

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФИЦИНА И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЕГО ИММОБИЛИЗАЦИИ В УСЛОВИЯХ ВАРЬИРОВАНИЯ ИОННОЙ СИЛЫ БУФЕРА

В. А. Королева^{1,2}, М. Г. Холявка^{1,3}, В. Г. Артюхов¹

¹Воронежский государственный университет

²Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко

³Севастопольский государственный университет

Поступила в редакцию 1.03.2022 г.

Аннотация. Фицин (КФ 3.4.22.3) получают из высушенного латекса растений рода *Ficus*. Иммуобилизация на нерастворимом носителе позволяет повысить стабильность фермента. В ходе настоящей работы был осуществлен подбор ионной силы буферов для повышения эффективности иммуобилизации фицина и его протеолитической активности. Иммуобилизацию энзима на матрицах среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов осуществляли методом простой адсорбции белка на носителе с использованием глицинового буфера с рН 10.0 и 8.6 соответственно. Для определения количества белка в иммуобилизованном препарате использовали метод Лоури. В качестве субстрата для определения активности фицина применяли раствор азоказеина в Tris-HCl буфере с рН 7.5. Для изучения влияния ионной силы буфера на эффективность иммуобилизации и активность фицина были использованы его концентрации 0.01, 0.05, 0.1 и 0.5 М. Показано, что наибольшее содержание белка наблюдается при использовании 0.05 М концентрации глицинового буфера, в котором происходит иммуобилизация фицина. При уменьшении концентрации глицинового буфера в 5 раз (до 0.01 М) происходит снижение количества сорбированного на матрицах среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов фицина на 43 и 23 % соответственно. При увеличении концентрации глицинового буфера выявлено резкое снижение содержания фицина в гетерогенных препаратах. Установлено, что максимальная общая активность фермента, сорбированного на средне- и высокомолекулярном хитозанах, наблюдается при использовании 0.05 М концентрации глицинового буфера. Показано снижение активности фицина на 50 % и более при концентрациях глицинового буфера 0.01, 0.1 и 0.5 М.

Во втором блоке исследований определено, что оптимальной концентрацией веществ трис-HCl буфера, используемого для анализа каталитической активности сорбированного фермента, является концентрация 0.05 М. При таком соотношении компонентов буферной системы наблюдается максимальные значения общей активности иммуобилизованного энзима. При концентрации 0.5 М трис-HCl буфера происходит практически полная инактивация фицина, иммуобилизованного на среднемолекулярном и высокомолекулярном хитозанах. При уменьшении концентрации веществ трис-HCl буфера до 0.01 М или увеличении до 0.1 М происходит снижение активности фицина в 2 раза и более.

Ключевые слова: фицин, иммуобилизация, хитозан, ионная сила

Протеолитические ферменты, получаемые из растительного сырья, используются в различных сферах производства: в пищевой промышленности – для смягчения мяса и гидролиза глютеина, в пивоварении – для осветления напитков, в кожевенной индустрии – для выделки кожи. Они входят в состав различных детергентов, в медицине и ветеринарии на их основе изготавливают ранозаживляющие препараты [1-13].

Физиологическая роль цистеиновых протеаз заключается в их участии в росте растений и их развитии, а также в старении и апоптозе клеток. Тиоловые протеазы участвуют в мобилизации белков, клеточной передаче сигналов, реакции на биотические и абиотические стимулы и в качестве защитного механизма.

Фицин (КФ 3.4.22.3) получают из высушенного латекса растений рода *Ficus* [14]. Известно, что фицин встречается в природе во множественных формах, разделяемых ионообменной хромато-

графией [15, 16]. Оптимальный диапазон pH для энзима составляет от 5.0 до 8.0, а оптимальная температура – от 45 до 55 °С [17]. Фицин является перспективной биомакромолекулой в медицинском плане, т.к. проявляет антимикробную, ранозаживляющую, антиоксидантную активность [12].

Растворимые ферменты существенным образом подвергаются воздействию экстремальных факторов, приводящих к их инактивации посредством нарушения нативной конформации.

Иммобилизация на нерастворимом носителе позволяет повысить стабильность фермента: молекулы энзима закрепляются на матрице полимера, что затрудняет разворачивание его глобулы [18-20].

При подборе условий для иммобилизации фермента и повышения его протеолитической способности необходимо учитывать не только природу буфера и значение его pH, но и ионную силу раствора.

Целью настоящей работы является подбор ионной силы буферов для повышения эффективности иммобилизации фицина и его протеолитической активности.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования был выбран фицин фирмы «Sigma-Aldrich», носителями для иммобилизации – кислоторастворимые среднемолекулярный ($M_r = 200$ кДа, степень деацетилирования – 82 %) и высокомолекулярный хитозаны ($M_r = 350$ кДа, степень деацетилирования – 94.85%) фирмы ЗАО «Биопрогресс».

Иммобилизацию фицина на матрице обоих хитозанов осуществляли методом простой адсорбции белка на носителе. Глицинового буфера с pH 10.0 и 8.6 использовали для сорбции на среднемолекулярном и высокомолекулярном хитозанах соответственно. К 1 г хитозана добавляли 20 мл раствора белка (концентрация 1 мг/мл) в 0.01, 0.05, 0.1 или 0.5 М глицинового буфера, инкубировали в течение 4 часов (среднемолекулярный хитозан) и 5 часов (высокомолекулярный хитозан) с периодическим перемешиванием [21]. Для определения количества белка в иммобилизованном препарате использовали метод Лоури [22].

В качестве субстрата для определения активности фермента применяли азоказеин. К суспензии 50 мг иммобилизованного образца в 200 мкл 0.01, 0.05, 0.1 или 0.5 М трис-HCl буфера с pH 7.5, содержащей 1 мМ раствор L-цистеина, добавля-

ли 400 мкл 1 % раствора азоказеина в 0.01, 0.05, 0.1 или 0.5 М трис-HCl буфере (pH 7.5) и инкубировали 30 минут при температуре 37 °С. После инкубации добавляли 800 мкл 5 % раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), инкубировали 5 минут при -4 °С, а затем центрифугировали в течение 3 минут при 11700 g для удаления негидролизованного азоказеина. К 1200 мкл супернатанта добавляли 240 мкл 3 % раствора NaOH для нейтрализации кислоты, после чего измеряли оптическую плотность опытной пробы при 410 нм в 1 см кювете. Контрольная проба содержала 400 мкл азоказеина, 800 мкл ТХУ; 50 мг образца и 200 мкл буфера вносили после инкубации в течение 30 минут при температуре 37 °С [23].

Все экспериментальные исследования осуществляли минимум в 8-кратной повторности. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ «Stadia 8.0 (Professional)». Статистическую значимость различий величин контрольных и опытных показателей определяли по t-критерию Стьюдента (при $p < 0.05$), поскольку все показатели характеризовались нормальным распределением.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе нами было изучено влияние ионной силы буферных растворов на эффективность иммобилизации и протеолитическую активность фицина, сорбированного на матрице хитозана.

Глицинового буфера со значениями pH 10.0 и 8.6 был использован для простой адсорбции фермента на среднемолекулярном и высокомолекулярном хитозанах соответственно. Трис-HCl (pH 7.5) буфер выполнял роль рабочего буфера для проведения исследования по определению активности фицина.

Для изучения влияния ионной силы буферов на эффективность иммобилизации и скорость гидролиза азоказеина были использованы следующие их концентрации: 0.01, 0.05, 0.1 и 0.5 М.

В первой серии экспериментов происходил подбор оптимальной ионной силы глицинового буфера для иммобилизации фицина. Второй блок исследований был посвящен изучению влияния концентрации веществ трис-HCl буфера на каталитическую активность сорбированного фермента.

На рис. 1 представлена зависимость содержания белка в гетерогенных препаратах фицина, иммобилизованного на матрице хитозана, от концентрации глицинового буфера. Наибольшее

содержание белка наблюдается при использовании 0.05 М концентрации глицинового буфера, в котором происходит иммобилизация фермента. При уменьшении концентрации глицинового буфера в 5 раз (до 0.01 М) регистрируется снижение количества сорбированного на матрицах среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов фицина на 43 и 23 % соответственно. При увеличении концентрации глицинового буфера выявлено резкое снижение содержания фицина в гетерогенных препаратах.

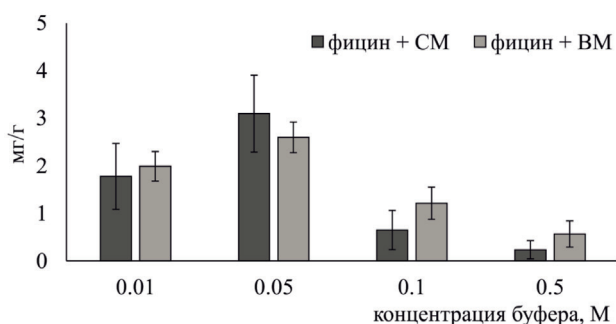


Рис. 1. Зависимость содержания белка (мг на 1 г носителя) в препарате иммобилизованного на хитозане фицина от концентрации глицинового буфера, где СМ – среднемолекулярный хитозан, ВМ – высокомолекулярный хитозан

Максимальная общая активность фицина, сорбированного на средне- и высокомолекулярном хитозанах, наблюдается при использовании 0.05 М концентрации глицинового буфера. Показано снижение активности фицина на 50 % и более при концентрациях глицинового буфера 0.01, 0.1 и 0.5 М (рис. 2).

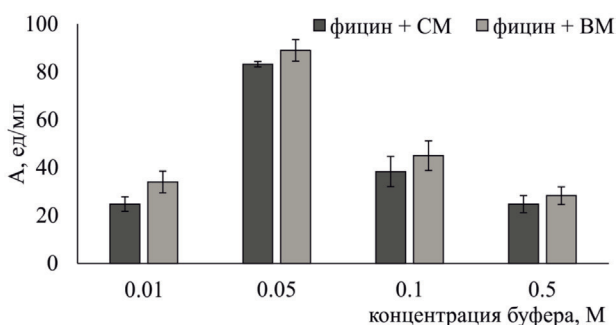


Рис. 2. Зависимость общей активности (ед/мл) иммобилизованного на хитозане фицина от концентрации глицинового буфера, где СМ – среднемолекулярный хитозан, ВМ – высокомолекулярный хитозан

Во втором блоке исследований мы подбирали оптимальную концентрацию трис-НСl буфера, используемого для анализа каталитической актив-

ности сорбированного фицина. Установлено, что при концентрации 0.5 М трис-НСl буфера происходит практически полная инактивация фицина, иммобилизованного на среднемолекулярном и высокомолекулярном хитозанах. Оптимальной концентрацией веществ в рабочем буфере для проявления фицином протеолитической активности является концентрация 0.05 М, при таком соотношении компонентов буферной системы наблюдаются максимальные значения общей активности иммобилизованного энзима. При уменьшении концентрации веществ трис-НСl буфера до 0.01 М или увеличении до 0.1 М происходит снижение активности фицина в 2 раза и более (рис. 3).

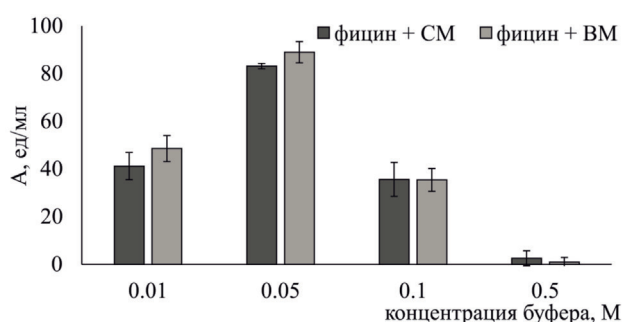


Рис. 3. Зависимость общей активности (ед/мл) иммобилизованного на хитозане фицина от концентрации трис-НСl буфера, где СМ – среднемолекулярный хитозан, ВМ – высокомолекулярный хитозан

Полученные данные свидетельствует о существенном влиянии концентрации веществ, входящих в состав буфера, на эффективность сорбции и протеолитическую активность фицина.

ВЫВОДЫ

В ходе исследования была определена оптимальная концентрация веществ глицинового буфера, которая равняется 0.05 М, для иммобилизации фицина на матрице хитозана. Наиболее высокие значения активности гетерогенного препарата получены при использовании трис-НСl буфера с ионной силой 0.05 М. Для применения энзимов в промышленности или медицине необходимо проводить исследования по подбору оптимального буфера и его ионной силы для иммобилизации и непосредственно катализа. Правильно подобранная буферная система обеспечивает конформацию фермента, близкую к нативному энзиму.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №21-74-20053)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Esmacilpour M., Ehsani M.R., Aminlari M., Shekarforoush S., Hoseini E. // *Comp Clin Pathol*. 2016. Vol. 25. No 3, pp. 599-605.
2. Shah M.A., Mir S. A., Paray M.A. // *Dairy Sci. & Technol*. 2014. Vol. 94, pp. 5-16.
3. Arshad Z.I.M., Amid A., Yusof F., Jaswir I., Ahmad K., Loke S.P. // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014. Vol. 98, pp. 7283-7297.
4. Faccia M., Picariello G., Trani A., Loizzo P., Gambacorta G., Lamacchia C., Di Luccia A. // *Eur Food Res Technol*. 2012. Vol. 234, pp. 527-533.
5. Pietrasik Z., Aalhus J.L., Gibson L.L., Shand P.J. // *Meat Science*. 2010. Vol. 84, pp. 512-517.
6. Gerelt B., Ikeuchi Y., Suzuki A. // *Meat Science*. 2000. Vol. 56, pp. 311-318.
7. Ketnawa S., Rawdkuen S. // *Food and Nutrition Sciences*. 2011. Vol. 2, pp. 393-401.
8. Benucci I., Liburdi K., Garzillo A.M.V., Esti M. // *Food Chemistry*. 2011. Vol. 124, pp.1349-1353.
9. Hale L.P., Greer P.K., Trinh C.T., James C.L. // *International Immunopharmacology*. 2005. Vol. 5, pp. 783-793.
10. Sullivan G.A., Calkins C.R. // *Meat Science*. 2010. Vol. 85, pp. 730-734.
11. Diaz O., Fernandez M., Garcia de Fernando G.D., de la Hoz L., Ordenez J.A. // *Sci Food Agric*. 1996. Vol. 71, pp. 13-21.
12. Feijoo-Siota L., Villa T.G. // *Food Bioprocess Technol*. 2011. Vol. 4, pp. 1066-1088.
13. Baidamshina D.R., Trizna E.Y., Akhatova F.S., Rozhina E.V., Fakhrullin R.F., Kayumov A.R., Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Bogachev M.I. // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7, P. 46068.
14. Sgarbieri V.C., Gupte S.M., Kramer D.E., Whitaker J.R. // *The Journal of Biological Chemistry*. 1964. Vol. 239, pp. 2170-2177.
15. Jones I.K., Glazer A.N. // *The Journal of Biological Chemistry*. 1970. Vol. 245, P. 2765.
16. Williams D.C., Whitaker J.R. // *Plant Physiology*. 1969. Vol. 44, pp.1574-1583.
17. Polaina J., MacCabe A.P. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*, New York, Springer, 2007, 641 p.
18. Холявка М.Г., Артюхов В.Г. Иммуобилизованные биологические системы: биофизические аспекты и практическое применение. Воронеж, 2017, 261 с.
19. Holyavka M., Pankova S., Koroleva V., Vyshkvorkina Yu., Lukin A., Kondratyev M., Artyukhov V. // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2019. Vol. 201, P. 111681.
20. Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Сазыкина С.М., Наквасина М.А. // *Химико-фармацевтический журнал*. 2017. Т. 51. № 8. С. 39-43.
21. Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Королева В.А. Патент РФ, RU 2677232 C2, 2019.
22. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem*. 1951. Vol. 193, pp. 265-275.
23. Sabirova A.R., Rudakova N.L., Balaban N.P., Ilyinskaya O.N., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Rudenskaya G.N., Sharipova M.R. // *FEBS Lett*. 2010. Vol. 584, No 21, pp.4419-4425.

Воронежский государственный университет

**Королева В. А., младший научный сотрудник кафедры биофизики и биотехнологии, ассистент кафедры биологии, Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко*

E-mail: koroleva_victoria@bk.ru

Холявка М. Г., д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии, профессор кафедры «Физика», Севастопольского государственного университета

E-mail: holyavka@rambler.ru

Артюхов В. Г., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Voronezh State University

**Koroleva V. A., junior researcher, Biophysics and Biotechnology Department, Assistant Professor of Department of Biology, Voronezh State Medical University N.N. Burdenko*

E-mail: koroleva_victoria@bk.ru

Holyavka M. G., PhD., DSci., Full Professor, Biophysics and Biotechnology Department, Full Professor of Physics Department, Sevastopol State University

E-mail: holyavka@rambler.ru

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

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

PROTEOLITIC ACTIVITY OF FICIN AND THE EFFICIENCY OF ITS IMMOBILIZATION UNDER CONDITIONS OF VARYING THE IONIC STRENGTH OF THE BUFFER

V. A. Koroleva^{1,2}, M. G. Holyavka^{1,3}, V. G. Artyukhov¹

¹Voronezh State University

²Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko

³Sevastopol State University

Abstract. Ficin (EC 3.4.22.3) is obtained from the dried latex of plants of the genus *Ficus*. Immobilization on an insoluble carrier improves the stability of the enzyme. In the course of this work, we selected the ionic strength of buffers to increase the efficiency of ficin immobilization and its proteolytic activity. The immobilization of the enzyme on matrices of medium and high molecular weight chitosans was carried out by simple protein adsorption on a carrier using a glycine buffer with pH 10.0 and 8.6, respectively. The Lowry method was used to determine the amount of protein in the immobilized samples. A solution of azocasein in Tris-HCl buffer with pH 7.5 was used as a substrate for determining of ficin activity. To study the effect of the ionic strength of the buffer on the immobilization efficiency and activity of ficin, its concentrations of 0.01, 0.05, 0.1, and 0.5 M were used. It was shown that the highest protein content is observed when using a 0.05 M concentration of glycine buffer, in which ficin is immobilized. With a decrease in the concentration of glycine buffer in 5 times (to 0.01 M), the amount of ficin sorbed on the matrices of medium and high molecular weight chitosans decreases by 43 and 23%, respectively. With an increase in the concentration of glycine buffer, a sharp decrease in the content of ficin in heterogeneous samples was revealed. It has been established that the maximum total activity of the enzyme adsorbed on medium and high molecular weight chitosans is observed when using a 0.05 M concentration of glycine buffer. A decrease in ficin activity by 50% or more was shown at glycine buffer concentrations of 0.01, 0.1, and 0.5 M.

In the second block of studies, it was determined that the optimal concentration of Tris-HCl buffer substances used to analyze the catalytic activity of the sorbed enzyme is 0.05 M. At this ratio of buffer system components, the maximum values of the total activity of the immobilized enzyme are observed. At a concentration of 0.5 M Tris-HCl buffer, almost complete inactivation of ficin immobilized on medium and high molecular weight chitosans occurs. With a decrease in the concentration of Tris-HCl buffer substances to 0.01 M or an increase to 0.1 M, the ficin activity decreases in 2 times or more.

Keywords: ficin, immobilization, chitosan, ionic strength

REFERENCES

1. Esmailpour M., Ehsani M.R., Aminlari M., Shekarforoush S., Hoseini E., *Comp Clin Pathol*, 2016, Vol. 25, No 3, pp. 599-605.
2. Shah M.A., Mir S. A., Paray M.A., *Dairy Sci. & Technol.*, 2014, Vol. 94, pp. 5-16.
3. Arshad Z.I.M., Amid A., Yusof F., Jaswir I., Ahmad K., Loke S.P., *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, Vol. 98, pp. 7283-7297.
4. Faccia M., Picariello G., Trani A., Loizzo P., Gambacorta G., Lamacchia C., Di Luccia A., *Eur Food Res Technol*, 2012, Vol. 234, pp. 527-533.
5. Pietrasik Z., Aalhus J.L., Gibson L.L., Shand P.J., *Meat Science*, 2010, Vol. 84, pp. 512-517.
6. Gerelt B., Ikeuchi Y., Suzuki A., *Meat Science*, 2000, Vol. 56, pp. 311-318.
7. Ketnawa S., Rawdkuen S., *Food and Nutrition Sciences*, 2011, Vol. 2, pp. 393-401.
8. Benucci I., Liburdi K., Garzillo A.M.V., Esti M., *Food Chemistry*, 2011, Vol. 124, pp.1349-1353.
9. Hale L.P., Greer P.K., Trinh C.T., James C.L., *International Immunopharmacology*, 2005. Vol. 5, pp. 783-793.
10. Sullivan G.A., Calkins C.R., *Meat Science*, 2010, Vol. 85, pp. 730-734.
11. Diaz O., Fernandez M., Garcia de Fernando G.D., de la Hoz L., Ordonez J.A., *Sci Food Agric*, 1996, Vol. 71, pp. 13-21.
12. Feijoo-Siota L., Villa T.G., *Food Bioprocess Technol*, 2011, Vol. 4, pp. 1066-1088.
13. Baidamshina D.R., Trizna E.Y., Akhatova F.S., Rozhina E.V., Fakhullin R.F., Kayumov A.R.,

Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Bogachev M.I., Scientific Reports, 2017, Vol. 7, P. 46068.

14. Sgarbieri V.C., Gupte S.M., Kramer D.E., Whitaker J.R., The Journal of Biological Chemistry, 1964, Vol. 239, pp. 2170-2177.

15. Jones I.K., Glazer A.N., The Journal of Biological Chemistry, 1970, Vol. 245, P. 2765.

16. Williams D.C., Whitaker J.R., Plant Physiology, 1969, Vol. 44, pp.1574-1583.

17. Polaina J., MacCabe A.P. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications, New York, Springer, 2007, 641 p.

18. Holyavka M.G., Artyuhov V.G. Immobilizovannye biologicheskie sistemy: biofizicheskie aspekty i prakticheskoe primeneniye. Voronezh, 2017, 261 p.

19. Holyavka M., Pankova S., Koroleva V., Vyshkvorkina Yu., Lukin A., Kondratyev M., Artyukhov V., Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2019, Vol. 201, P. 111681.

20. Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Sazykina S.M., Nakvasina M.A., Pharmaceutical Chemistry Journal, 2017, Vol. 51, No 8, pp. 702-706.

21. Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Koroleva V.A. Patent RF, RU 2677232 C2, 2019.

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

23. Sabirova A.R., Rudakova N.L., Balaban N.P., Ilyinskaya O.N., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Rudenskaya G.N., Sharipova M.R., FEBS Lett, 2010, Vol. 584, No 21, pp.4419-4425.