

ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИЯ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ХИТОЗАНА ФЕРМЕНТНЫМ ПРЕПАРАТОМ ФИТОПАИНОМ

*А.В. Бакулин**, *А.А. Львова**, *А.И. Албулов****,
*Тран Дин Тоай (Tran Dinh Toai)***

*Центр «Биоинженерия» РАН, Москва

**Институт химии ВАНТ, Ханой

*** ЗАО «Биопрогресс», г. Щелково,
e-mail: enzyme@biengi.ac.ru

DEPOLYMERIZATION OF HIGH MOLECULAR CHITOSAN WITH A USE OF PROTEOLITIC ENZYME FITOPAIN

*A.V. Bakulin **, *A.A. Lvova*, *A.I. Albulov****
*Tran Dinh Toai***

*Centre «Bioengineering» RAS, Moscow

**Institut of chemistry VAST, Hanoi

***ZАО «Bioprogress», Shelkovo, e-mail: enzyme@biengi.ac.ru

ABSTRACT

Chitosan with molecular weight 10–100 kDa were obtained by the depolymerization of chitosan (700 kDa) with use of non-specific enzymes fitopain at optimize conditions: pH = 5,5, t = 55 °C, time for 4h.

Одним из способов получения низкомолекулярного хитозана (М.м. = 10–100 кДа), является ферментативный гидролиз. Ввиду малой доступности специфических по отношению к хитозану ферментов, постоянно ведётся поиск ферментных препаратов, способных разрушать β -гликозидную связь [1]. Известно, что хитозан деполимеризуется под действием ряда гидролаз неспецифического действия (целлюлазы, гемицеллюлазы, α -D-глюканаза, трипсин, проназа, папаин и др.) [2, 3].

Цель работы — получение низкомолекулярного хитозана с использованием ферментного препарата фитопаина.

Использование фитопаина, обладающего протеолитической активностью, для гидролиза высокомолекулярного хитозана с целью получения низкомолекулярного, является привлекательным. Для производства ферментного препарата используют сухой латекс, получаемый в результате сушки сока, собранного с незрелых плодов дынного дерева (*Carica Papaya*). Ферментный препарат растительного происхождения фитопаин имеет широкое применение в пищевой промышленности, в производстве парфюмерно-косметической продукции и медицине.

Процесс ферментативного гидролиза хитозана осуществляли в оптимальных условиях, обеспечивающих эффективную работу ферментов, входящих в состав ферментного препарата. Изменяя параметры процесса: pH среды, температуру, фермент-субстратное соотношение, молекулярную массу исходного хитозана, его степень деацетилирования и т.д., можно получать хитозан с заданными свойствами.

Выбор оптимальных условий, обеспечивающих получение хитозана с заданными молекулярно-массовыми характеристиками, имеет большое значение для реализации данного биотехнологического процесса, так как позволит увеличить выход продукта и повысить его качество.

В работе динамику гидролиза высокомолекулярного хитозана ферментным препаратом оценивали по изменению динамической вязкости (сПа) образцов.

Оптимальное значение pH для деполимеризации субстрата подбирали в интервале 4,0–6,0. Сдвиг значений pH в более кислую область, выходит за рамки pH стабильности фермента, кроме того наблюдается кислотный гидролиз хитозана, приводящий к на-

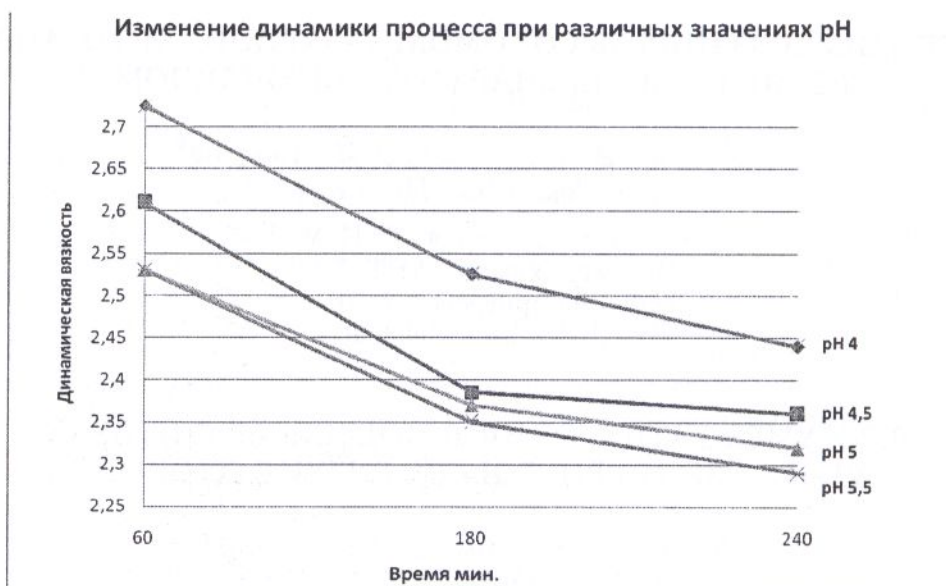


Рис. 1. Изменение динамики процесса при различных значениях pH

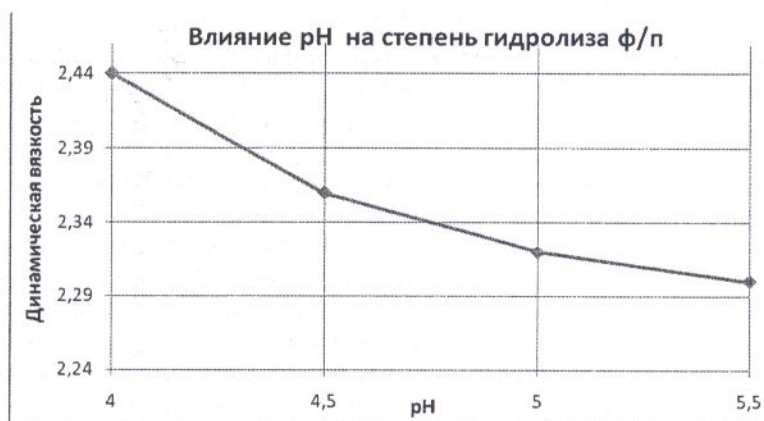


Рис. 2. Влияние pH на степень гидролиза

коплению моносахаридов в гидролизате. Изменение pH в область щелочных значений приводит к образованию осадка хитозана (pK_a 6,3–6,5). Таким образом, оптимальным для данного процесса гидролиза выбрали значение pH равное 5,5.

Гидролиз раствора хитозана проводили в диапазоне температур от 25 до 65 °С. Экспериментально было показано, что при 55 °С ферменты проявляли наибольшую активность, дальнейшее увеличение температуры приводило к инактивации ферментного препарата и увеличению степени кислотного гидролиза.

С увеличением количества ферментного препарата наблюдалось снижение вязкости. Для гидролиза было подобрано оптимальное количество ферментного препарата, позволяющего получать растворы хитозана с низкой вязкостью, хорошей растворимостью в воде конечного продукта и минимальным содержанием белковых примесей.

Продолжительность ферментативного гидролиза варьировалась в пределах от 0,5 до 24 часов. За первый час вязкость раствора хитозана уменьшилась на 84,2% (по сравнению с исходной), что свидетельствовало о высокой активности ферментного комплекса в выбранных условиях. При длительном ферментативном гидролизе (более 4 ч) наблюдалось снижение вязкости за счет кислотного гидролиза, в связи с чем оптимальное время процесса составляло 1 ч.

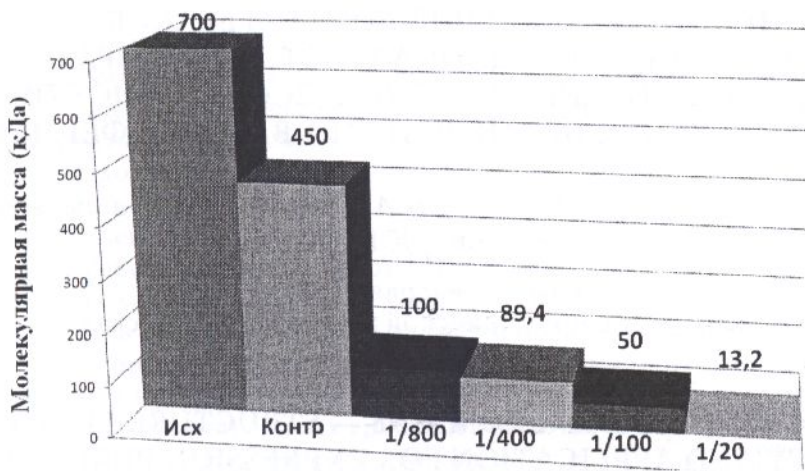


Рис. 3. Молекулярная масса полученных образцов хитозана при различном фермент-субстратном соотношении

Анализ полученных образцов проводился методом гель-проникающей ВЭЖХ. Были определены средневесовая М.м., среднечисловая М.м. и индекс полидисперсности полученного низкомолекулярного хитозана.

Таким образом, были подобраны оптимальные условия проведения ферментативного гидролиза высокомолекулярного хитозана (М.м. = 700 кДа) с помощью ферментного препарата фитопаина, который обеспечил получение низкомолекулярного хитозана с молекулярной массой 50 кДа. Можно рекомендовать использование фитопаина (ЗАО «Биопрогресс», Щелково), и образцов папаина (Институт химии ВАНТ, Ханой) для получения низкомолекулярного водорастворимого хитозана из высокомолекулярного. Изменяя фермент-субстратное соотношение, диапазон получаемых молекулярных масс может быть расширен (см. рис. 3).

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 07-04-90015-Вьет_a

ЛИТЕРАТУРА

1. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова.— М.: Наука, 2002. 368 с.
2. Ильина А.В., Ткачева Ю.В., Варламов В.П. Деполимеризация высокомолекулярного хитозана ферментным препаратом Целловиридин Г20х // Прикладная биохимия и микробиология. 2002. Т. 37.
3. Ilyina A.V., Tikhonov V.E., Albulov A.I., Varlamov V.P. Process Biochemistry. 2000. V. 35. N 6. P. 563–568.