

М. С. Гурина, Р. Д. Каримова, В. В. Чернова,
Е. И. Кулиш, Г. Е. Заиков

БИОДЕСТРУКЦИЯ ПЛЕНОК ХИТОЗАНА

Ключевые слова: хитозан, биодеструкция, пленки, ферментативный гидролиз.

Изучена кинетика биодеструкции пленочных образцов биополимера хитозана под действием неспецифического ферментного препарата гиалуронидазы. Вычислены кинетические параметры процесса, а именно максимальная скорость и константа Михаэлиса ферментативной реакции. Установлено, что в том случае, когда биодеструкции подвергается монолитный пленочный образец, ферментативный гидролиз хитозана подчиняется тем же закономерностям, что и процесс ферментативного гидролиза хитозана в растворе при малых концентрациях субстрата.

Keywords: chitosan, biodestruction, film, enzymatic hydrolysis.

The kinetics of biodegradation film samples of biopolymer chitosan under the action of non-specific enzyme preparation hyaluronidase are studied. Calculated kinetic parameters of the process, namely the maximum speed and constant Michaelis enzymatic reaction. Installed, that in the case when the preparation is exposed monolithic film sample, enzymatic hydrolysis of chitosan is subject to the same laws as the process of enzymatic hydrolysis of chitosan solution at small concentration of the substrate.

Введение

При контакте природных полимеров с ферментативными средами происходит процесс их ферментативного разложения (биодеструкции) [1]. Например, биодеструкция хитозана, полимера, имеющего огромные перспективы для создания материалов медицинского назначения, протекает как процесс гидролиза макроцепей по β -гликозидным связям. Очевидно, что самыми подходящими из ферментов для осуществления процесса ферментативного гидролиза хитозана являются специфические для хитозана ферменты – хитиназы и хитозаназы, которые приводят к получению олигосахаридов со степенью полимеризации 2-5 [2]. Однако, в условиях медицинского применения хитозановых материалов их биоразрушение может происходить только под действием неспецифических ферментов [3,4], поскольку в человеческом организме отсутствуют и хитиназы, и хитозаназы.

Изучение кинетических закономерностей процесса биодеструкции в конечном счете приводит к прогнозированию времени жизни полимера в соответствующих условиях функционирования [1]. И если закономерности процесса биодеструкции в растворе, в том числе и для хитозана, достаточно хорошо изучены [4-7], вопрос об особенностях ферментативного разрушения монолитных (пленочных) образцов, остается практически открытым, что и определило цель данной работы.

Экспериментальная часть

Для исследования использовали образец хитозана производства ЗАО «Биопрогресс» (Щелково, Россия) с молекулярной массой $M_{\text{ср}} = 113000$. В качестве ферментного препарата использовали гиалуронидазу («Лириза») производства ЗАО «Микроген» (Москва, Россия). Концентрация ферментного препарата во всех экспериментах составляла 0,3 г/л. В качестве растворителя использована 1% уксусная кислота. Концентрация хитозана в растворе при проведении

процесса ферментативного гидролиза (C_{hyd}) варьировалась от 0,1 до 5 г/дл. Характеристическую вязкость хитозана $[\eta]$ в растворе уксусной кислоты определяли методом Иржака и Баранова [8] по тангенсу угла наклона на начальном участке кривой зависимости логарифма относительной вязкости $\ln \eta_{\text{rel}}$ от концентрации хитозана в растворе C , позволяющим исключить влияние эффекта полиэлектролитного набухания при определении вязкости [9].

Для определения значений исходной характеристической вязкости хитозана использовали раствор с концентрацией $C = 0,15$ г/дл. Для используемого в работе образца хитозана в 1% уксусной кислоте значение исходной характеристической вязкости образца, не подвергнутого биодеструкции, составляло $[\eta]_0 = 7,8$ дл/г. В экспериментах по определению значений характеристической вязкости хитозана в ходе ферментативного гидролиза $[\eta]_t$, раствор хитозана в уксусной кислоте, к которому был добавлен раствор ферментного препарата, выдерживали в течение определенного времени при температуре 36°C, после чего процесс биодеструкции останавливали кипячением исходного раствора в течение 30 минут на водяной бане. Далее, из раствора исходной концентрации C_{hyd} готовили разведением раствор для определения характеристической вязкости с концентрацией $C = 0,15$ г/дл.

Для всех использованных концентраций хитозана при небольших временах деструкции (30-40 минут) зависимости уменьшения характеристической вязкости от времени имели линейный характер. Именно на этом участке определяли значение начальной скорости ферментативного гидролиза V_0 , которое рассчитывали по формуле [10]:

$$V_0 = \frac{C_{\text{hyd}} K^{1/2} ([\eta]_0^{-1/2} - [\eta]_t^{-1/2})}{t}, \quad (1)$$

где C_{hyd} – концентрация хитозана, подвергающегося процессу ферментативного гидролиза в растворе (г/дл); t – время гидролиза, мин.; K и α – константы в уравнении Марка-Куна-Хаувинка.

Для определения констант K и α , необходимых для вычисления значений начальной скорости ферментативного гидролиза по уравнению (1) в 1% уксусной кислоте, образец исходного хитозана был расфракционирован на 10 фракций в диапазоне значений молекулярных масс от 20000 до 150000 Да. Абсолютное значение молекулярных масс фракций хитозана было определено сочетанием методов скоростной седиментации и вискозиметрии. Значение констант в уравнении Марка-Куна-Хаувинка в нашем случае составило $\alpha = 1,02$ и $K = 5,57 \cdot 10^{-5}$.

Пленки хитозана получали методом полива 2% раствора хитозана на поверхность стекла в чашке Петри. Для изучения процесса биодеструкции пленок, из пленки по шаблонам вырезали образец с линейными размерами a и b . Толщину пленок поддерживали постоянной, равной 100 мкм. Точный объем пленочного образца рассчитывали исходя из значений массы и плотности пленки. Плотность пленочного образца хитозана, полученного из 1% уксусной кислоты, определяли пикнометрическим методом, которая для изучаемого нами образца хитозана составила $\rho = 1,37 \pm 0,03$ г/см³.

Для проведения эксперимента, моделирующего процесс биодеструкции хитозана на раневой поверхности, пленочный образец хитозана помещали на подложку, смоченную раствором ферментного препарата в 1% уксусной кислоте, и выдерживали в течение определенного времени при постоянной температуре (36°C). Объем раствора ферментного препарата (0,05 мл) выбирали исходя из условия, чтобы только одна из поверхностей пленки соприкасалась с раствором фермента. После выдержки, процесс ферментативного гидролиза останавливали дезактивацией фермента кипячением в течение 30 минут на водяной бане. Далее пленку растворяли в 1% уксусной кислоте и определяли текущее значение характеристической вязкости полимера $[\eta]_t$.

Обсуждение результатов

Задача определения скорости процесса в случае хитозана сводится к определению изменений во времени значений характеристической вязкости полимера, происходящих вследствие разрыва макроцепей при взаимодействии хитозана с ферментным препаратом. Как видно из данных рисунка 1, и в случае пленки, и в случае растворов хитозана, увеличение времени контакта хитозана с ферментом сопровождается уменьшением характеристической вязкости, что свидетельствует об уменьшении его молекулярной массы. При этом в обоих случаях зависимости линейны на начальном этапе реакции.

В случае раствора наблюдаемые зависимости начальной скорости ферментативного гидролиза, рассчитанные по уравнению (1), от

концентрации хитозана в растворе (рис. 2) хорошо описываются в рамках схемы Михаэлиса-Мэнтен.

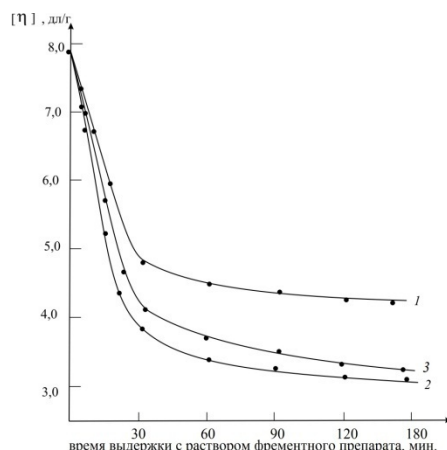


Рис. 1 - Зависимость характеристической вязкости хитозана, выделенного из пленочного образца (1) и из раствора (2,3) с концентрацией хитозана в растворе 0,5 (2) и 1,0 (3) г/дл от времени экспозиции с раствором ферментного препарата

Значение константы Михаэлиса, определенное графическим методом Лайнуивера-Берка[11], составило 3,42 г/дл, значение максимальной скорости ферментативного гидролиза V_{max} , определяющей максимальную возможность образования продукта реакции при данной концентрации фермента в условиях избытка субстрата, составило $1,50 \cdot 10^{-6}$ мин⁻¹. Значение параметра V_{max}/K_m , имеющего физический смысл константы скорости процесса биодеструкции, составило $V_{max}/K_m = 0,44 \cdot 10^{-6}$ (дЛ/г) × мин⁻¹. Именно прямой с наклоном V_{max}/K_m . Аппроксимируется зависимость скорости ферментативного гидролиза V_0 от концентрации субстрата на начальном этапе.

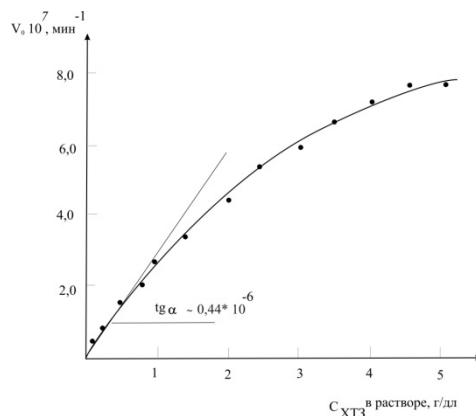


Рис. 2 - Зависимость начальной скорости ферментативного гидролиза хитозана от его концентрации в растворе

В самом первом приближении задачу описания кинетики деструкции пленки можно представить как определение скорости деструкции в растворе с концентрацией хитозана (г/дл), соответствующей концентрации поверхностных звеньев в объеме раствора фермента, т.е.:

$$C_s = \frac{m_s}{V_{sol}} \quad (2)$$

где m_s – масса мономерных звеньев хитозана на поверхности пленки, г; V_{sol} – объем раствора ферментного препарата, с которым контактирует пленка, дл.

Для оценки массы мономерных звеньев хитозана на поверхности пленки использованы следующие рассуждения. Зная массу m_f пленочного образца, можно рассчитать число мономерных хитозановых звеньев n_{unit} , приходящихся на весь объем пленки:

$$n_{unit} = \frac{m_f}{M_{unit}} \quad (3)$$

где M_{unit} – молекулярная масса звена хитозана; N_a – число Авогадро.

Допустим, что мономерное звено хитозана вписано в куб с гранью d . Объем, занимаемый мономерным звеном в объеме пленки, равен $v_{unit} = V_f / n_{unit}$, где V_f – объем пленочного образца. Отсюда, размер грани $d = (v_{unit})^{1/3}$. Теперь можно оценить, сколько мономерных звеньев n_{unit} , каждое из которых занимает площадь $S_{unit} = d^2$, размещается на поверхности пленки с площадью S_f , контактирующей с раствором ферментного препарата

$$n_{unit} = \frac{S_f}{S_{unit}} \quad (4)$$

Определив n_{unit} , можно найти искомую величину C_s .

Таким образом, варьируя размер пленочного образца, можно получить ряд пленок с различной концентрацией C_s звеньев хитозана и определить для них значение скорости процесса биодеструкции по уравнению (1) (рис.3).

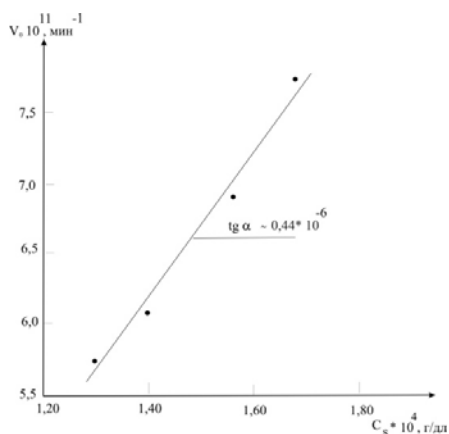


Рис. 3 - Зависимость начальной скорости ферментативного гидролиза хитозана от поверхностной концентрации звеньев хитозана в пленочных образцах

Обращает на себя внимание тот факт, что значение тангенса угла наклона на зависимости скорости ферментативного гидролиза хитозана в растворе V_0 от концентрации субстрата на начальном этапе (рис.1) и зависимости скорости ферментативного гидролиза хитозана в пленках от поверхностной концентрации хитозана, совпадают и составляют $V_{max}/K_m = 0,44 \cdot 10^{-6}$ (дл/г) $\times$ мин $^{-1}$.

Таким образом, можно считать доказанным, что, несмотря на то, что процесс биодеструкции подвергается монолитный пленочный образец, деструкция пленки подчиняется тем же закономерностям, что и ферментативный гидролиз в растворе при малых концентрациях субстрата.

Выводы

1. Впервые определены кинетические параметры процесса ферментативного гидролиза хитозана под действием гиалуронидазы, а именно значение константы Михаэлиса $K_m = 3,42$ г/дл и значение максимальной скорости ферментативного гидролиза $V_{max} = 1,50 \cdot 10^{-6}$ мин $^{-1}$;

2. Показано, что ферментативный гидролиз пленочных образцов, полученных из раствора, подчиняется тем же кинетическим закономерностям, что и биодеструкция хитозана в растворе при малых концентрациях субстрата.

Литература

1. К.З. Гумаргалиева., Г.Е.Заиков, Ю.В. Моисеев, Успехи химии, 63,10, 905-920(1994);
2. Новиков В.Ю., Мухин В.А. // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 5. С.530-535;.
3. R.A.A Muzzarelli, V. Stanic, V. Ramos, Methods in biotechnology,10: carbohydrate biotechnology protocols, 1999, С. 197-211
4. R.A.A Muzzarelli, Peter M.G. Grottaffame, Chitin handbook AldaTechnografica, 1997. С. 528.
5. И.Р. Муллагалиев, Г.Э. Актуганов, А.И. Мелетьев, Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. Материалы Восьмой Международной конференции. ВНИРО, Москва, 2006, С. 305-308.
6. М.Д. Мукатов, АлааЭльдин Мухаммед Юнес, Рыбное хозяйство, Вестник Астраханского государственного технического университета, Астрахань, 141-144.2009
7. Е.И.Черкасова, М.Ф.Алексеева, М.О.Пастухов, В.Г.Фролов, Л.А.Смирнова, В.Ф.Смирнов., И.Ф. Алексеева// Биотехнология. 2005. № 2. С. 73-81
8. В.Г.Баранов, Ю.В. Бресткин, С.А. Агранова В.Н. Пинкевич, Высокомолекулярные соединения. 28Б, 10, 841–843(1986)
9. Е.И.Кулиш, И.Ф.Туктарова, В.В. Чернова, Вестник Казанского технологического университета, 4, 140-143.(2013)
10. Рабинович М.Л., Клесов А.А., Березин И.В. // Биоорганическая химия 1977, т.3, №3, С.405-414.
11. Биохимия/ под ред. Е.С. Северина. М.: Геотар-Мед. 2004. – 779 с.

© М. С. Гурина – магистрант каф. высокомолекулярных соединений Башкирского госуд. ун-та; Р. Д. Каримова – магистрант той же кафедры, karimova-ramilya@bk.ru; В. В. Чернова – к.х.н., доцент той же кафедры; Е. И. Кулиш – д-р хим. наук, проф. той же кафедры; Г. Е. Заиков – д-р хим. наук, проф. каф. технологии пластических масс КНИТУ.

© M. S. Gurina - Bashkir state university; R. D. Karimova - Bashkir state university, karimova-ramilya@bk.ru; V. V. Chernova - associate professor, Bashkir state university; E. I. Kulish – PhD, Bashkir state university; G. E. Zaikov – Prof., Kazan National Research Technological University.