

РАЗРАБОТКА БИОКАТАЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ ФИЦИНА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА N-СУКЦИНОИЛХИТОЗАНЕ

С. С. Ольшанникова¹, Ю. А. Редько¹, М. С. Лавлинская^{1,2,3},
А. В. Сорокин^{1,2,3}, М. Г. Холявка^{1,2*}, В. Г. Артюхов¹

¹ ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

² ФГАОУ ВО Севастопольский государственный университет

³ ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет инженерных технологий

Поступила в редакцию 01.03.2022 г.

Аннотация. Разработки в области создания высокостабильных гетерогенных катализаторов, которые базируются на иммобилизованных ферментах, приобретают все большую актуальность. Ферментные препараты используются во многих областях жизни людей: сельское хозяйство, медицина, парфюмерия, пищевая промышленность, ветеринария.

Протеолитические ферменты считаются перспективными средствами биологической антисептики, так как они одновременно обладают важными антитоксическими, противовоспалительными и антинекротическими свойствами. Популярным среди ферментов фармацевтического назначения является фицин (КФ 3.4.22.3).

Однако выделяют несколько причин, препятствующих масштабному применению ферментов: неустойчивость препаратов при различных воздействиях, что приводит к их ослабленному действию, высокая себестоимость, невозможность их многократного использования. Проблемы можно решить, если применять иммобилизованные ферменты. Они более стабильны и обладают пролонгированным действием.

Преодоление многих трудностей, связанных с методами иммобилизации, выбором носителей, определением кинетико-термодинамических параметров катализа, позволит создавать новые технологические разработки, конструировать более эффективные гетерогенные биокатализаторы для промышленности, аналитических целей и медицины.

Кислотным гидролизом в 0.1 М водном растворе соляной кислоты получены образцы хитозана с различными величинами молекулярных масс, определенными вискозиметрическим методом и равными 350 и 200 кДа. Из полученных образцов синтезированы целевые производные N-сукциноилхитозана, структура которых подтверждена методом ИК-спектроскопии, а степени замещения рассчитаны на основе титриметрических данных. Проведена иммобилизация фицина на данных носителях. Определены содержание белка и каталитическая активность препаратов. Оптимальное соотношение содержания белка (мг на г носителя), общей активности (в ед на мл раствора) и удельной активности (в ед на мг белка) выявлено при иммобилизации фицина на матрице N-сукциноилхитозана с молекулярной массой 350 кДа.

Благодаря сочетанию относительно недорогих компонентов предлагаемый нами технологичный метод доступен для отечественных лабораторий и дает перспективы дальнейшего использования иммобилизованного ферментного препарата в медицине и фармацевтической промышленности.

Ключевые слова: фицин, N-сукциноилхитозан, иммобилизация.

Цистеиновые протеазы – семейство гидролитических ферментов, объединенных присутствием в активном центре остатка аминокислоты цистеина и катализирующих реакции расщепления белков и пептидов. Имеют широкое распространение в природе, встречаются как в растительных, так и в животных организмах [1]. Кроме того, цистеиновые протеазы играют значительную роль

в биосинтезе белков коронавируса SARS-CoV-2, вызывающего заболевание COVID-19 [2].

Благодаря своей распространенности и доступности цистеиновые протеазы нашли широкое применение в различных областях деятельности человека, таких как биотехнология [3,4], косметология [5], фармацевтика [6,7], медицина [8,9], пищевая промышленность [10] и др.

Каталитическая активность цистеиновых протеаз обусловлена наличием каталитической

© Ольшанникова С. С., Редько Ю. А., Лавлинская М. С., Сорокин А. В., Холявка М. Г., Артюхов В. Г., 2022

диады, по некоторым источникам – триады, в состав которой входят основание имидазол – остаток гистидина, активирующий нуклеофильный центр – тиольную группу цистеина [11]. Если же рассматривать активный центр названных ферментов как триаду, он также включает карбоксильную группу аспарагиновой кислоты, смещающую электронную плотность в азольном цикле. Тиольная группа – сильный восстановитель, легко окисляющийся в достаточно мягких условиях. Поэтому для промышленного использования цистеиновых протеаз целесообразно выбирать их иммобилизованные формы, у которых активный центр защищен от негативного воздействия окружающей среды и, таким образом, каталитическая активность фермента сохраняется в течение более длительного времени [12].

Одной из перспективных для фармации цистеиновых протеаз является фицин. Его получают из латекса инжира *Ficus carica*. Активность энзима может уменьшиться при действии на него таких денатурирующих агентов, как окислители и вещества, способные блокировать сульфгидрильные группы, – хлор- и йодацетамиды, ртутные соединения [13,14]. Фицин имеет широкий диапазон значений pH для оптимальной работы (6.5-9.5). Изoeлектрическая точка равна 9.0. Фермент необратимо инактивируется в слабокислой среде, но устойчив к денатурирующему влиянию мочевины. Инактивация фицина происходит при температуре 80 °C, а наибольшая активность наблюдается при 60-65 °C [15,16].

Учитывая обозначенные выше области применения цистеиновых протеаз, целесообразно предложить в качестве матриц для их иммобилизации низкотоксичные и биосовместимые полимеры. Не стоит также забывать о доступности высокомолекулярных носителей: использование редких материалов может негативно сказаться на стоимости конечного биокатализатора. Наиболее полно предъявляемым требованиям отвечает хитозан – природный поли-β-аминогликозид, характеризующийся широким распространением в природе [17]. Отдельно стоит отметить простоту химических модификаций этого природного полимера и доступность реактивов для получения его, например, ацильных производных.

Таким образом, цель настоящего исследования – иммобилизация фицина на водорастворимом производном хитозана – *N*-сукциноилхитозане с различными молекулярными массами.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объектов исследования был выбран фицин из *Ficus carica* (Sigma, США), субстратом для гидролиза служил азоказеин (Sigma, США), для синтеза *N*-сукциноилхитозана был использован хитозан со средней молекулярной массой 600 кДа и степенью деацетилирования 0.85 (Биопрогресс, Россия).

Синтез *N*-сукциноилхитозана осуществляли по следующей методике: для получения хитозана с различными молекулярными массами использовали кислотный гидролиз исходного полисахарида. Навеску хитозана массой 1 г растворяли в 100 мл 2%-ного водного раствора уксусной кислоты, после чего переносили раствор в круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, добавляли 50 мл 0.1 М водного раствора HCl и кипятили в течение 10 или 20 минут. После смесь охлаждали до комнатной температуры, раствор нейтрализовали водным раствором аммиака до слабощелочного значения pH. Полимер из реакционной массы выделяли осаждением в изопропиловый спирт, после чего промывали дистиллированной водой и этиловым спиртом и сушили в вакуумном сушильном шкафу до постоянной массы.

Молекулярные массы деструктированного хитозана определяли общепринятым вискозиметрическим методом с помощью вискозиметра Уббелюде в смеси водных растворов 0.3 М уксусной кислоты и 0.2 М ацетата натрия при 25 °C. Из данных вискозиметрии с помощью уравнения Марка-Куна-Хаувинка-Сакурады вычисляли значения молекулярных масс:

$$[\eta] = K \times M^{\alpha},$$

где $[\eta]$ – характеристическая вязкость, дл/г, рассчитанная из данных вискозиметрии, M – средневязкостная молекулярная масса полимера, K и α – константы, равные 82×10^{-5} дл/г и 0.76 соответственно [17].

N-сукциноилхитозан получали по следующей методике. Навеску хитозана массой 2 г растворяли в 200 мл 2 %-ного водного раствора уксусной кислоты. Затем растворяли 0.4 г янтарного ангидрида в 25 мл ацетона и вносили по каплям в течение 30 минут в раствор хитозана. Выдерживали полученную смесь 2 часа на водяной бане при 50 °C. После смесь охлаждали до комнатной температуры. Полимер из реакционной массы выделяли осаждением в 4-метил-2-пентанон, после чего промывали этиловым спиртом, отфильтровывали и сушили в вакуумном сушильном шкафу до постоянной массы.

Модификацию хитозана подтверждали с помощью метода ИК-спектроскопии. ИК-спектры регистрировали в диапазоне частот 4000-400 см⁻¹ на спектрометре *Bruker Vertex 70* с Фурье-преобразователем (*Bruker Optics*, Германия) методом нарушенного полного внутреннего отражения.

Степень замещения полученного полимера определяли титриметрически, согласно методике, представленной в работе [18].

Иммобилизацию фицина на матрице хитозана и его производных осуществляли адсорбционным методом. К 1 г *N*-сукциноилхитозана добавляли 20 мл раствора фермента (в концентрации 1 мг/мл глицинового буфера рН 10.0), инкубировали в течение 2 часов. После окончания инкубации образовавшийся осадок (в виде геля) промывали с помощью диализа против 50 мМ трис-НСl буфера (рН 7.5) через целлофановую мембрану с размером пор 25 кДа до отсутствия в промывных водах белка (контроль осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 при $\lambda = 280$ нм).

Содержание белка в иммобилизованных препаратах фицина определяли методом Лоури [19].

Метод определения протеолитической активности фицина. Измерение протеолитической активности фицина проводили по отношению к субстрату азоказеину (*Sigma*, США) [20]. К 50 мг образца добавляли 200 мкл трис-НСl буфера, рН 7.5, 800 мкл азоказеина (0.5 % в 50 мМ трис-НСl буфере, рН 7.5) и инкубировали 2 часа при 37 °С. Далее добавляли 800 мкл ТХУ (5 %), инкубировали 10 минут при 4 °С, затем центрифугировали в течение 3 мин при 11 700 g для удаления негидролизованного азоказеина. К 1200 мкл супернатанта добавляли 240 мкл 3 % NaOH для нейтрализации кислоты, после чего измеряли оптическую плотность опытной пробы при 410 нм в 1 см кювете. Контрольная проба содержала 800 мкл азоказеина, 800 мкл ТХУ, 50 мг образца и 200 мкл трис-НСl буфера. За единицу каталитической активности принимали количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкМ субстрата за 1 мин. Удельную протеолитическую активность папаина рассчитывали по формуле:

$$A = D \cdot 1000 / 120 / 200 / C,$$

где *A* – протеолитическая активность, мкМ/мин на 1 мг белка, *D* – оптическая плотность при 410 нм, *C* – концентрация белка в пробе, мг/мл, измеренная по методу Лоури, 120 – время инкубации в минутах, 200 – объем пробы, мкл, 1000 – коэффициент для пересчета в мкМ.

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

Анализ содержания белка в препаратах показал, что наибольшее количество фицина (в мг на г носителя) сорбируется на *N*-сукциноилхитозане с молекулярными массами 350 и 600 кДа (рис. 1).

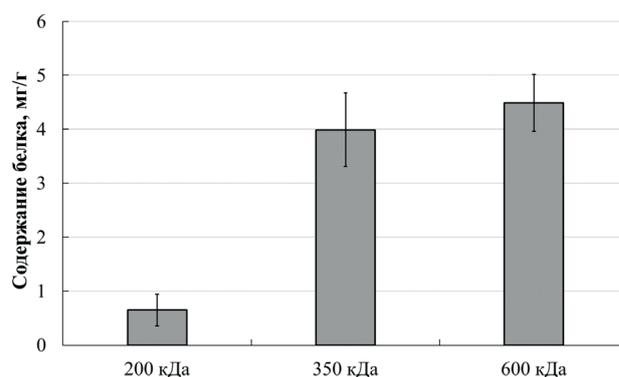


Рис. 1. Содержание белка (мг/г носителя) в препаратах фицина, иммобилизованного адсорбционным методом на матрице *N*-сукциноилхитозана

Общая активность фицина (в ед на мл раствора) оказалась выше при его иммобилизации на *N*-сукциноилхитозане с молекулярной массой 350 кДа (рис. 2). Наибольшую удельную активность показали образцы, адсорбированные на матрице *N*-сукциноилхитозана с молекулярной массой 200 кДа (рис. 3).

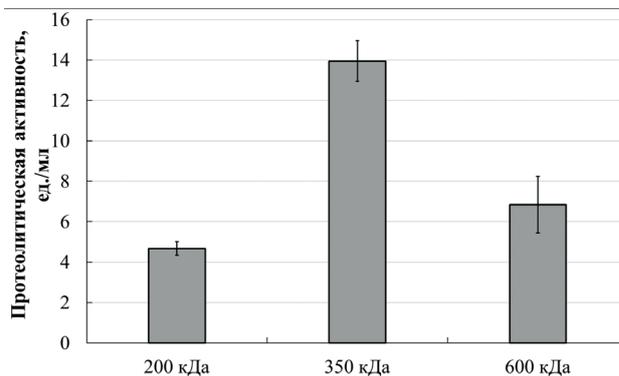


Рис. 2. Общая каталитическая активность (ед/мл раствора) в препаратах фицина, иммобилизованного адсорбционным методом на матрице *N*-сукциноилхитозана

Таким образом, оптимальное соотношение содержания белка (мг на г носителя), общей активности (в ед на мл раствора) и удельной актив-

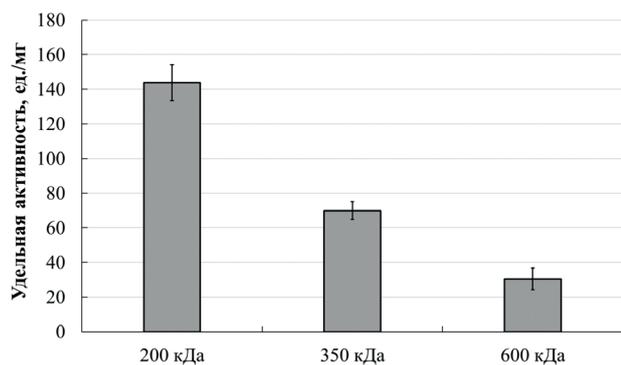


Рис. 3. Удельная каталитическая активность (ед/мг белка) в препаратах фицина, иммобилизованного адсорбционным методом на матрице *N*-сукциноилхитозана

ности (в ед на мг белка) выявлено при иммобилизации фицина на матрице *N*-сукциноилхитозана с молекулярной массой 350 кДа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проделанной работы нам удалось синтезировать производные хитозана, а именно *N*-сукциноилхитозан с молекулярными массами 200, 350 и 600 кДа. Была проведена иммобилизация фицина на данных носителях. Определены содержание белка и каталитическая активность препаратов. Оптимальное соотношение содержания белка (мг на г носителя), общей активности (в ед на мл раствора) и удельной активности (в ед на мг белка) выявлено при иммобилизации фицина на матрице *N*-сукциноилхитозана с молекулярной массой 350 кДа.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук, номер гранта МК-2517.2022.1.3

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES

1. Salvesen G.S., Hempel A., Coll N.S. // *The FEBS Journal*. 2015. Vol. 283(14), pp. 2577-2598. DOI: 10.1111/febs.13616.
2. Ullrich S., Nitsche Ch. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2020. Vol. 30(17), p. 127377. DOI: 10.1016/j.bmcl.2020.127377.
3. Silva M.Z.R., Oliveira J.P.B., Ramos M.V., Farias D.F., de Sá Ch. A., Ribeiro J.A.C., Silva A.F.B., Sousa J.S., Zambelli R.A., Silva A.C., Furtado G.P., Grangeiro Th.B., Vasconcelos M.S., Silveira S.R., Freitas C.D.T. // *Food Chemistry*. 2020. Vol. 307, p.

125574. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125574.

4. Holyavka M., Faizullin Dzh., Koroleva V., Olshannikova S., Zakhartchenko N., Zuev Yu., Kondratyev M., Zakharova E., Artyukhov V. // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021. Vol. 180, pp. 161-176. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.016.

5. Secchi G. // *Clinics in Dermatology*. 2008. Vol. 26(4), pp. 321-325. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2008.04.004.

6. Baidamshina D.R., Koroleva V.A., Trizna E.Yu., Pankova S.M., Agafonova M.N., Chirkova M.N., Vasileva O.S., Akhmetov N., Shubina V.V., Porfiruyev A.G., Semenova E.V., Sachenkov O.A., Bogachev M.I., Artyukhov V.G., Baltina T.V., Holyavka M.G., Kayumova A.R. // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. Vol. 164, pp. 4205-4217. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.030.

7. McKerrow J.H. // *PLoS Negl Trop Dis*. 2018. Vol. 12(8). DOI: 10.1371/journal.pntd.0005639.

8. Ariizumi T., Murata Sh., Fujisawa S., Isezaki M., Sato T., Oishi E., Taneno A., Ichii O., Maekawa N., Okagawa T., Konnai S., Ohashi K. // *Poultry Science*. 2022. Vol. 101(3), p. 101638. DOI: 10.1016/j.psj.2021.101638.

9. Baidamshina D.R., Koroleva V.A., Olshannikova S.S., Trizna E.Yu., Bogachev M.I., Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Kayumov A.R. // *Marine Drugs*. 2021. Vol. 19(4). DOI: 10.3390/md19040197.

10. Gagaoua M., Dib A.L., Lakhdara N., Lamri M., Botineştean Ch., Lorenzo J.M. // *Current Opinion in Food Science*. 2021. Vol. 38, pp. 177-188. DOI: 10.1016/j.cofs.2020.12.002.

11. Buller A.R., Townsend C.A. // *PNAS*. 2013. Vol. 110(8), pp. 653-661. DOI: 10.1073/pnas.1221050110.

12. Ol'shannikova S. S., Red'ko Yu. A., Lavlinskaya M. S., Sorokin A.V., Holyavka M.G., Artyukhov V.G. // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022. Vol. 55, pp. 1240-1244. DOI: 10.1007/s11094-022-02564-8.

13. Morellon-Sterling R., El-Siar H., Tavano O.L., Berenguer-Murcia A., Fernández-Lafuente R. // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. Vol. 162, pp. 394-404. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.144.

14. 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. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2019.111681.

15. Holyavka M.G., Kondratyev M.S., Lukin A.N., Agapov B.L., Artyukhov V.G. // International Journal of Biological Macromolecules. 2019. V. 138. p. 681-692. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.07.132.

16. Rizwan M., Gilani S.R., Durani A.I., Naseem S. // Journal of Advanced Research. 2021. V.33. P. 15-40. DOI:10.1016/j.jare.2021.03.007.

17. Sorokin A., Lavlinskaya M. // Polymer Bulletin. 2022. Vol. 79, pp. 407-427. DOI: 10.1007/s00289-020-03521-9.

18. Kasai M. R. // Carbohydrate Polymers.

2007. Vol. 68. pp. 477-488. doi:10.1016/j.carbpol.2006.11.006.

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

20. 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(21). pp. 4419-4425. DOI:10.1016/j.febslet.2010.09.049.

*Воронежский государственный университет
Ольшанникова С. С., аспирант кафедры биофизики и биотехнологии
E-mail: Olshannikovas@gmail.com*

*Voronezh State University
Olshannikova S. S., postgraduate student,
department of biophysics and biotechnology
E-mail: Olshannikovas@gmail.com*

Редько Ю. А., студент кафедры биофизики и биотехнологии

Redko Y. A., student, department of biophysics and biotechnology

Лавлинская М. С., к.х.н., старший научный сотрудник кафедры биофизики и биотехнологии, старший научный сотрудник НИЛ «Биоресурсный потенциал приморской территории», Севастопольский государственный университет; старший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, Воронежский государственный университет инженерных технологий

Lavlinskaya M. S., PhD, Senior Researcher, Department of Biophysics and Biotechnology; Senior Researcher of Bioresource Potential of Seaside territory Laboratory, Sevastopol State University; Senior Researcher of Metagenomics and Food Biotechnologies Laboratory, Voronezh State University of Engineering Technologies

E-mail: maria.lavlinskaya@gmail.com

E-mail: maria.lavlinskaya@gmail.com

Сорокин А. В., аспирант кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии; младший научный сотрудник кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет; младший научный сотрудник НИЛ «Биоресурсный потенциал приморской территории», Севастопольский государственный университет; младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, Воронежский государственный университет инженерных технологий

Sorokin A. V., postgraduate student, department of department of Macromolecular Compounds and Colloidal Chemistry; Researcher, Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh; Junior Researcher of Bioresource Potential of Seaside territory Laboratory, Sevastopol State University; Junior Researcher of Metagenomics and Food Biotechnologies Laboratory, Voronezh State University of Engineering Technologies

E-mail: andrew.v.sorokin@gmail.com

E-mail: andrew.v.sorokin@gmail.com

Холявка Марина Геннадьевна – д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии; профессор кафедры «Физика» Севастопольского государственного университета

Holyavka M. G., PhD., DSci., Full Professor, department of biophysics and biotechnology, Professor of Physics Department, Sevastopol State University

E-mail: holyavka@rambler.ru

E-mail: holyavka@rambler.ru

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

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

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

DEVELOPMENT OF A BIOCATALYST BASED ON FICIN IMMOBILIZED ON *N*-SUCCINYLCITOSAN

S. S. Olshannikova¹, Yu. A. Redko¹, M. S. Lavlinskaya^{1,2,3}, A. V. Sorokin^{1,2,3},
M. G. Holyavka^{1,2*}, V. G. Artyukhov¹

¹Voronezh State University

²Sevastopol State University, Sevastopol

³Voronezh State University of Engineering Technologies

Abstract. Developments in the field of creating highly stable heterogeneous catalysts based on immobilized enzymes are becoming increasingly important. Enzyme preparations are used in many areas of human life: agriculture, medicine, perfumery, food industry, veterinary medicine.

Proteolytic enzymes are considered promising means of biological antiseptics, since they simultaneously possess important antitoxic, anti-inflammatory, and antinecrotic properties. Ficin (EC 3.4.22.3) is popular among pharmaceutical enzymes.

However, there are several reasons that prevent the large-scale use of enzymes: the instability of preparations under various influences, which leads to their weakened effect, high cost, and the impossibility of their repeated use. Problems can be solved if immobilized enzymes are used. They are more stable and have a prolonged action.

Overcoming many difficulties associated with immobilization methods, the choice of supports, and the determination of the kinetic and thermodynamic parameters of catalysis will make it possible to create new technological developments and design more efficient heterogeneous biocatalysts for industry, analytical purposes, and medicine.

Acid hydrolysis in 0.1 M aqueous hydrochloric acid solution yielded chitosan samples with different molecular weights determined by the viscometric method and equal to 350 and 200 kDa. Target derivatives of *N*-succinylchitosan were synthesized from the obtained samples, the structure of which was confirmed by IR spectroscopy, and the degrees of substitution were calculated on the basis of titrimetric data. Ficin was immobilized on these carriers. The protein content and catalytic activity of the preparations were measured. The optimal ratio of protein content (mg per g of carrier), total activity (in units per ml of solution), and specific activity (in units per mg of protein) was found when ficin was immobilized on an *N*-succinylchitosan matrix with a molecular weight of 350 kDa.

Due to the combination of relatively inexpensive components, the technological method proposed by us is accessible to domestic laboratories and gives prospects for further use of the immobilized enzyme preparation in medicine and the pharmaceutical industry.

Keywords: ficin, *N*-succinylchitosan, immobilization.