УДК 615.012.6

ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И КИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОМПЛЕКСНОГО ФЕРМЕНТНОГО БИОПРЕПАРАТА

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

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»
Поступило в редакцию 19.05.2014 г.

Аннотация. Разработан комплексный препарат липазы и трипсина, иммобилизованных на хитозане. Установлено, что при совместной иммобилизации с трипсином на хитозане, липаза сохраняет 65% активности нативного фермента, при этом диапазон оптимальных температур гидролиза триглицеридов расширяется, оптимум pH и кинетика ферментативного процесса расщепления триглицеридов не изменяются.
Ключевые слова: липаза, трипсин, хитозан комплексный препарат.

Abstract. The complex preparation of a lipase and the trypsin immobilized on the hitosane is developed. It is established that at a joint immobilization with trypsin on the hitosane, the lipase keeps 65% of activity of native enzyme, thus the range of optimum temperatures of hydrolysis of triglycerides extends, the optimum of pH and kinetics of enzeme process of splitting of triglycerides remains invariable.
Keywords: lipase, trypsin, hitosane, complex preparation.

Достижения энзимологии находят все большее применение в профилактике, диагностике и лечении болезней. Успешно развивается новое направление энзимологии – медицинская энзимология. Одним из ее направлений является энзимотерапия - использование ферментов в качестве лекарственных средств.

В настоящее время при создании новых лекарственных веществ на основе энзимов широко применяют метод иммобилизации на различных носителях. В связи с тем, что применение энзиматических препаратов на основе иммобилизованных ферментов приводит к уменьшению степени аллергенности и способствует пролонгированию действия лекарственных средств, особую значимость приобретает поиск новых носителей, которые сами по себе могут являться самостоятельными лекарственными средствами.

Одним из таких носителей является хитозан – линейный нетоксичный полимер, обладающий катионными свойствами, и при pH менее 6,5 он имеет положительный заряд. Благодаря этим важным свойствам данное соединение является ценным при применении его в биомедицине. Наиболее важными из биологических свойств хитозана является биосовместимость, которая имеет особую значимость, за счет того, что происхождение материала является естественным. Тот факт, что соединение способно к биодеградации до N-ацетилглюкозамина, растворяющегося в организме, который его использует. Также большое значение имеют эффект регенерации соединительной ткани и факт ускорения образования остеобластов, ответственных за образование костей. Sandford и Steiner выявили, кроме того, следующие биологические свойства хитозанов такие как: кровоостанавливающее, бактерицидное, фунгисгатическое, спермицидное, противоопухолевое, антихолестерольное, иммуномодулирующее действие [1].

Рядом авторов проводились исследования по иммобилизации различных энзимов на хитозане [2-6], однако, имеется мало работ, касающихся разработки комплексных препаратов ферментов, связанных с хитозаном.

© Сливкин А. И., Беленова А. С., Добрина Ю. В., Провоторова С. И., 2015

В этой связи целью данной работы явилось исследование физико-химических и кинетических свойств комплексного препарата, содержащего липазу и трипсин, иммобилизованных на хитозане.

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, полученный 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, высвобождающихся в ходе гидролиза субстрата. В качестве субстрата использовали оливковое масло, эмульгированное с равным объемом 1 %-ного раствора поливинилового спирта [7].

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 [9].

Для определения количества белка в иммобилизованном препарате использовали модифицированный метод Лоури [9].

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 ходе работы установлено, что совместная иммобилизация с липазой не влияет на физико-химические и кинетические свойства иммобилизованного трипсина.

Показано, что при иммобилизации липазы совместно с трипсином на исследуемом носителе каталитическая активность энзима снижается на 35 % по сравнению со свободным ферментом

При изучении зависимости каталитической активности иммобилизованной липазы в комплексе с хитозаном и трипсином от температуры гидролиза триглицеридов установлено, что в комплексном препарате происходит расширение диапазона оптимальных температур гидролиза триглицеридов до 37-50 °С (рис. 1), при этом наблюдается изменение формы кривой зависимости липолитической активности от температуры.

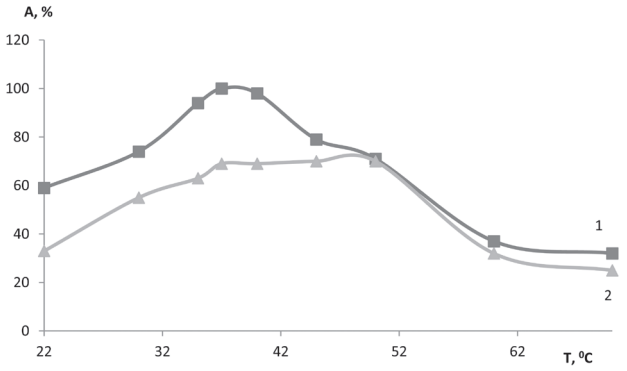

Рис. 1. Зависимость каталитической активности иммобилизованной липазы (1) и липазы в комплексном препарате (2) от температуры гидролиза

При анализе зависимости каталитической активности иммобилизованной липазы от pH среды установлено, что оптимум pH при совместной иммобилизации с трипсином не изменяется и составляет 7,0 (рис. 2).

В ходе работы обнаружено, что кинетика процесса расщепления субстрата иммобилизованным ферментом при совместной иммобилизации не изменяется и подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен (рис. 3).

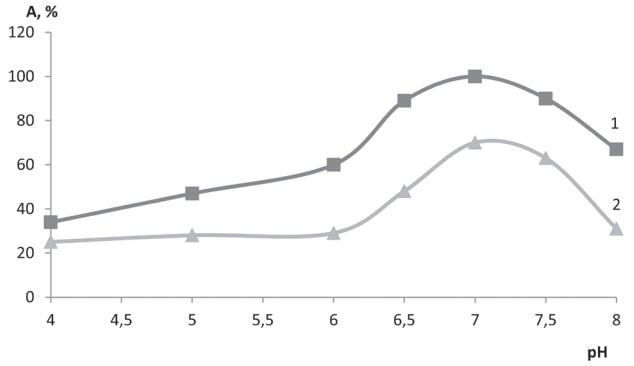

Рис. 2. Зависимость каталитической активности иммобилизованной липазы (1) и липазы в комплексном препарате (2) от pH среды.

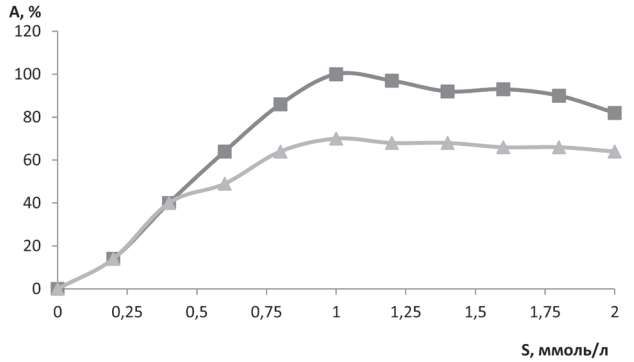

Рис. 3. Зависимость каталитической активности иммобилизованной липазы (1) и липазы в комплексном препарате (2) от концентрации субстрата

Таким образом, в ходе исследований выявлено, что при совместной иммобилизации с трипсином на хитозане, липаза сохраняет 65% активности нативного фермента, при этом диапазон оптимальных температур гидролиза триглицеридов расширяется, оптимум pH и кинетика ферментативного процесса расщепления триглицеридов остается неизменной. Проведенные эксперименты являются первым этапом исследований, направленных на получение новых лекарственных средств пролонгированного действия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

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

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

4. Разработка технологии создания биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на хитозане / А.С. Беленова [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.

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

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

7. 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.

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

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

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

Добрина 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

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

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 facultyof pharmaceuticat chemistry and pharmaceuticat technology of pharmaceuticat faculty VSU; tel.: 255-07-89; e-mail: provotorova-svetlana@mail.ru