

ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ СОВМЕСТНОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ ТРИПСИНА И ЛИПАЗЫ НА ХИТОЗАНЕ

А. И. Сливкин, А. С. Беленова, Ю. В. Добрина, С. И. Провоторова

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 22.04.2014 г.

Аннотация. Получен комплексный биопрепарат на основе иммобилизованных на хитозане липазы и трипсина. Разработана методика совместной адсорбционной иммобилизации липазы и трипсина на матрице хитозана, в результате которой сохраняется до 65 % липолитической активности комплекса и до 93% протеолитической активности. Оптимальными условиями для иммобилизации оказались значения pH 5,8 при использовании фосфатной буферной системы. Результаты исследований могут в дальнейшем использоваться для получения лекарственных форм на основе данных энзимов.

Ключевые слова: липаза, трипсин, хитозан комплексный препарат.

Abstract. The complex biological preparation on the basis of immobilized on the hitosane of a lipase and trypsin is received. The technique of combined adsorptive immobilization of a lipase and trypsin on a matrix of a hitosane as a result of which remains to 65% of lipolitikal activity of a complex and to 93% of proteolytic activity is developed. Values pH 5,8 when using phosphatic buffer system appeared optimum conditions for an immobilization. Results of researches can be used further for receiving medical forms on the basis of these enzymes.

Keywords: lipase, trypsin, hitosane, complex preparation.

В медицине иммобилизация ферментов открыла путь к созданию лекарственных средств пролонгированного действия со сниженной токсичностью и аллергенностью. Подход иммобилизации способствуют решению проблемы снижения токсичности, пролонгации действия, направленного транспорта лекарств в организме.

В настоящее время внимание исследователей направлено на разработку новых ферментных препаратов иммобилизованных на различных носителях [1-5].

Подбор носителей при иммобилизации ферментов для клинического применения представляет собой определенную экспериментальную задачу, так как к подобного рода подложкам, кроме основных требований, предъявляются еще и ряд специальных установок, учитываемых фармакологической безопасностью, биодоступно-

стью и особенностями доклинических и клинических испытаний.

Одним из таких носителей является хитозан, получаемый при диацетилировании хитина. По химической структуре хитозан является сополимером D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина. Химические свойства хитозана зависят от его структуры. Большое количество свободных аминогрупп в молекуле хитозана определяет его способность связывать ионы водорода и приобретать избыточный положительный заряд. Хитозан является универсальным сорбентом, связывающим широкий спектр веществ органической и неорганической природы, в том числе и ферментов [6].

В связи с применением хитозанов в составах лекарственных препаратов [7, 8], их высокой биологической совместимостью и низкой токсичностью, они становятся перспективными для создания новых лекарственных препаратов пролонгированного действия [9-12].

Целью данной работы явилось создание комплексного биокатализатора на основе трипсина и липазы, иммобилизованных на хитозане, подбор условий для их совместной иммобилизации.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования служили трипсин (Самсон-мед) и липаза из поджелудочной железы свиньи (Sigma). В качестве субстрата для трипсина использовали 1% казеин в фосфатном буфере pH 7.5, для липазы, оливковое масло, эмульгированное с равным объемом 1% раствора поливинилового спирта. В качестве полимерного носителя применяли хитозан, синтезированный на кафедре фармацевтической химии и фармацевтической технологии Воронежского государственного университета.

Совместная иммобилизация трипсина и липазы на хитозане осуществлялась по следующей методике: 1 г носителя оставляли на 1 час при комнатной температуре в 10 мл фосфатного буфера (pH 5.8). 5 мл раствора липазы ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) добавляли к суспензии носителя и перемешивали в колбе с помощью магнитной мешалки в течение 2 часов при 25° С. Полученную смесь центрифугировали в течение 5 мин, осадок промывали буфером (pH 5.8) до отсутствия белка в промывных водах (контроль осуществляли на спектрофотометре Hitachi при 280 нм), аналогично проводили иммобилизацию трипсина на препарат иммобилизованной липазы.

Активность липазы в комплексном препарате определяли спектрофотометрическим методом Андерсона-Маккарти, основанном на измерении оптической плотности окрашенных продуктов взаимодействия основной формы цветного реагента родамина 6Ж в бензоле и карбоновых кислот, освобождающихся в ходе гидролиза субстрата. В качестве субстрата использовали оливковое масло, эмульгированное с равным объемом 1 %-ного раствора поливинилового спирта. [13].

Определение протеолитической активности ферментного препарата осуществляли по стандартной методике. За единицу протеолитической активности принимают такое количество препарата, которое за одну минуту при температуре 37 °С катализирует расщепление казеина до неосаждаемых кислотой трихлоруксусной продуктов гидролиза, эквивалентных одному микромолю тирозина [14].

Для определения количества белка использовали модифицированный метод Лоури [15].

Все экспериментальные исследования осуществляли в 4-8 кратной повторности. Статистическая обработка полученных результатов проводилась традиционным способом при уровне значимости 5 % с использованием t-критерия Стьюдента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В связи с тем, что при совместной иммобилизации с трипсином может происходить инактивация липазы, нами была проведена серия экспериментов по определению порядка иммобилизации трипсина и липазы (рис. 1 и рис. 2).

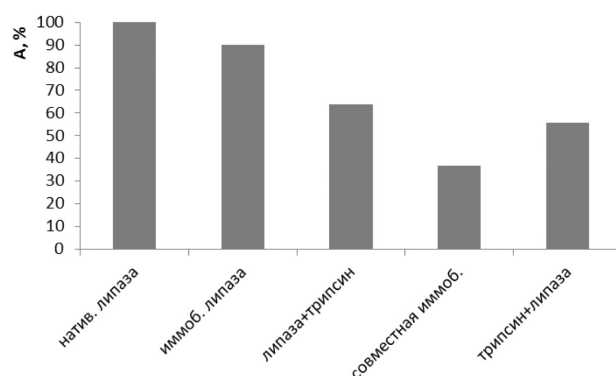


Рис. 1. Зависимость липолитической активности комплексного препарата от порядка иммобилизации

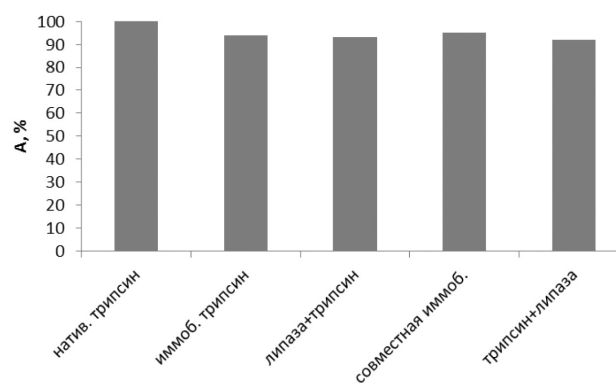


Рис. 2. Зависимость протеолитической активности комплексного препарата от порядка иммобилизации

Результаты экспериментов показывают, что порядок иммобилизации не влияет на протеолитическую активность комплекса. Наибольшее сохранение липолитической активности (65%) проявляется при предварительной иммобилизации липазы на носителе и последующем присоединении трипсина. Данный эффект может быть связан со стабилизирующими свойствами

матрицы по отношению к белковой глобуле липазы.

Проведен сравнительный анализ эффективности иммобилизации при различном соотношении концентраций молекул липазы, трипсина и хитозана в системе. Для этого при иммобилизации использовали растворы трипсина и липазы в концентрации 10^{-4} и $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, дальнейшее увеличение концентрации энзимов мы посчитали не целесообразным с точки зрения стоимости готового продукта (табл. 1).

Таблица 1
Зависимость активности энзимов от концентрации ферментов при иммобилизации

Концентрации ферментов, моль/л	Протеолитическая активность ферментного препарата, ед/г носителя	Липолитическая активность ферментного препарата, ед/г носителя
10^{-4}	1.69	8.4
$5 \cdot 10^{-5}$	1.14	7.8

В результате проведенных экспериментов показано, что оптимальной с химической и экономической точки зрения концентрацией ферментов явилась концентрация 10^{-4} моль/л, в то же время и концентрация $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л показала достаточно высокое значение каталитической активности.

Ранее было показано, что оптимальным рН для иммобилизации трипсина являлся рН 5.8 [16]. В тоже время, Ковалева Т.А. и соавт. (2010) установлено, что иммобилизованная на хитозане липаза мало чувствительна к изменениям рН среды, процент сохранения активности при снижении рН с 7.0 до 5.8 составляет 75% [17]. В связи с этим для дальнейшей совместной иммобилизации липазы и трипсина нами были использованы буферные системы с рН 5.8.

При исследовании зависимости каталитической активности ферментов от состава буферной среды (табл. 2) использовались следующие буферные системы: фосфатная, ацетатная, сукцинатная, фосфатно-цитратная (рН 5.8).

Показано, что каталитическая активность совместно иммобилизованных ферментов при использовании фосфатного буфера наиболее высокая. При использовании фосфатно-цитратного буфера каталитическая активность липазы остается достаточно высокой, в тоже время скорость протеолиза снижается. Применение ацетатной и

сукцинатной буферных систем приводит к резкому снижению каталитической активности обоих ферментов.

Таблица 2
Зависимость каталитической активности энзимов от состава буферной системы при рН 5.8.

Буфер	Протеолитическая активность	Липолитическая активность
Ацетатный	0.33	3.2
Фосфатный	1.14	7.8
Сукцинатный	0.26	2.8
Фосфатно-цитратный	0.28	7.2

В ходе проведенных исследований была разработана методика совместной адсорбционной иммобилизации липазы и трипсина на матрице хитозана, в результате которой сохраняется до 65 % липолитической активности комплекса и до 93% протеолитической активности. Оптимальными условиями для иммобилизации оказались значения рН 5,8, что, вероятно, связано с тем, что рК хитозана колеблется около величин 6,3–6,5 в зависимости от степени деацелирования молекулы. Оптимальной буферной системой явилась фосфатная буферная система.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, получен комплексный био-препарат на основе иммобилизованных на хитозане липазы и трипсина. Подобраны условия совместного связывания ферментов с носителем. Результаты исследований могут в дальнейшем использоваться для получения лекарственных форм на основе данных энзимов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иммобилизация гидролитических ферментов на анионитах / Ковалева Т.А. [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. — Т. 8, № 6. — С. 1035-1041.
2. Иммобилизация гидролитических ферментов и их применение в фармацевтической промышленности / Ковалева Т.А. [и др.] // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования Материалы 3-й Всероссийской научно-методической конференции. Под общей редакцией С.А. Боева. — 2007. — С. 159.
3. Иммобилизация липазы на поли-N-винилпирролидоне / Ковалева Т.А., Беленова А.С., Шаталов Г.В. // Бюллетень эксперименталь-

ной биологии и медицины. — 2011. — Т. 151, № 4. — С. 395-397.

4. Иммобилизация гидролаз как один из путей регулирования и стабилизации их активности / Холявка М.Г. [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. — 2013. — Т. 11, № 7. — С. 029-035.

5. Разработка технологии создания биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на хитозане / Беленова А.С. [и др.] // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ Материалы 5-й Международной научно-методической конференции «Фармобразование - 2013». — 2013. — С. 183-185.

6. Хитозан для фармации и медицины / Сливкин Д.А. [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2011. — № 2. — С. 214-232.

7. Acaturk F. Preparation of a prolonged-release tablet formulation of diclofenac sodium. Part 1: Using chitosan / F. Acaturk // Pharmazie. — 1989. — № 44. — P. 547-549.

8. Chitosan matrix tablets: The influence of excipients of drug release / T. Kristmundsdottir [et al.] // Drug dev. ind. Pharm. — 1995. — № 21. — P. 1591-1598.

9. Chitosan tablets for the controlled release of theophylline: effect of polymer drug: Wet or dry binding and anionic-cationic interpolymer complex / M. Fwu-Long [et al.] // J. appl. polym. sci. — 1997. — V. 66. — P. 2495-2505.

10. Diseno de un sistema matriz de liberacion prolongada a base de quitosano de produccion chilena / C. Tapia [et al.] // Acta farmaceutica bonaerense. — 1995. — V. 14, №3. — P. 163-172.

11. Разработка состава твердых лекарственных форм, содержащих пантогам, кислоту янтарную и хитозан / Беленова А.С. [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2013. — № 2. — С. 164-168.

12. Разработка сиропобразной лекарственной формы ноотропного действия на основе пантогама, кислоты янтарной и хитозана / Сливкин А.И. [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2013. — № 1. — С. 200-206.

13. Anderson M.M. Rapid and sensitive assay for free fatty acids using rodamine 6G / M.M. Anderson // Analytical Biochemistry. — 1972. — Vol. 45, №1. — P. 271-276.

14. Подбор методики количественного определения трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана и его каталитической активности / Логинова О.О. [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2013. — № 2. — С. 116-119.

15. Физико-химические и кинетико-термодинамические аспекты катализа свободными и иммобилизованными амилазами / Ковалева Т.А. // Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Воронеж, 1998. — 421 с.

16. Разработка биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на хитозане / Сливкин А.И. [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2013. — Т. 13, № 1. — С. 53-59.

17. Хитозан как перспективный носитель для иммобилизации липазы / Ковалева Т.А. [и др.] // Биотехнология. — 2010. — № 4. — С. 59-64.

Сливкин Алексей Иванович — д.фарм.н., проф., зав. каф. фармацевтической химии и фармацевтической технологии, ВГУ; тел.: 255-47-76; e-mail: slivkin@pharm.vsu.ru

Беленова Алена Сергеевна — к.б.н., младший научный сотрудник кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии ВГУ, тел.: 253-07-89; e-mail: belenova@pharm.vsu.ru

Slivkin Alexsey Y. — Full Professor, PhD, Dsci, Head of the pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology department, VSU; tel.: 255-47-76; e-mail: slivkin@pharm.vsu.ru

Belenova Alena S. — candidate of biology science, junior researcher of the pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology department, Voronezh State University, tel.: 255-07-89; e-mail: belenova@pharm.vsu.ru

Добринина Юлия Владимировна — младший научный сотрудник кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии ВГУ, тел.: 253-07-89; e-mail: dobrina@pharm.vsu.ru

Провоторова Светлана Ильинична — к.фарм.н. ассистент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета ВГУ; тел.: 253-07-89; e-mail: provotorova-svetlana@mail.ru

Dobrina Yulia V. — junior researcher of the pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology department, Voronezh State University, tel.: 255-07-89; e-mail: dobrina@pharm.vsu.ru

Provotorova Svetlana I. — candidate of pharm. science, the assistant of faculty of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology of pharmaceutical faculty VSU; tel.: 255-07-89; e-mail: provotorova-svetlana@mail.ru