

СТАБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ КЛАССА ПРОТЕАЗ В СТРУКТУРЕ БИОПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Волосова Е. В., Безгина Ю. А., Мазницына Л. В.

ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет», г. Ставрополь, Россия (355017, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12) E-mail: juliya.bezgina@mail.ru

Разработаны принципиально новые пленочные материалы, подвергающиеся самостоятельной биодegradации в естественных условиях. Подобран оптимальный состав для получения биоразлагаемых пленок, обладающих преимуществами: прозрачность, пластичность, прочность структуры при разрывном напряжении. Проведена иммобилизация ферментных препаратов в структуру биоразлагаемых пленочных материалов с высоким процентом сохранения удельной активности. Впервые получены пленочные покрытия с иммобилизованным ферментом лизоцимом, которые могут быть использованы в качестве раневых покрытий в медицине и косметологии. Показано наличие двух фракций, лабильной и стабильной, в иммобилизованных образцах. Установлено, что максимальное падение протеолитической активности полученных материалов происходит в процессе высушивания. Наиболее широко применяемыми в клинической практике являются протеолитические ферменты. Поэтому большое количество исследований посвящено получению их иммобилизованных производных. Разработка новых технологических процессов на основе биокатализаторов, иммобилизованных в структуры различной природы, открывают пути не только получения новых материалов, но и способствуют совершенствованию уже имеющихся. Сохранение активности и стабильности биологических веществ (в частности ферментов) во времени связано с необходимостью создания биоспецифической основы и разработкой методов включения биологических субстанций в структуру материала-носителя. В существующих материалах в качестве основы с иммобилизованными ферментами используется тканевый материал, коллаген. Все они требуют утилизации отработанного материала. Их непрозрачность не позволяет следить за процессами ранозаживления. Стадийность процессов заживления требует постоянной смены повязочного материала с различными ферментными препаратами, в зависимости от типа раны. Таким образом, существует необходимость разработки новых, универсальных и совершенствования уже существующих биоактивных материалов с прогнозируемым сроком сохранения активности, пролонгируемым эффектом и способностью к биодеструкции.

Ключевые слова: биополимерные материалы, биодеструкция, протеолитические ферменты.

STABILIZATION OF THE ENZYME CLASS OF PROTEASES IN BIOPOLYMER STRUCTURE MATERIALS

Volosova E. V., Bezgina J. A., Maznitsyna L. V.

FSBEI HPE «Stavropol State Agrarian University», Stavropol, Russia (355017, h.12, cross-street Zootechnichesky, town Stavropol) E-mail: juliya.bezgina@mail.ru

Fundamentally new film materials undergoing self-biodegrade in natural conditions. Optimal composition for biodegradable films have advantages: transparency, flexibility, strength of the structure with tensile strength. Held immobilized enzyme preparations in the structure of biodegradable plastic materials with high rates of saving specific activity. First obtained film coatings with immobilized enzyme lysozyme, which can be used as wound dressings in medicine and cosmetology. Showed the presence of two fractions, labile and stable, immobilized samples. Found that the maximum fall of proteolytic activity of the resulting materials is in the process of drying. The most widely used in clinical practice are proteolytic enzymes. Therefore, much research is devoted to obtaining their immobilized derivatives. Development of new processes based on biocatalysts immobilized in the structure of different nature, open the way not only new materials, but also contribute to the improvement of existing ones. Preservation of the activity and stability of biological substances (eg enzymes) in time due to the need to create biospecific frameworks and methods of incorporating biological agents in the structure of the carrier material. The existing materials as a basis to the immobilized enzymes used fabric material, collagen. All require disposal of waste material. Their lack of transparency does not allow follow the processes of wound healing. Step process of healing requires constant change povyazochного material with different enzyme preparations, depending on the type of wound. Thus, there is a need for new and improved universal existing bioactive materials with predictable lifesaving activity prolonged effect and biodegradability

Keywords: biopolymermaterials, biological degradation, proteolyticenzymes.

Круг вопросов, к решению которых привлекают биотехнологические разработки, весьма широк. Однако большинство из них прямо или косвенно связано с глобальными проблемами, стоящими перед современной цивилизацией: загрязнение окружающей среды, угроза экологического кризиса; истощение запасов полезных ископаемых, в первую очередь, источников энергии, угроза мирового энергетического кризиса; нехватка продовольствия, особенно осязаемая в развивающихся странах. Биотехнологические разработки могут внести немаловажный вклад в решение комплексных проблем народного хозяйства, здравоохранения и науки [3, 4, 9, 10, 11].

Одна из наиболее перспективных задач современной биотехнологии – создание биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов для использования в медицинских целях, пищевой промышленности, в биореакторах и многочисленных аналитических устройствах. Преимущество иммобилизованных ферментов перед растворимыми заключается в большей их стабильности, возможности регенерирования и отделения иммобилизованного фермента от продукта реакции. В качестве таких катализаторов могут использоваться ферменты, включенные в пленочные покрытия.

Современные тенденции при разработке композиционных материалов как основы для иммобилизации состоят в придании им ряда положительных свойств: способность подвергаться разложению в естественных условиях среды, низкий уровень неспецифических взаимодействий с примесями и биологически активными веществами; механическая устойчивость, наличие функциональных групп, пригодных для селективной химической модификации; экологическая чистота процесса получения [12, 14].

Включение ферментов в структуру природных биоразлагаемых полимеров продиктовано необходимостью создания лекарственных повязок нового поколения с регулируемым сроком службы и высоким процентом сохранения активности биологической субстанции [14].

В отличие от обычных сорбционных перевязочных средств (марлевых, ватно-марлевых, нетканых материалов, полимерных губок), у которых устанавливается динамическое равновесие концентрации микрофлоры на границе «повязка – рана», биологически активные гелевые повязки обеспечивают пластифицирующее воздействие на ткани раны, размягчают некротические образования, диффундируют под них, облегчая механическое удаление нежизнеспособных тканей, и предотвращают развитие инфекции на поверхности раны под струпом [13].

Сегодня, параллельно с применением антибиотиков, возрастает число антибиотико-резистентных штаммов бактерий, частота и тяжесть инфекционных осложнений, попутно изменяющих свои клинические черты. Таким образом, очевидно, что, несмотря на все

достижения современной медицины, инфекция не без основания остается «камнем преткновения» на пути дальнейшего развития лечения различных ран. Возникает необходимость в создании принципиально новых препаратов для лечения воспалительных ран.

Альтернативным решением данных проблем могут выступать препараты системной энзимотерапии, относящиеся к группе гидролаз и представленные высокоочищенными протеиназами животного и растительного происхождения, а также фиксированные на различных раневых покрытиях ферментные препараты для местного лечения ран.

Таким образом, существует необходимость разработки новых универсальных и совершенствования уже существующих биоактивных материалов с прогнозируемым сроком сохранения активности, пролонгируемым эффектом и способностью к биодеструкции.

Исследования проводились на базе кафедры биологической и медицинской химии ФГБОУ ВПО СГУ (АОУ ВПО СКФУ) под руководством канд. биол. наук Воробьевой О. В. и Аванесян С. С.

Цель данной работы состояла в разработке технологии получения биodeградируемых полимеров с заданными свойствами на основе возобновляемого природного полисахарида – метилцеллюлозы с иммобилизованными в их структуру протеолитическими ферментами с высоким процентом сохранения удельной активности.

В работе использована метилцеллюлоза марки МЦ-100 с молекулярным весом (162,14)_n (ТУ 2231-107-05742755-96, ООО «УсольеХимпром», Россия). Для придания пластичности структуры композиты модифицировали глицерином (ГОСТ 6259-75, ООО «Глицерин.ру», Россия), массовое содержание которого коррелировалось с учетом термодинамической совместимости его с биоразлагаемым материалом. Прочность и жесткость материала обеспечивали введением природного белкового комплекса желатины (ГОСТ 11293-89, ООО «Минводский желатиновый завод», Россия). Для включения в материалы использовали фермент лизоцим из куриных яиц, КФ 3.2.1.17, «Sigma» (Германия) [7].

Пленки формовали из 3–5 % раствора метилцеллюлозы. Для этого метилцеллюлозу вносили в воду температурой 50÷60 °С. Смесь выдерживали 1,5÷2 часа. Температурный режим обусловлен следующими ограничениями. При температуре ниже 50 °С и выше 60 °С процесс гелеобразования замедляется [1].

Для исключения образования пузырьков воздуха в 5 % растворе метилцеллюлозы необходимо выдерживание полученного раствора при температуре 8÷10 °С в течение 12–15 часов.

В полученный коллоидный гель метилцеллюлозы вводили реагент для модификации

реологических характеристик, пластификатор, придающий изделию гибкость, и перемешивали до однородного состояния.

В качестве реагента для модификации реологических характеристик использовали белок животного происхождения – желатин в концентрации от 3 до 8 % от общей массы составляющих композиции.

В качестве пластификатора, придающего изделию гибкость, использовали глицерин в концентрации от 0,5 до 1 % от общей массы составляющих композиции. Фермент вводили в раствор компонентов, входящих в состав пленки, в объеме 1 мл.

Полученную композицию наносили на гладкую стеклянную поверхность желаемой формы толщиной от 1 до 3 мм и оставляли на воздухе при температуре 20±22 °С на 2–3 суток до полного высыхания (Патент РФ RU№ 2395540) [2].

Проведена иммобилизация фермента класса протеаз лизоцима. Изучено влияние различных факторов (рН, температуры, времени постановки ферментативной реакции) на активность растворимого и иммобилизованного фермента. Фермент лизоцим, иммобилизованный в пленки, проявлял наибольшую удельную активность 290 мэкв/г при рН среды 6,9 и температуре 37 °С, время постановки ферментативной реакции 4 часа. Пленки с иммобилизованным лизоцимом, хранящиеся при температуре 4 °С, к третьему месяцу хранения имели стабильный процент сохранения биокаталитической активности, а хранящиеся при температуре 20 °С – потеряли свою активность на 40 % [5].

Для образцов полученных пленочных материалов были проанализированы спектры поглощения в УФ – области. Появление дополнительного пика поглощения при длине волны 280 нм связано с присутствием фермента трипсина в структуре пленки. Этот факт может быть использован для определения содержания фермента в структуре пленки [8].

При иммобилизации фермента лизоцима (муколитического, протеолитического) фермента, в структуру биоразлагаемых пленок была разработана методика определения удельной активности растворимого и иммобилизованного фермента, где в качестве субстрата использовали крахмал. Предлагаемый метод прост в использовании, экспрессен, не требует использования дорогостоящих реактивов и оборудования.

Доказано, что растворимый и иммобилизованный в пленки фермент лизоцим проявлял наибольшую удельную активность при рН 6,9 и температуре 37 °С, которая составила 83,4 мэкв/г и 290 мэкв/г соответственно [6].

В результате проведенных исследований получены биodeградируемые пленочные материалы на основе высокомолекулярного природного полисахарида метилцеллюлозы, белкового комплекса желатина и пластификатора – глицерина. Установлено влияние рН и температуры на активность растворимого и иммобилизованного лизоцима. Определено, что

лизоцим, иммобилизованный в пленки, проявлял наибольшую удельную активность 290 мг крахмала/г фермента при рН среды – 6,9 и температуре – 37 °С, при этом время постановки ферментативной реакции составило 4 часа. Показано, что пленки с иммобилизованным лизоцимом, при температуре 4 °С, к третьему месяцу хранения (90 суток) имели стабильный процент сохранения биокаталитической активности – 80 %. Таким образом, включение в состав биоразлагаемых пленок биологически активных веществ, в том числе протеолитических ферментов, делает возможным расширение спектра представленных на рынке ранозаживляющих материалов.

Список литературы

1. Аванесян С. С., Андрусенко С. Ф., Воробьева О. В., Иванова А. М., Волосова Е. В., Каданова А. А., Филь А. А. Пленка для «авоськи» // Экология и жизнь. – 2009. – № 10. – С. 30–32.
2. Аванесян С. С., Андрусенко С. Ф., Волосова Е. В., Воробьева О. В., Каданова А. А. Способ получения композиций, подвергающихся биодеструкции на основе простого эфира целлюлозы. Патент РФ RU№ 2395540 С 2 – № 2008140578/04; заявлено 13.10.2008; опубл. 27.02.2010, Бюл. № 21. – 2 с.
3. Авдеева В. Н., Безгина Ю. А. Экологические способы подавления развития грибной инфекции на зерне пшеницы при хранении // Сборник научных трудов Sworld по материалам международной научно-практической конференции. – 2012. – Т. 46. – № 4. – С. 11–15.
4. Безгина Ю. А., Есаулко А. Н., Стукало В. А. Агротехнологический факультет Ставропольского ГАУ – кузница кадров АПК России // Агротехнологический вестник. – 2011. – № 4. – С. 3–5.
5. Волосова Е. В. Стабилизация биологически активных соединений методом включения их в структуру природных биоразлагаемых полимерных материалов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06. – Ставрополь, 2011. – 24 с.
6. Волосова Е. В., Воробьева О. В. Биотехнология получения природных биоразлагаемых полимерных материалов с иммобилизованными протеолитическими ферментами / Монография изд. – Ставрополь: Изд-во «Параграф», 2012. – 96 с.
7. Воробьева О. В., Иванова А. М., Аванесян С. С., Волосова Е. В., Андрусенко С. Ф. Модификация природных полимеров для синтеза материалов подвергающихся биодegradации // Химия в интересах устойчивого развития. – 2011. – № 19. – С. 137–140.
8. Воробьева О. В., Иванова А. М., Аванесян С. С., Волосова Е. В., Андрусенко С. Ф., Каданова А. А. Получение ферментативных пленочных материалов на основе природных полисахаридов // Известия высших учебных заведений. Химия и химическая технология.

Иваново. – 2011. – Т. 54. – Вып. I. – С. 53–56.

9. Мазницына Л. В., Шипуля А. Н., Дергунова Е. В., Беловолова А. А. Разработка методов культивирования тканей маклеи сердцевидной // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2009. – Т. 1. – № 17. – С. 162–167.

10. Перспективы выращивания стевии и производство продукции на ее основе / Трухачев В. И., Стародубцева Г. П., Безгина Ю. А., Любая С. И., Веселова М. В. // Вестник АПК Ставрополя. – 2012. – Т. 5. – № 1. – С. 22–25.

11. Трухачев В. И. Развитие науки – путь к успеху! // Достижения науки и техники АПК. – 2010. – № 9. – С. 3–4.

12. Шипуля А. Н. Синтез и физико-химические исследования композиционных органокремнеземных сорбентов и модифицированных углей сферической грануляции: Дис. ... канд. хим. наук / Ставрополь, 2002.

13. Шкутина И. В., Стоянова О. Ф., Селеменев В. Ф. Применение волокнистых полиэлектролитов в качестве носителей α -амилазы // Журнал прикладной химии. – 2005. – Т. 78. – № 6. – С. 1003–1005.

14. Юданова Т. Н. Полимерные раневые покрытия с ферментативным и антимикробным действием: Автореф. дис. ... д-ра хим. наук: 02.00.06. – М., 2004.

Рецензенты:

Стародубцева Г. П., доктор сельскохозяйственных наук, профессор, руководитель Учебно-научной испытательной лаборатории ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет», г. Ставрополь.

Лысенко И. О., доктор биологических наук, заведующий кафедрой экологии и ландшафтного строительства ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет», г. Ставрополь.