

УДК 541.64:532.77:547.995.12

## МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ДЕСТРУКЦИИ ХИТОЗАНА В РАСТВОРЕ

© 2008 г. Е. И. Кулиш\*, В. П. Володина\*\*, Р. Р. Фаткуллина\*\*, С. В. Колесов\*, Г. Е. Заиков\*\*\*

\*Башкирский государственный университет  
450074 Уфа, ул. Фрунзе, 32

\*\*Институт органической химии Уфимского научного центра  
Российской академии наук  
450054 Уфа, пр. Октября, 71

\*\*\*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук  
119991 Москва, ул. Косыгина, 4

Поступила в редакцию 02.10.2007 г.  
Принята в печать 03.03.2008 г.

Обнаружено проявление макромолекулярных эффектов в процессе ферментативной деструкции хитозана в растворе уксусной кислоты под действием неспецифического фермента – гиалуронидазы. Установлено, что концентрация хитозана в исходном растворе определяет его надмолекулярную организацию и, как следствие, глубину протекания ферментативной деструкции.

Проявление специфических эффектов, характерных для химических реакций, протекающих с участием полимеров, многочисленны и хорошо известны [1]. К их числу относятся конформационный и надмолекулярный эффекты; они носят совокупный характер и зачастую не могут быть разделены. Проявление макромолекулярных эффектов подробно изучено для процессов термической [2, 3] и окислительной деструкции полимеров [4, 5], в которых они способны приводить к изменению скорости протекания полимерной реакции в десятки и сотни раз. Нами обнаружено проявление надмолекулярного эффекта для реакции ферментативной деструкции полимера природного происхождения хитозана в растворах уксусной кислоты под действием фермента гиалуронидазы.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования служили образец хитозана (ТУ 6-09-05-296-76, фирма "Химмед", Россия), полученный щелочным дезацетилированием крабового хитина (степень дезацетилирования ~75%,  $M_\eta = 1.2 \times 10^5$ ), и ферментный препарат лираза, представляющий собой группу ферментов

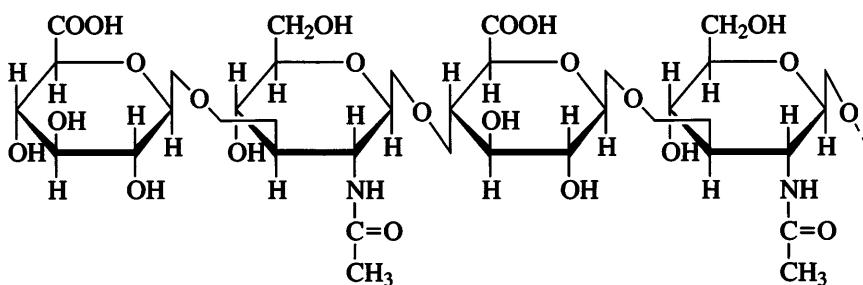
под общим названием гиалуронидаза, катализирующих реакции гидролитического расщепления и деполимеризации основного компонента соединительной ткани – гиалуроновой кислоты (Государственное унитарное предприятие "Иммуно-препарат", Уфа). Растворы хитозана готовили его растворением при комнатной температуре. В качестве растворителя использовали уксусную кислоту с концентрацией 1 и 10 г/дл. Ферментный препарат, предварительно растворенный в небольшом количестве воды, вносили в раствор хитозана непосредственно перед началом изучения процесса деструкции. Содержание ферментного препарата составляло 0.1–10 мас. % по отношению к массе хитозана. Температура деструкции 25°C. Глубину деструктивного превращения хитозана в растворе оценивали по уменьшению относительной вязкости раствора, определяемую при 25°C на вискозиметре Уббелоде, в присутствии фермента  $\Delta\eta/\eta_0$ , выраженную в процентах. Значение относительной вязкости раствора фермента составляло менее 1% от вязкости раствора хитозана, и его вклад в значения вязкости раствора не учитывали. Характеристическую вязкость хитозана и точку кроссовера определяли вискозиметрически в буферном растворе, состоящем из 0.3 М уксусной

E-mail: onlyalena@mail.ru (Кулиш Елена Ивановна).

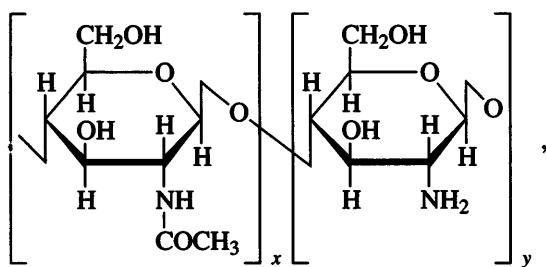
кислоты и 0.2 М ацетата натрия, согласно стандартной методике [6] на вискозиметре Уббелоде при 25°C. Данные по изменению величин  $[\eta]$  и ММ приведены в работе для времени выдержки 2%-ного раствора хитозана с ферментом, равного 3 ч, в массовом соотношении фермент : хитозан = 10 : 90. Ошибка вискозиметрического эксперимента составляла не более 5%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гиалуроновые кислоты представляют собой высокомолекулярные линейные биополимеры, молекулы которых построены из чередующихся остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-гликозамина, соединенных бета-(1-4)- и бета-(1-3)-связями:



Под действием гиалуронидаз происходит разрыв гликозидной связи. Хитозан является аминополисахаридом, т.е. веществом с близкой к гиалуроновой кислоте химической структурой,

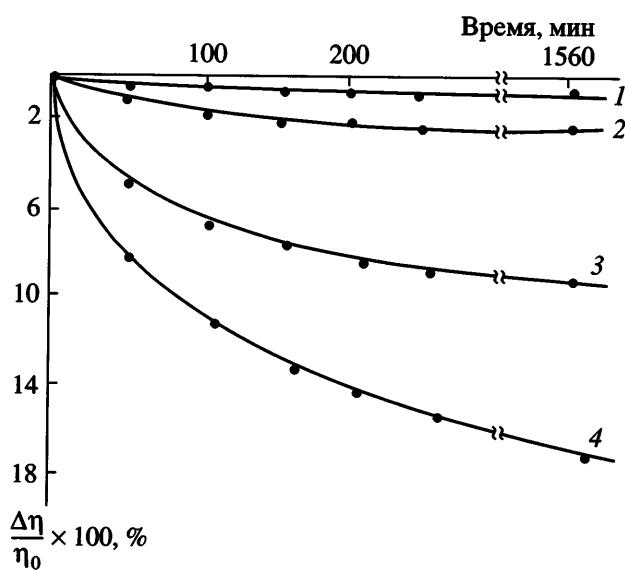


и под действием гиалуронидазы в нем протекает процесс ферментативного разложения.

Как следует из данных вискозиметрических измерений, выдержка растворов хитозана в присутствии фермента в течение 26 ч сопровождается постепенным уменьшением относительной вязкости раствора: это свидетельствует о протекании процесса деструкции, несмотря на то, что данный фермент является неспецифичным по отношению к хитозану. С увеличением времени выдержки раствора хитозана с ферментом вязкость раствора закономерно уменьшается (рис. 1), что указывает на уменьшение ММ хитозана.

Определение характера изменения характеристической вязкости деструктированного хитозана, выделенного из уксуснокислых растворов

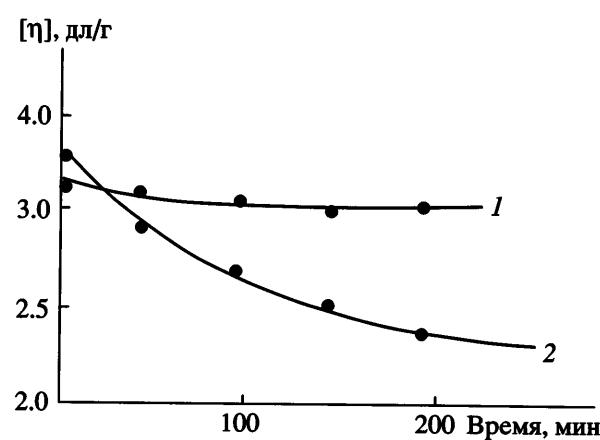
(рис. 2), выявляет факты, интерпретация которых возможна с точки зрения проявления макромолекулярных эффектов. Во-первых, обращает на себя внимание то, что значения характеристической вязкости хитозана, выделенного из 10%-ной уксусной кислоты, несколько выше, чем у аналогичных образцов, выделенных из растворов в 1%-ной уксусной кислоте. Во-вторых, степень уменьшения молекулярной массы хитозана (расчитанная по уравнению Марка–Куна–Хаувинка ( $[\eta] = 1.38 \times 10^{-4} M^{0.85}$ ), существенно зависит от концентрации используемой уксусной кислоты. Когда в качестве растворителя была использована 1%-ная уксусная кислота, характеристическая вязкость хитозана в ходе деструкции изменялась на  $\Delta[\eta] = 0.25$ , что соответствовало падению ММ хитозана на  $\Delta M = 6.8 \times 10^3$ . Если растворителем служила 10%-ная уксусная кислота, то степень влияния фермента на глубину протекания деструкции значительно выше и составила  $\Delta[\eta] = 1.05$ ;  $\Delta M = 3.7 \times 10^4$ . Полученные данные можно объяснить с позиции проявляющихся в данном случае макромолекулярных эффектов. Хорошо известно [7], что концентрация уксусной кислоты в растворе существенным образом оказывается на степени протонирования аминогрупп хитозана  $\alpha$  и соответственно на вязкости растворов хитозана. Эквимольное соотношение уксусная кислота : хитозан обеспечивает достижение величин  $\alpha$  не более 0.5–0.7. Растворы хитозана в разбавленной уксусной кислоте (1–2 мас. %) характеризуются



**Рис. 1.** Изменение вязкости раствора хитозана от времени выдержки с ферментом. Концентрация хитозана в растворе 2 г/дл. Концентрация уксусной кислоты в растворе 1 г/дл. Массовые соотношения фермент : хитозан 0.5 : 99.5 (1), 1.0 : 99.0 (2), 5.0 : 95.0 (3) и 10.0 : 90.0 (4).

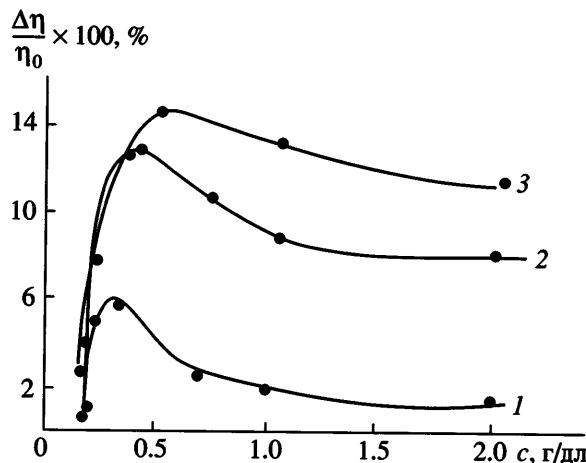
невысокой вязкостью и компактной формой макромолекул хитозана. Лишь при 7–10-кратном мольном избытке уксусной кислоты (10%-ная уксусная кислота) по отношению к хитозану степень протонирования аминогрупп становится равной единице. Соответственно повышение концентрации уксусной кислоты от 1 до 10% сопровождается разворачиванием макромолекулярных клубков и увеличением значения характеристической вязкости раствора. Очевидно, что конформационное состояние и надмолекулярная структура макромолекул взятого для проведения деструкции 2%-ного раствора ХТ в этих случаях будет разная. При использовании 10%-ной уксусной кислоты рыхлые агрегаты макромолекул хитозана обеспечивают высокую доступность звеньев хитозана для взаимодействия с ферментом. Если брать 1%-ную уксусную кислоту, обеспечивающую компактную форму макромолекул, глубина деструкции будет намного меньше.

С таких позиций может быть объяснена экспериментально обнаруживаемая взаимосвязь между количеством хитозана в растворе и глубиной процесса деструкции. Как видно из рис. 3, зависимость между степенью падения относительной вязкости и концентрацией хитозана в растворе носит экстремальный характер.



**Рис. 2.** Зависимость характеристической вязкости хитозана, выделенного из раствора в 1%-ной (1) и 10%-ной уксусной кислоте (2), от времени выдержки раствора с ферментом.

Представление данных вискозиметрических измерений в двойных логарифмических координатах позволяет определить так называемую точку кроссовера, которая в нашем случае соответствует значениям концентрации порядка 0.3–0.4 г/дл. Хорошо известно, что в области кроссовера происходит формирование флюктуаций плотности сетки, по сути являющихся агрегатами взаимодействующих звеньев полимерных цепей. Следовательно, несмотря на небольшую количественную разницу в значениях содержания хитозана в растворе до и после точки кроссовера, надмолекулярная структура полимера при разных



**Рис. 3.** Изменение вязкости раствора хитозана от содержания хитозана в растворе. Концентрация уксусной кислоты в растворе 1 г/дл, выдержка раствора хитозана с ферментом 3 ч. Массовые соотношения фермент : хитозан 1.0 : 99.0 (1), 5.0 : 95.0 (2) и 10.0 : 90.0 (3).

концентрационных режимах качественно различна. Разбавленный раствор представляет собой систему изолированных макромолекулярных клубков хитозана, доступность звеньев которых для взаимодействия с ферментом высока. При переходе к полуразбавленному раствору его надмолекулярная структура может быть представлена перекрывающимися между собой агрегатами макромолекул, создающими определенные диффузионные затруднения для взаимодействующего с ними фермента.

Наблюдаемые экстремальные зависимости глубины протекания деструктивного процесса от содержания хитозана в растворе, по всей вероятности, связаны с появлением в системе после точки кроссовера надмолекулярных структур. Можно предположить, что полимерный фермент будет преимущественно влиять только на звенья полисахаридных цепей на поверхности макромолекулярных агрегатов. Поскольку степень агрегирования хитозана в области полуразбавленных растворов растет (доступность звеньев полимера для взаимодействия с ферментом уменьшается) при увеличении его концентрации, влияние фермента с повышением концентрации полимерных цепей будет уменьшаться.

Таким образом, обнаруженные при изучении ферментативной деструкции хитозана в растворе

в уксусной кислоте под действием гиалуронидаз эффекты влияния концентрации хитозана и уксусной кислоты могут быть объяснены с учетом проявляющихся конформационного и надмолекулярного эффектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Платэ Н.А., Литманович А.Д., Ноа О.В. Макромолекулярные реакции. М.: Химия, 1977.
2. Колесов С.В., Кулиш Е.И., Минскер К.С. // Высокомолек. соед. Б. 1994. Т. 36. № 8. С. 1383.
3. Кулиш Е.И., Колесов С.В., Минскер К.С., Заиков Г.Е. // Высокомолек. соед. А. 1998. Т. 4. № 8. С. 1309.
4. Кулиш Е.И., Герчиков А.Я., Чирко К.С., Колесов С.В., Заиков Г.Е. // Высокомолек. соед. Б. 2004. Т. 46. № 2. С. 349.
5. Эмануэль Н.М., Бучаченко А.Л. Химическая физика старения и стабилизации полимеров. М.: Наука, 1982.
6. Рафиков С.Р., Будтов В.П., Монаков Ю.Б. Введение в физико-химию растворов полимеров. М.: Наука, 1978.
7. Кулиш Е.И., Володина В.П., Колесов С.В., Заиков Г.Е. // Высокомолек. соед. Б. 2006. Т. 48. № 9. С. 1721.

## Macromolecular Effects upon Enzymatic Degradation of Chitosan in Solution

E. I. Kulish<sup>a</sup>, V. P. Volodina<sup>b</sup>, R. R. Fatkullina<sup>b</sup>, S. V. Kolesov<sup>a</sup>, and G. E. Zaikov<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Bashkortostan State University,  
ul. Frunze 32, Ufa, 450074 Bashkortostan, Russia

<sup>b</sup> Institute of Organic Chemistry, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences,  
pr. Oktyabrya 71, Ufa, 450054 Bashkortostan, Russia

<sup>c</sup> Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia  
e-mail: onlyalena@mail.ru

**Abstract**—Macromolecular effects were revealed in the course of enzymatic degradation of chitosan in an acetic acid solution under the action of hyaluronidase, a nonspecific enzyme. It was shown that the concentration of chitosan in the initial solution determines its supramolecular organization and, hence, the degree of enzymatic degradation.