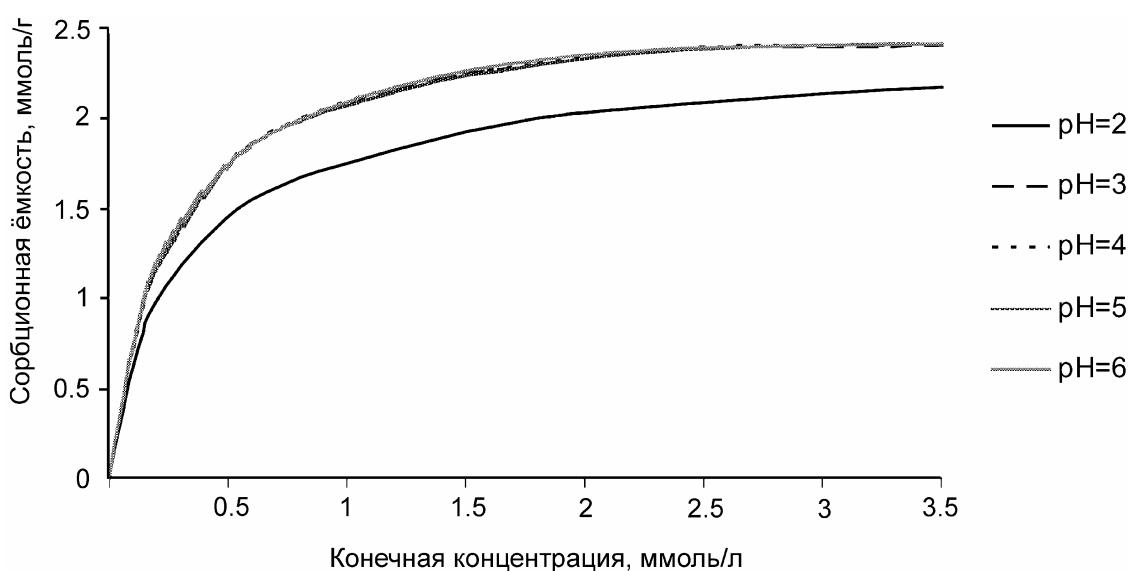


Рис. 2. Изотермы сорбции ртути пектином, выделенным из морской травы *Zostera marina*, при pH 2.0–6.0.

Экспериментальные константы Лэнгмюра для связывания ртути пектином из морской травы *Zostera marina* при различных значениях pH

pH	Константы связывания	
	максимальная связующая способность, ммоль/г	константа сродства, л/мг
2.0	2.40	0.0306
3.0	2.62	0.0411
4.0	2.61	0.0413
5.0	2.62	0.0414
6.0	2.64	0.0417

0.07 мм, в полученном фильтрате определяли конечную концентрацию ртути.

Ртутьсвязывающую активность пектина определяли в диапазоне pH среды от 2.0 до 6.0. Результаты выражали в виде среднего значения трех повторных экспериментов.

Результаты и обсуждение. Физико-химические характеристики исследованного образца пектина, выделенного из морской травы *Z. marina*, были следующими: содержание галактуроновой кислоты – 74.8%, степень этерификации – 5.7%, характеристическая вязкость – 340 мл/г галактуронана, молекулярная масса – около 62 кДа.

В первой серии экспериментов изучали кинетику связывания ртути пектином в условиях *in vitro* при pH 3.0 при начальной концентрации ртути 5 ммоль/л. Зависимость связывания ртути пектином от времени показывает (рис. 1), что в течение первых 30–40 с связывалось почти 50% металла от максимально возможной величины связывания. Примерно к 10-й мин процесс связывания достигал равновесного состояния. В остальных экспериментах время взаимодействия пектина с ртутью составляло 30 мин.

Во второй серии экспериментов определяли максимальную сорбционную емкость по ртути при различных значениях pH. На основе количественных данных экспериментов по связыванию ртути пектином были построены изотермы сорбционного равновесия (поглощение металла пектином против остаточной концентрации металла). Установлено, что процесс связывания ртути пектином практически не зависит от pH (рис. 2). Средство пектина к ртутьи и максимальную ртутьсвязывающую способность пектина определяли с помощью сорбционной модели Лэнгмюра:

$$q = \frac{q_{\max} C_f}{K + C_f},$$

где q – связывание ртути, ммоль/г сухой массы пектина; C_f – равновесная (конечная) концентрация ртути в растворе, ммоль/л; K – коэффициент (константа) сродства сорбента (пектина) и сорбата (ртути), л/мг; q_{\max} – максимальное связывание сорбата (ртути) в данных условиях, ммоль/г пектина.

Максимальная сорбционная емкость по ртути у пектина при pH 2.0 оказалась ниже таковой при остальных значениях pH (3.0–6.0) примерно на 9%. Средство пектина к ртутьи при pH 2.0 было ниже, чем при других показателях pH, примерно на 25%. При pH от 3.0 до 6.0 оба параметра были практически одинаковы (см. таблицу).

Проведенные ранее исследования, посвященные связыванию тяжелых металлов полисахаридами, указывают на строгую зависимость их металлсвязывающей активности от pH. Результаты настоящего эксперимента показывают, что

пектин, выделенный из *Z. marina*, связывает ртуть, но эффективность связывания не зависит от pH, что явилось неожиданным фактом, требующим объяснения. По максимальной ртутьсвязывающей активности пектин из *Z. marina* сравним с активностью таких материалов, как гранулированный хитозан с присоединенными тиоловыми группами (равновесная адсорбционная способность при pH 2.2 около 2 ммоль/г, при pH 7.0 – около 8 ммоль/г) (Marrifield et al., 2004), гранулы полiamинированного хитозана (10.5 ммоль/г) (Kawamura et al., 1997), хлорметилоксириановый хитозан (2.6 ммоль/г) (Ohga et al., 1987), среднепористый силикагель с присоединенными тиоловыми группами (2.5 ммоль/г) (Feng et al., 1997) и меркаптопропиловый силикагель (2.3 ммоль/г) (Brown et al., 2000). Вместе с тем, ртутьсвязывающая активность исследованного пектина примерно в 10 раз превышает ртутьсвязывающую активность целлюлозных материалов, производных лигнина и активированного угля (Ritchie et al., 2001).

Таким образом, морскую траву *Z. marina* можно рассматривать как перспективный источник материалов, предназначенных для связывания и удаления ртути.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Афанасьев С.П., Чирва Б.Ю., Кацева Г.Н. и др. Модификация титриметрического метода анализа пектиновых веществ // Химия природ. соедин. 1984. № 4. С. 428–431.
- Пилипенко А.Т., Пятницкий И.В. Аналитическая химия: В 2 кн. М.: Химия. 1990. Кн. 1. 480 с.
- Сергущенко И.С., Ковалев В.В., Бедняк В.Е., Хотимченко Ю.С. Сравнительная оценка металлсвязывающей активности низкоэтерифицированного пектина из морской травы *Zostera marina* и других сорбентов // Биол. моря. 2004. Т. 30, № 1. С. 83–85.
- Blumenkrantz S., Asboe-Haansen G. New method for quantitative determination of uronic acids // Anal. Biochem. 1973. Vol. 54. P. 484–489.
- Brown J., Richer R., Mercier L. One-step synthesis of high capacity mesoporous Hg²⁺ adsorbents by non-ionic surfactant assembly // Macropor. Mesopor. Mat. 2000. Vol. 37. P. 41–48.
- Clarkson T.W. Mercury: major issues in environmental health // Environ. Health Perspect. 1993. Vol. 100. P. 31–38.
- Clarkson T.W. The toxicology of mercury // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 1997. Vol. 34. P. 369–403.
- Driscoll C.T., Yan C., Schofield C.L. et al. The mercury cycle and fish in Adirondack lakes // Environ. Sci. Technol. 1994. Vol. 28. P. 136A–143A.
- Feng X., Fryxell G.E., Wang L.Q. et al. Functionalized monolayers on ordered mesoporous supports // Science. 1997. Vol. 276. P. 923–926.
- Harada M. Minamata disease: methyl mercury poisoning in Japan caused by environmental pollution // Clin. Rev. Toxicol. 1995. Vol. 25. P. 1–24.
- Kawamura Y., Yoshida H., Asai S., Tanibe H. Breakthrough curve for adsorption of mercury (II) on polyaminated highly porous chitosan beads // Wat. Sci. Technol. 1997. Vol. 35. P. 97–105.
- Khordi-Mood M., Sarraf-Shirazi A.R., Balali-Mood M. Urinary mercury excretion following amalgam filling in children // J. Toxicol. Clin. Toxicol. 2001. Vol. 39. P. 701–705.
- Kim M., Atallah M.T., Amarasiriwardena C., Barnes R. Pectin with low molecular weight and high degree of esterification increases absorption of ⁵⁸Fe in growing rats // J. Nutr. 1996. Vol. 126. P. 1883–1890.
- Kravtchenko T.P., Pilnik A. A simplified method for the determination of the intrinsic viscosity of pectin solutions by classi-

- cal viscosimetry // Gums and stabilizers in the food industry. Oxford: IRL Press. 1990. P. 281–285.
- Marrifield J.D., Davids W.G., MacRae J.D., Amirbahman A.* Uptake of mercury by thiol-grafted chitosan gel beads // *Water Res.* 2004. Vol. 38. P. 3132–3138.
- Morel F.M.M., Kraepiel A.M.L., Amyot M.* Chemical cycle and bioaccumulation of mercury // *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1998. Vol. 29. P. 543–566.
- Muralikrishna G., Taranathan R.N.* Characterization of pectin polysaccharides from pulse husks // *Food Chem.* 1994. Vol. 50. P. 87–89.
- Ohga K., Kurauchi Y., Yanase H.* Adsorption of Cu^{2+} or Hg^{2+} ion on resins prepared by cross-linking metal-complexed chitosan // *Bull. Chem. Soc. Japan.* 1987. Vol. 60. P. 444–446.
- Ovodova R.G., Vaskovsky V.E., Ovodov Yu.S.* The pectic substances of Zosteraceae // *Carbohydr. Res.* 1968. Vol. 6. P. 328–332.
- Redwood L., Bernard S., Brown D.* Predicted mercury concentrations in hair from infant immunizations: cause for concern // *Neurotoxicology.* 2001. Vol. 22. P. 691–697.
- Ridley B.L., O'Neil M.A., Mohnen D.* Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling // *Phytochemistry.* 2001. Vol. 57. P. 929–967.
- Ritchie S.M.C., Kissick K.E., Bachas L.G. et al.* Polycysteine and other polyamine acid functionalized microfiltration membranes for heavy metal capture // *Environ. Sci. Technol.* 2001. Vol. 35. P. 3252–3258.
- Thakur B.R., Singh R.K., Handa A.K.* Chemistry and uses of pectin. A review // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1997. Vol. 37. P. 47–37.
- Yeh J.H., Chung H.M., Ho C.M., Jan C.R.* Mercury-induced Ca^{2+} increase and cytotoxicity in renal tubular cells // *Life Sci.* 2004. Vol. 74. P. 2075–2083.