

СОРБЦИЯ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ ИЗ ASPERGILLUS AWAMORI НА КОЛЛАГЕНЕ

Т. А. Ковалева, Е. Л. Макарова, Е. В. Короткова

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 12.10.2010 г.

Аннотация. Нами была осуществлена сорбция глюкоамилазы *Aspergillus awamori* на коллагене. Выявлены оптимальные режимы проведения процесса сорбции глюкоамилазы на коллагене: исходная концентрация фермента 1.0×10^{-5} моль/л, оптимальная температура 50 °С, pH 4.7, продолжительность процесса 1.5 часа. Сорбционная емкость составила 20 мг на 1 г коллагена. Показано, что при 10-кратном применении связанный с коллагеном фермент сохраняет 66.25 % каталитической активности свободного фермента.

Ключевые слова: глюкоамилаза, активность, коллаген.

Abstract. We have taken the problem of sorption of glucoamilase from *aspergillus awamori* on collagen. It has been discovered the optimal regimes of sorption glucoamylase on the collagen. It has been determined the conditions: initial concentration of enzyme = 1.0×10^{-5} моль/л, $t_{\text{opt}}^{\circ} = 50$ °С, pH 4.7, duration of process 1.5 hours. The sorption capacity has made 20mg on 1g collagen. Is shown, that at 10-fold application the enzyme connected with collagen keeps 66.25% activity of free.

Keywords: glucoamylase, activation, collagen.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из перспективных направлений биотехнологии является разработка сорбционных материалов и дальнейшее их применение в медицине в качестве носителей для биологически активных веществ. Основной задачей является изучение сорбционных свойств сорбента с целью создания комплекса сорбент-сорбат, обеспечивающего высокий выход биологически активных веществ и обладающего способностью к многократному использованию, стабильностью и высокой сорбционной емкостью. Для решения выше изложенной задачи наиболее перспективными полисорбентами являются белки из-за присутствия большого числа возможных центров связывания, расположенных в боковых радикалах аминокислот.

В настоящее время особую значимость приобретают работы по изучению структурно-функциональных свойств белков соединительной ткани, в том числе коллагена и его производных. Интерес исследователей к носителям белковой природы вполне обоснован, так как они обладают высокой химической прочностью, достаточной проницаемостью для фермента и субстрата, большой удельной поверхностью, возможностью получения в виде удобных в технологическом отношении форм (гранул, мембран), легкой активацией, высокой гидрофильностью, невысокой стоимостью

[1, 2]. Активные функциональные группы в коллагене и сложная молекулярная структура, склонная к образованию фибрилл и волокон, способствует как химическому связыванию, так и адсорбции биологически активных низкомолекулярных и высокомолекулярных лекарственных веществ. Известно, что коллаген способен образовывать комплексы с биологическими активными веществами, что создает возможности разрабатывать коллагеновые материалы направленного действия: антикоагулянтного, гемостатического, антисептического, стимулирующего регенерацию и остеогенез. Коллаген обладает большой сорбционной емкостью, способностью ресорбироваться и утилизироваться организмом. Низко- и высокомолекулярные вещества, заключенные в коллагеновые волокна, освобождаются при лизисе, обеспечивая постепенный пролонгированный эффект [3—7].

В последние годы особое внимание уделяют амилазам, широко распространенным в природе, физико-химические свойства которых были изучены на ранних стадиях развития энзимологии [8,9]. Повышенный интерес к амилазам обусловлен их применением в пищевой и легкой промышленности в качестве эффективных биокатализаторов, в медицине и тонком органическом синтезе.

Глюкоамилаза (α -1,4:1,6 глюкан-4,6-глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3) катализирует реакцию гидролиза крахмала до глюкозы, атакуя только внешние нередуцирующие концы цепей полиса-

харидов, и широко используется в разработке новых прогрессивных технологий.

ЭКСПЕРИМЕНТ

Объектом исследования послужил фермент глюкоамилаза из *Aspergillus awamori*, препарат Г20Х производства Ладыжинского завода ферментных препаратов, подвергнутый специальным методам очистки.

Сорбционную иммобилизацию фермента проводили на коллагене, выделенном ферментативным методом из соединительной ткани крупного рогатого скота на кафедре технологии мяса и мясосюродуктов Воронежской государственной технологической академии [10].

Для определения активности глюкоамилазы использовали глюкозооксидазный метод. Принцип метода заключается в том, что глюкоза окисляется кислородом воздуха при каталитическом действии глюкозооксидазы с образованием перекиси водорода и глюконата. Возникшую перекись водорода определяли по реакции окислительного азосочетания с замещенным фенолом и 4-аминоантипирином, которая катализируется пероксидазой.

Расчет каталитической активности производили по формуле:

$$A = \frac{a}{b \cdot 180 \cdot t},$$

где a — количество глюкозы, образовавшейся в 1 мл гидролизата, мкг; b — количество фермента в 1 мл гидролизата, мг/мл; t — время гидролиза, мин; 180 — молекулярная масса глюкозы.

В качестве субстрата использовали растворимый картофельный крахмал фирмы «Экрос».

Для осуществления процесса сорбции 5 г коллагена оставляли на ночь при комнатной температуре в 25.6 мл ацетатного буфера (рН 4.5). 5 мл раствора фермента (10^{-5} моль/л) добавляли к суспензии носителя и перемешивали в колбе с помощью электрической мешалки в течение 1.5 часа при температуре 25 °С. Центрифугировали при 3000 об/мин 5 мин, осадок промывали ацетатным буфером (рН 4.5), затем дистиллированной водой до отсутствия в промывных водах белка (контроль осуществляли на спектрофотометре СФ-26 при $\lambda = 280$ нм). Содержание белка в сорбционно связанном ферменте определяли модифицированным методом Лоури [11], а каталитическую активность — глюкозооксидазным методом, причем инкубацию сорбированного фермента с субстратом осуществляли при перемешивании с помощью магнитной мешалки в течение 30 минут.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В связи с вышеизложенным нами была проведена сорбционная иммобилизация глюкоамилазы (α -1,4:1,6 глюкан-4,6-глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3) на коллагене.

Для выявления условий наиболее эффективной сорбции глюкоамилазы из *Aspergillus awamori* на коллагене были проведены исследования влияния исходной концентрации белка, времени инкубации, температуры и содержания ионов водорода на количество связанного белка [12, 13].

На рисунке 1 представлена зависимость количества сорбированного фермента от концентрации ионов водорода.

Оптимальное значение ионов водорода при котором происходит процесс сорбции составляет 4.5—5.0, что согласуется с данными ряда авторов. [14, 15]. При данных значениях рН фермент в своей структуре имеет нейтральный заряд, что позволяет ему всунуть во взаимодействия сорбент-сорбат.

Следующей серией экспериментов было выявление исходной концентрации фермента необходимой для осуществления процесса сорбции при оптимальном значении рН.

Установлено, что при начальной концентрации фермента 1×10^{-5} моль/л осуществляется наиболее эффективное взаимодействие фермент-носитель (рис. 2).

Для определения времени, в течение, которого необходимо проводить процесс сорбции, было изучено влияние продолжительности инкубации на количество связанного белка (рис. 3).

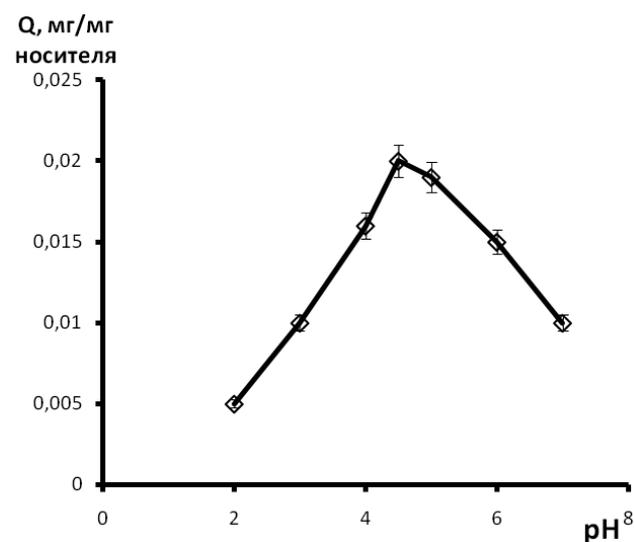


Рис. 1. Зависимость количества сорбированной глюкоамилазы Q (мг/мг носителя) от концентрации ионов водорода. Q — количество сорбированной глюкоамилазы (мг/мг носителя)

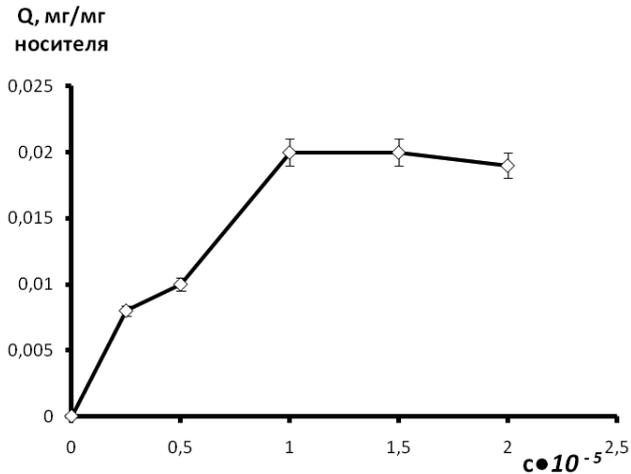


Рис. 2. Зависимость количества сорбированной глюкоамилазы (мг/мг носителя) от исходной концентрации белка в растворе (моль/л) при рН 4,7. Q — количество сорбированной глюкоамилазы (мг/мг носителя). C — исходная концентрация белка в растворе (моль/л)

Установлено, что максимальное количество фермента иммобилизуется на начальных стадиях, через 1,5 часа достигается равновесие. Количество сорбированной глюкоамилазы составило 20 мг/на г коллагена. На биополимере сорбируется 80% фермента.

Представленная на рис. 4 кривая сорбции глюкоамилазы из *Aspergillus awamori* коллагеном при различных температурах показала, что максимальная сорбция наблюдается при 50 °С.

Анализ результатов экспериментов свидетельствует о том, что адсорбционно иммобилизованная глюкоамилаза сохраняет 67% от каталитической активности нативного энзима.

Одной из сорбционных характеристик является сорбционная емкость. Сорбционная емкость составила 20 мг на 1 г коллагена [16].

Множественность применения ферментов является одним из преимуществ при сорбции биообъекта, что обеспечивает достаточно высокую стойкость энзима и возможность отделения продукта в чистом виде. В связи с этим нами было изучено многократное применение сорбированной глюкоамилазы в реакторе периодического действия. Комплекс глюкоамилаза-коллаген обладает достаточной прочностью и не разрушался при гидролизе крахмала, что, по-видимому, объясняется большим количеством связей в комплексе фермент-носитель. Экспериментальные данные показывают, что при 10-кратном применении связанный с коллагеном фермент сохраняет 66,25% каталитической активности свободного фермента (рис. 5).

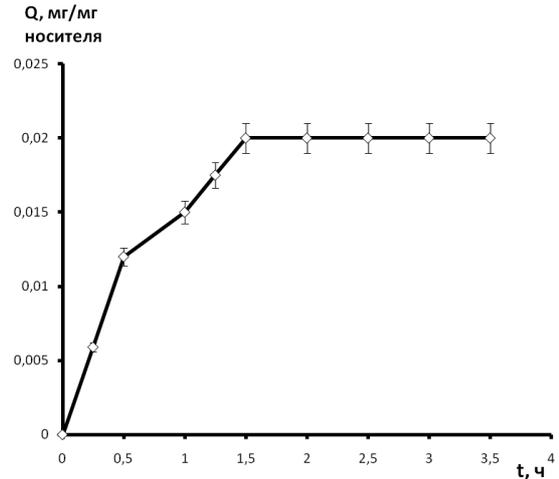


Рис. 3. Кинетическая кривая сорбции глюкоамилазы коллагеном. Q — количество сорбированной глюкоамилазы (мг/мг носителя), t — продолжительность процесса (ч)

Установлено, что каталитическая активность фермента и содержание белка в сорбированном на коллагене препарате, который хранился в лабораторных условиях, не изменялись в течение 2 лет. Очевидно, фермент достаточно прочно связывается с матрицей носителя, существенно не изменяя при этом каталитически активной конформации, что позволяет применять коллаген в качестве сорбента и протектора низко- и высокоактивных веществ.

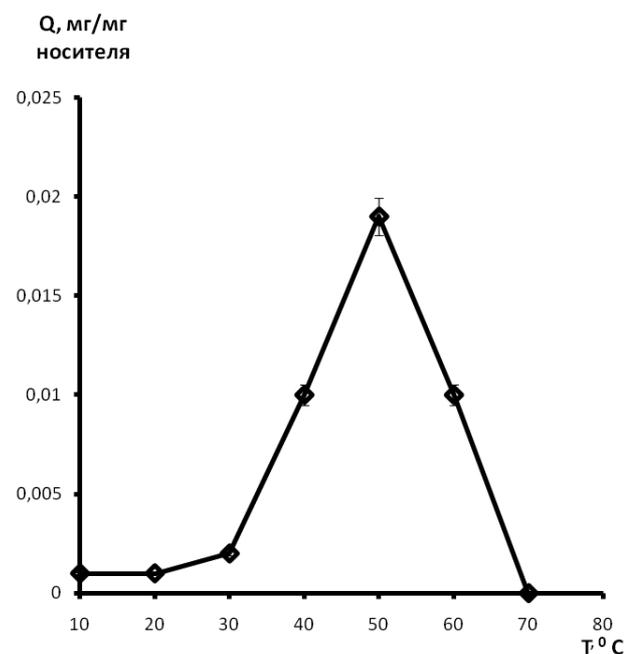


Рис. 4. Зависимость количества сорбированной глюкоамилазы от температуры. Q — количество сорбированной глюкоамилазы (мг/мг носителя), T — температура

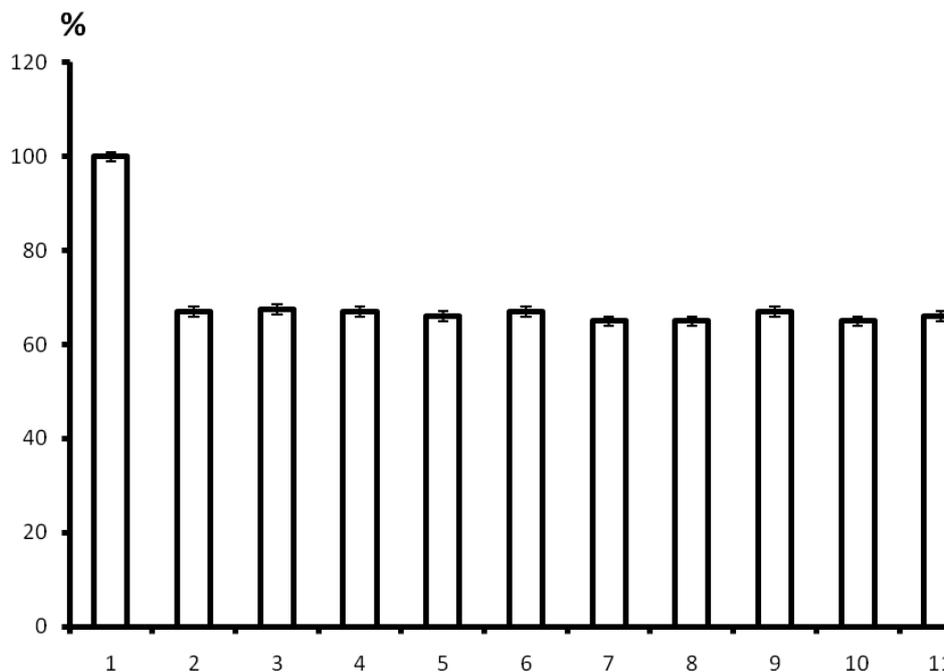


Рис. 5. Многократность применения сорбированной глюкоамилазы из *Aspergillus awamori* на коллагене: 1 — свободный фермент; 2 — сорбированный фермент после 1 применения; 3 — -//- после 2 применения; 4 — -//- после 3 применения и т. д.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлено, что коллаген может быть носителем и протектором лекарственных и биологически активных веществ, пролонгируя их нахождение в организме. Структурно-механические и физико-химические свойства коллагена открывают широкие перспективы для получения ряда полезных продуктов различного назначения (пролонгаторы основных лекарственных форм, биологически активные компоненты в составе косметических средств, пищевые пленки, хирургические материалы).

Поэтому решение многочисленных проблем, связанных с исследованием основных закономерностей иммобилизации биологически активных веществ на биополимерах белковой природы, в частности белках соединительной ткани, является необходимым условием для создания новых технологических разработок, лекарственных препаратов, обладающих пролонгированным действием.

Вышеизложенное позволяет рекомендовать коллагеновые волокна для многократного использования в лабораторных и промышленных условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мазуров В. И. Биохимия коллагеновых волокон // В. И. Мазуров. М.: Медицина, 1974. — 248 с.
2. Коллагенопластика в медицине // сост. : И. А. Сыченников, [и др.] ; под ред. В. В. Кованова и И. А. Сыченикова. — М.: Медицина, 1978. — С. 50—83.

3. Хилькин А. М. Коллаген и его применение в медицине // А. М. Хилькин, А. Б. Шехтер, Л. П. Истратов, В. Л. Леменев. — М.: Медицина, 1976. — С. 64—74.

4. Ямпольская Г. П., Левачев С. М., Харлов А. Е., Фадеев А. С., Измайлова В. Н. // Вестн. Моск. ун-та. — 2001. — Сер.2, Химия, Т. 42, №5, С. 355—362.

5. Краснюк И. И. Фармацевтическая технология: Технология лекарственных форм / И. И. Краснюк. — М.: Академия, 2004. — 464 с.

6. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов / И. М. Грачева, А. Ю. Кривова. — 3-е изд. — М.: Элевар, 2000. — 512 с.

7. Зайдес А. А. Структура коллагена и ее изменения при обработках / А. А. Зайдес. — М.: Легкая индустрия, 1972. — 168 с.

8. Жеребцов Н. А. Амилолитические ферменты в пищевой промышленности / Н. А. Жеребцов. — М. : Легкая и пищевая промышленность, 1984. — 160 с.

9. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов / И. М. Грачева, А. Ю. Кривова. — М. : Элевар, 2000. — 512 с.

10. Антипова Л. В., Глотова И. А. Использование вторичного коллагенсодержащего сырья мясной промышленности / Л. В. Антипова, И. А. Глотова. — СПб : ГИО РД, 2006. — 384 с.

11. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. — М.: Высш. шк., 1980. — 272 с.

12. Березин И. В. Основы физической химии ферментативного катализа / И. В. Березин, К. Мартинек. — М. : Высшая школа, 1977. — 280 с.

13. Варфоломеев С. Д. Биокинетика: Практический курс / С. Д. Варфоломеев. — М.: ФАИР-ПРЕ СС, 1999. — 720 с.

14. Шкутина И. В., Стоянова О. Ф., Селемев В. Ф. Особенности адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на волокнистых полиэлектролитах // Журнал прикладной химии. 2005. Т.78. Вып. 6. С. 1003—1005.

15. Перминова Л. В. Исследование гетерогенного биокаталитического процесса гидролиза декстринов : автореферат дис. канд. хим. наук : 02.00.15 / Л. В. Перминова ; Ин-т катализа им. Г. К. Борескова Сиб. отд-ния РАН. — Новосибирск, 2006. — 16 с. : ил., табл. — Библиогр.: с. 15—16. — На правах рукописи.

16. Грег С., Синг К. Адсорбция, удельная поверхность, пористость. М.: Мир, 1984. 407 с.

Ковалева Тамара Андреевна — профессор кафедры биофизики и биотехнологии, д.б.н. Воронежского государственного университета; e-mail: Tamarakovaleva@inbox.ru, тел.: (4732) 208586

Kovaleva Tamara A. — professor of biotechnology department, doctor of biological science, Voronezh State University; e-mail: Tamarakovaleva@inbox.ru, tel.: (4732) 208586

Макарова Екатерина Леонидовна — ассистент кафедры биохимии ВГМА, аспирант кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета; e-mail: makarova7809@mail.ru, тел.: (4732) 208586

Makarova Ekaterina L. — assistant of biochemistry department, Voronezh N. N. Burdenko State Medical Academy; e-mail: makarova7809@mail.ru, tel.: (4732) 208586

Короткова Елена Викторовна — студент кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета; e-mail: Tamarakovaleva@inbox.ru, тел.: (4732) 208586

Korotkova Elena V. — student of biophysics and biotechnology department, Voronezh State University; e-mail: Tamarakovaleva@inbox.ru, tel.: (4732) 208586