

ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ СВОБОДНОГО И ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА МАТРИЦЕ ХИТОЗАНА ТРИПСИНА

В. А. Королева, Ф. А. Сакибаев, Т. Н. Шеломенцева, М. Г. Холявка, В. Г. Артюхов

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 15.02.18 г.

Аннотация. Поддержание высоких температур в каталитических процессах обеспечивает значительные преимущества технологической линии: снижается микробное загрязнение реакционной среды, увеличиваются растворимость компонентов и скорость реакции. Иммобилизация на нерастворимых носителях может способствовать существенному повышению термостабильности ферментов.

Трипсин (КФ 3.4.21.4) применяется в медицине в качестве противовоспалительного, противоречного и ранозаживляющего агента. Нарушение нативной структуры трипсина и, как следствие, потеря его активности обеспечиваются такими процессами, как агрегация и автолиз.

В связи с вышесказанным, целью работы было изучить закономерности процессов термической инактивации свободного и иммобилизованного на матрице хитозана трипсина.

Установлено, что в диапазоне температур 25-40 °С при концентрациях трипсина 1 и 4 мг/мл радиус частиц в системе составлял порядка 2 нм, что соответствует нативной форме фермента. При 45 °С регистрировалось протекание процессов автолиза и агрегации молекул энзима. При 53 и 59 °С процессы агрегации белка преобладали над процессами автолиза – среднее количество агрегатов в растворе составляло 82 % при 53 °С и 92 % при 59 °С. Количество агрегатов значительно возросло с увеличением температуры и времени инкубации. При концентрации трипсина 20 мг/мл и 70 °С наблюдалась полная агрегация частиц в системе.

Показано, что потеря каталитической способности трипсина после инкубации его раствора при 50 °С составляла порядка 80 %, иммобилизованный фермент, напротив, сохранял 80 % и более своей активности после одного часа инкубации. Практически полная инактивация свободного трипсина наблюдалась при 60 и 70 °С после часовой и 30-минутной инкубации соответственно. Фермент, иммобилизованный на матрице среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов, был более стабилен при 60 °С и сохранял 39 и 62 % энзиматической способности от первоначального уровня после 60 минут нагревания. Трипсин, сорбированный на среднемолекулярном хитозане, существенно инактивировался уже после 10 минут инкубации в условиях 70 °С и сохранял 21 % от своей каталитической активности. При 70 °С энзим, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане, терял каталитическую способность в более выраженной форме.

Ключевые слова: трипсин, хитозан, иммобилизация, термоинактивация

Применение ферментных препаратов в настоящее время имеет широкое распространение в промышленности. Значительные преимущества обеспечивает поддержание высоких температур в ферментативных процессах, поскольку при этом снижаются микробное загрязнение реакционной среды и вязкость раствора, повышаются растворимость компонентов и скорость реакции. Однако сам энзим подвергается воздействию экстремаль-

ного фактора, приводящего к его инактивации посредством нарушения нативной конформации и агрегации. В случае с протеазами также имеет место автолиз [1]. Для обеспечения наиболее оптимальных условий биотехнологического использования фермента необходимо поддерживать его термическую стабильность.

Трипсин (КФ 3.4.21.4) – протеолитический фермент, расщепляющий пептиды и белки, обладает также эстеразной активностью; применяется в медицине в качестве противовоспалительного, противоречного и ранозаживляющего агента [2].

Трипсин используется также для получения суспензий отдельных клеток путем гидролиза межклеточного склеивающего белкового вещества [3]. Молекула бычьего трипсина состоит из 223 аминокислотных остатков. Масса молекулы равна 23-24 кДа, средний радиус – порядка 2 нм [4, 5]. Оптимум протеолитической активности энзима составляет 40-45 °С, оптимум эстеразной активности ~55 °С [7-9]. Инактивация фермента происходит при температурах 60-70 °С [10-12].

Нарушение нативной структуры трипсина и, как следствие, потеря активности обусловлены как процессами агрегации, так и автолиза молекул белка. В связи с этим большую роль в изучении механизма термической инактивации протеолитических ферментов играет выявление динамики изменения размера молекул энзима. Среди известных в настоящее время путей детектирования размерных параметров белков одним из наиболее распространенных является метод динамического светорассеяния, который основан на Доплеровском смещении и позволяет с высокой точностью измерять коэффициент поступательной диффузии макромолекул в растворе и рассчитывать их гидродинамический радиус с помощью уравнения Стокса-Эйнштейна [13].

Иммобилизация фермента на нерастворимом носителе позволяет повысить его термостабильность [14]. Благодаря закреплению молекул энзима на носителе затрудняется разворачивание его молекул, что препятствует тепловой денатурации, а также при этом ограничиваются межмолекулярные контакты и предотвращается процесс автолиза за протеаз [1].

Хитозан представляет собой линейный полисахарид, содержащий сополимеры N-ацетилглюкозамина и глюкозамина. Его получают путем частичного деацетилирования хитина из панцирей ракообразных. Для медицины и ветеринарии хитозан представляет особый интерес в качестве носителей для различного рода биоматериалов (белки, клетки и др.) [14-16].

Цель работы – изучение закономерностей процессов термической инактивации свободного и иммобилизованного на матрице хитозана трипсина.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования был выбран трипсин фирмы «MP Biomedicals», субстратом для гидролиза служил N-бензол-DL-аргинин-пара-нитроанилид (БАПНА) фирмы «Sigma-

Aldrich» [17], носителями для иммобилизации – кислоторастворимые среднемолекулярный (Mr = 200 кДа, степень деацетилирования – 82 %) и высокомолекулярный хитозаны (Mr = 350 кДа, степень деацетилирования – 94.85%) фирмы ЗАО «Биопрогресс».

Иммобилизацию трипсина на матрице хитозана осуществляли методом простой адсорбции белка на носителе. К 1 г хитозана добавляли 20 мл раствора белка (концентрация 1 мг/мл, 0.2 М фосфатный буфер с pH 6.5), инкубировали в течение 24 часов с периодическим перемешиванием [18]. Для определения количества белка в иммобилизованном препарате использовали метод Лоури [19].

Процесс термической инактивации нативного и иммобилизованного трипсина исследовали при температурах 50, 60 и 70 °С. Активность фермента выражали в абсолютных (ед/мг) и относительных (%) величинах.

Размеры молекул трипсина измеряли на приборе Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments). Обратный рассеянный свет от He/Ne-лазера мощностью 4 мВт (632.8 нм) собирали под углом 173° в диапазоне температур 25-80 °С [20].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В диапазоне температур 25-40 °С при концентрациях трипсина 1 и 4 мг/мл радиус частиц в системе составлял порядка 2 нм, что соответствует нативной форме фермента. При 45 °С, во-первых, регистрировалось появление частиц с величиной радиуса от 0.31 нм до 1.16 нм, присутствие которых может свидетельствовать о протекании процессов автолиза, во-вторых, появлялись крупные агрегаты, радиус которых составлял более 20 нм. При концентрациях 5, 10 и 20 мг/мл в диапазоне температур 25-80 °С присутствовали частицы, размером от 0.31 нм до 1.35 нм, и агрегаты, размером более 9 нм. При концентрации трипсина 20 мг/мл и температуре 70 °С наблюдается полная агрегация частиц в системе.

В процессе инкубации раствора трипсина с концентрацией 1 мг/мл при температуре 45 °С количество неагрегированных частиц снижалось в течение первых 40 минут и далее составляло в среднем 32.9 %. При 50 °С количество неагрегированных частиц снижалось в течение первых 15 минут инкубации и далее составляло в среднем 12.1 %. Наличие нативного фермента регистрировалось при 45 °С в течение всего времени инкубации, однако, нативные молекулы трипсина не обнаруживаются после 15 минут инкубации при

50 °С. Количество агрегатов значительно возрастает с увеличением времени инкубации при всех исследуемых температурах.

В процессе инкубации раствора трипсина с концентрацией 4 мг/мл при температуре 45 °С количество нативных молекул трипсина не претерпевало значительных изменений и составляло в среднем 75 % в течение всего времени инкубации. При 53 и 59 °С наличие нативной формы фермента не регистрировалось уже с начала инкубации. При данных температурах агрегация преобладает над автолизом – среднее количество агрегатов в растворе составляет 82 % при 53 °С, 92 % при 59 °С.

Далее мы провели исследование процессов термической инактивации нативного и иммобилизованного трипсина в диапазоне температур 50-70 °С. После 20 минут инкубации свободного энзима при 50 °С происходит снижение его ферментативной активности на 39 %. С увеличением времени инкубации наблюдается дальнейшее уменьшение активности фермента, которая после 60 минут прогревания составляет 24 % от начальной. При 60 и 70 °С потеря ферментом каталитической способности происходит после 10-минутной инкубации – на 65.2 и 81.1 % соответственно; после 40 минут нагревания трипсин был инактивирован на 96 % (рис. 1).

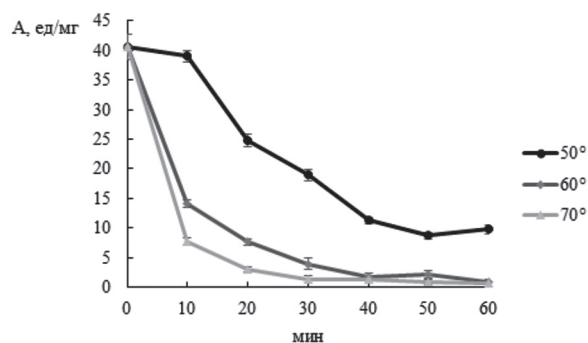


Рис. 1. Зависимость каталитической активности трипсина от времени термической инактивации

После инкубации в течение одного часа при 50 °С активность трипсина, сорбированного на среднемoleкулярном (СМ хтз) и высокомолекулярном (ВМ хтз) хитозанах, составила 74 % и 84 % соответственно. При 60 и 70 °С кривые инактивации фермента, иммобилизованного на среднемoleкулярном хитозане, статистически значимо не отличаются друг от друга, и каталитическая способность трипсина сохраняется на уровне 30 %, в то время как препарат, сорбированный на

высокомолекулярном хитозане, при 60 °С снизил свою активность на 40 %, а при нагревании при 70 °С после 10 минут инкубации практически полностью был термоинактивирован (рис. 2, 3).

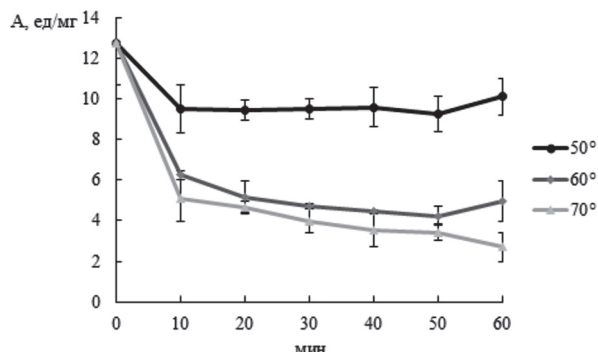


Рис. 2. Зависимость каталитической активности иммобилизованного на среднемoleкулярном хитозане трипсина от времени термической инактивации

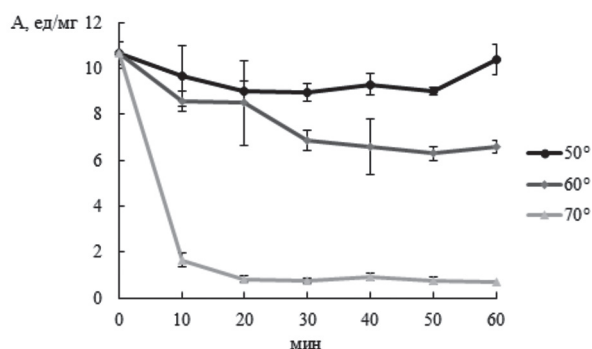


Рис. 3. Зависимость каталитической активности иммобилизованного на высокомолекулярном хитозане трипсина от времени термической инактивации

Далее мы проанализировали процент сохранения активности растворимого и иммобилизованного на матрице хитозана трипсина по сравнению с образцами, не претерпевающими нагревание, при инактивации в диапазоне температур 50-70 °С (рис. 4). Потеря каталитической способности растворимого энзима в процессе инкубации при 50 °С составляет порядка 80 %, иммобилизованный трипсин сохраняет 80 % и более своей активности после часа инкубации. Практически полная инактивация свободного трипсина наблюдается при 60 и 70 °С после часовой и 30-минутной инкубации соответственно. Фермент, иммобилизованный на среднемoleкулярном и высокомолекулярном хитозанах, более стабилен при 60 °С и сохраняет 39 и 62 % энзиматической способности от начальной

после 60 минут нагревания. Трипсин, сорбированный на среднемoleкулярном хитозане, быстро инактивируется уже после 10 минут инкубации в условиях 70 °C и сохраняет 21 % от своей каталитической активности. При 70 °C энзим, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане, теряет каталитическую способность гораздо быстрее.

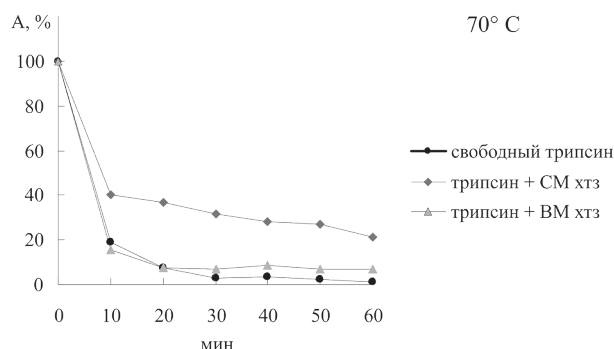
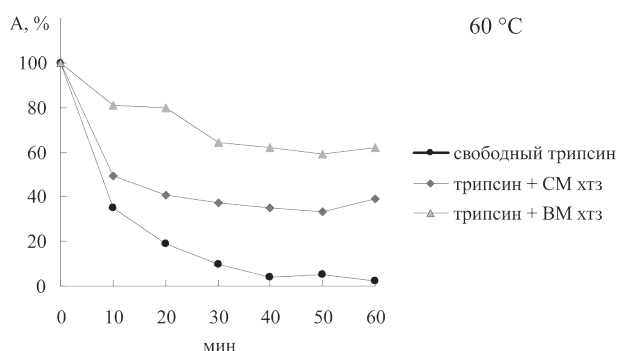
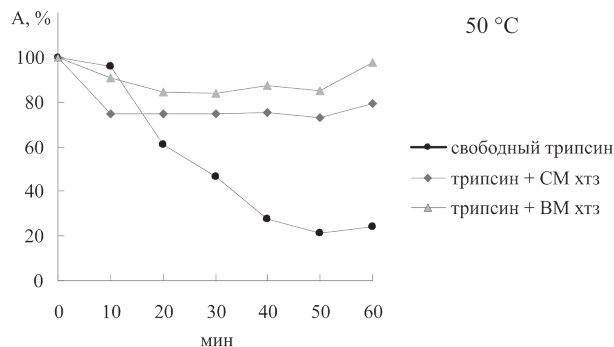


Рис. 4. Процент сохранения каталитической активности свободного и иммобилизованного трипсина в различные промежутки времени в ходе инкубации при 50-70 °

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучена динамика изменения размеров молекул трипсина в процессе термической инактивации его растворов. Установлена температурная зависимость интенсивности процессов автолиза и

агрегации молекул свободного фермента при различных его концентрациях. При 45 °C и концентрациях трипсина 1 и 4 мг/мл его нативная форма сохранялась более часа инкубации. С повышением температуры до 53 и 59 °C и концентрации трипсина существенно возрастала интенсивность процессов автолиза и агрегации. При концентрации трипсина 20 мг/мл и 70 °C наблюдалась полная агрегация частиц в изучаемой системе.

Иммобилизация трипсина на матрице среднемoleкулярного и высокомолекулярного хитозанов приводит к снижению степени потери каталитической активности фермента и способствует повышению его термостабильности. Вероятно, адсорбция энзима на носителе затрудняет разворачивание его молекул, ограничивает межмолекулярные контакты, предотвращает процессы автолиза и агрегации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Klivanov A.M. // *Advances in Applied Microbiology*. 1983. Vol. 29. pp. 1-28.
2. Холявка М.Г., Наквасина М.А., Артюхов В.Г. Практикум по биотехнологии: иммобилизованные биологические объекты в системе лабораторных работ. Воронеж, Издательский дом ВГУ, 2017, 161 с.
3. Базилов И.А., Гукасян А.Л., Зеленский В.А. // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2011. №2. С. 59-60.
4. Ступишина Е.А., Хамидуллин Р.Н., Вылегжанина Н.Н. Файзуллин Д.А., Зуев Ю.Ф. // *Биохимия*. 2006. Т. 71. № 5. С. 660-665.
5. Chiu K., Agoubi L.L., Lee I., Limpar M.T., Lowe JW Jr., Goh S.L. // *Biomacromolecules*. 2010. Vol. 11. pp. 3688-3692.
6. Venkatesh R., Sundaram P.V. // *Protein Engineering*. 1998. Vol. 11. № 8. pp. 691-698.
7. Villalonga R., Fernandez M., Fragoso A., Cao R., Mariniello L., Porta R. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2003. Vol. 38. pp. 53-59.
8. Xi F., Wu J., Jia Z., Lin X. // *Process Biochemistry*. 2005. Vol. 40. pp. 2833-2840.
9. Хабибулина Н.В., Вострилкина А.В., Красноштанова А.А. // *Катализ в промышленности*. 2012. №4. С. 73-79.
10. Gaertner HF., Puigserver AJ. // *Enzyme Microb. Technol.* 1992. Vol. 14. pp. 150-155.
11. Zhang, Z., He, Z., Guan, G. // *Biotechnol. Tech.* 1999. Vol. 13. pp. 781-786.
12. Treetharnmathurot B., Ovartharnporn C., Wungsintaweekul J., Duncan R, Wiwattanapatapee

R. // International Journal of Pharmaceutics. 2008. Vol. 357. pp. 252-259.

13. Lorber B., Fischer F., Bailly M., Roy H., Kern D. // Biochem. Mol. Biol. Educ. 2012. Vol. 40. pp. 372-382.

14. Артюхов В.Г., Ковалёва Т.А., Холявка М.Г., Битюцкая Л.А., Гречкина М.В. // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 4. С. 422-427.

15. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. Москва, Наука, 2002, 368 с.

16. Д. А. Сливкин, В. Л. Лапенко, О. А. Сафонова, С. Н. Суслина, А. С. Беленова. // Вест-

ник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2011. № 2. С. 214-232.

17. Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. // Биофармацевтический журнал. 2015. № 2. С. 13-16.

18. Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W. // Arch. Biochem. Biophys. 1961. Vol. 95. pp. 271-278.

19. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. pp. 265-275.

20. Kharat S.J. // Journal of Molecular Liquids. 2008. Vol. 140. № 1-3. pp. 10-14.

*Воронежский государственный университет
Королева В. А., аспирант кафедры биофизи-

ки и биотехнологии

Тел.: +7 (473) 220-85-86

E-mail: koroleva_victoria@bk.ru

Сакибаев Ф. А., студент кафедры биофизи-

ки и биотехнологии

Шеломенцева Т. Н., студент кафедры биофи-

зики и биотехнологии

Холявка М. Г., к.б.н., доцент кафедры биофи-

зики и биотехнологии

Тел.: +7 (473) 220-85-86

E-mail: holyavka@rambler.ru

Артюхов В. Г., д.б.н., профессор, зав. кафе-

дрой биофизики и биотехнологии

Тел.: +7 (473) 220-89-81

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Voronezh State University

**Koroleva V. A., post-graduate student of the
Department of Biophysics and Biotechnology*

Ph.: +7 (473) 220-85-86

E-mail: koroleva_victoria@bk.ru

*Sakibaev F. A., student of the Department of
Biophysics and Biotechnology*

*Shelomentseva T. N., student of the Department of
Biophysics and Biotechnology*

*Holyavka M. G., PhD (Biology), associated
professor of the Dept. of Biophysics and Biotechnology*

Ph.: +7 (473) 220-85-86

E-mail: holyavka@rambler.ru

*Artyukhov V. G., PhD., DSci., Full Professor, Head
of the Department of Biophysics and Biotechnology*

Ph.: +7 (473) 220-89-81

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

THE REGULATIONS OF THE THERMAL INACTIVATION OF TRYPSIN SOLUBLE AND IMMOBILIZED ON THE CHITOSANE MATRIX

V. A. Koroleva, F. A. Sakibaev, T. N. Shelomentseva, M. G. Holyavka, V. G. Artyukhov

Voronezh State University

Abstract. Maintaining high temperatures in catalytic processes provides significant advantages of the technological line: the microbial contamination of the reaction medium decreases, the solubility of the components and the reaction rate increase. Immobilization on insoluble carriers promotes a significant increase in the thermal stability of enzymes.

Trypsin (EC 3.4.21.4) is used in medicine as an anti-inflammatory, anti-edematous and wound-healing agent. Destruction of the native trypsin structure and the resulting loss of its activity is provided by such processes as aggregation and autolysis.

So, the work purpose was to study the regularities of the thermal inactivation processes of soluble and immobilized on the chitosan matrix trypsin.

It was found that the particle radius in the system is approximately 2 nm in the temperature range 25-40 °C at concentrations of trypsin of 1 and 4 mg/ml, which corresponds to the native form of the enzyme. Processes of autolysis and aggregation of enzyme molecules were recorded at 45 °C. Aggregation processes predominated over autolysis processes at 53 and 59 °C - the average number of aggregates in the solution was 82% at 53 °C, 92% at 59 °C. The number of aggregates increased significantly with increasing temperature and incubation time. At a trypsin concentration of 20 mg/ml and 70 °C complete aggregation of the particles in the system was observed.

It was demonstrated that the loss of the catalytic capacity of trypsin was approximately 80% after incubation of its solution at 50 °C, the immobilized enzyme, on the contrary, retained 80% or more of its activity after an hour of incubation. Practically complete inactivation of free trypsin was observed at 60 and 70 °C after an hour and 30-minute incubation, respectively. The enzyme immobilized on a matrix of medium molecular weight and high molecular weight chitosan was more stable at 60 °C and retained 39 and 62 % of the enzymatic capacity from the initial level after 60 minutes of heating. Sorbed on medium-molecular trypsin chitosan was significantly inactivated after 10 minutes of incubation at 70 °C and retained 21 % of its catalytic activity. Immobilized on high-molecular chitosan enzyme at 70 °C lost its catalytic ability even more intensively.

Keywords: trypsin, chitosan, immobilization, thermal inactivation

REFERENCES

1. Klibanov A.M., Advances in Applied Microbiology, 1983, Vol. 29, pp. 1-28.
2. Kholyavka M.G., Nakvasina M.A., Artyukhov V.G. Praktikum po biotekhnologii: immobilizovannye biologicheskie ob'ekty v sisteme laboratornykh rabot. Voronezh, Izdatel'skij dom VGU, 2017, p. 161.
3. Bazikov I.A., Gukasyan A.L., Zelenskii V.A., Medicinskij vestnik Severnogo Kavkaza, 2011, No 2, pp. 59-60.
4. Stupishina E.A., Khamidullin R.N., Vylegzhanina N.N. Fayzullin D.A., Zuev Yu.F., Biochemistry, 2006, Vol. 71, No 5, pp. 660-665.
5. Chiu K., Agoubi L.L., Lee I. et al., Biomacromolecules, 2010, Vol. 11, pp. 3688-3692.
6. Venkatesh R., Sundaram P.V., Protein Engineering. 1998. Vol. 11. № 8. pp. 691-698.
7. Villalonga R., Fernandez M., Fragoso A., Cao R., Mariniello L., Porta R., Biotechnol. Appl. Biochem., 2003, Vol. 38, pp. 53-59.
8. Xi F., Wu J., Jia Z., Lin X., Process Biochemistry, 2005, Vol. 40, pp. 2833-2840.
9. Khabibulina N.V., Vostrilkina A.V., Krasnoshtanova A.A., Catalysis in Industry, 2012, No 4, pp. 73-79.
10. Gaertner HF., Puigserver AJ., Enzyme Microb. Technol., 1992, Vol. 14, pp. 150-155.
11. Zhang, Z., He, Z., Guan, G., Biotechnol. Tech., 1999, Vol. 13, pp. 781-786.
12. Treetharnmathurot B., Ovartlarnporn C., Wungsintaweekul J. Duncan R, Wiwattanapatapee R., International Journal of Pharmaceutics, 2008, Vol. 357, pp. 252-259.
13. Lorber B., Fischer F., Bailly M., Roy H., Kern D., Biochem. Mol. Biol. Educ., 2012, Vol. 40, pp. 372-382.
14. Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Bityutskaya L.A., Grechkina M.V., Applied Biochemistry and Microbiology, 2010, Vol. 46, No 4, pp. 422-427.
15. Khitin i khitozan: Poluchenie, svoistva i primeneniye / Pod red. K.G. Skryabina, G.A. Vikhorevoi, V.P. Varlamova. Moscow, Nauka Publ., 2002, p. 368.
16. D. A. Slivkin, V. L. Lapenko, O. A. Safonova, S. N. Suslina, A. S. Belenova. Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmatsiya, 2011, No 2, pp. 214-232.
17. Loginova O.O., Kholyavka M.G., Artyukhov V.G., Journal of Biopharmaceutics, 2015, No 2, pp. 13-16.
18. Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W., Arch. Biochem. Biophys., 1961, Vol. 95, pp. 271-278.
19. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., J. Biol. Chem., 1951, Vol. 193, pp. 265-275.
20. Kharat S.J., Journal of Molecular Liquids, 2008, Vol. 140, No 1-3, pp. 10-14.