

РАЗРАБОТКА БИОКАТАЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ ПАПАИНА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА АЦЕТАТЕ ХИТОЗАНА

С. С. Гончарова¹, Ю. А. Редько¹, М. С. Лавлинская^{1,2,3}, А. В. Сорокин^{1,2,3}, М. С. Кондратьев^{1,4},
Н. Е. Юдин¹, О. В. Путинцева¹, М. А. Наквасина¹, М. Г. Холявка^{1,2*}, В. Г. Артюхов¹

¹ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет

²ФГАОУ ВО Севастопольский государственный университет

³ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет инженерных технологий

⁴Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пуцинский научный центр
биологических исследований РАН»

Поступила в редакцию 28.12.2022 г.

Аннотация. Вещества белковой природы, обладающие способностью избирательно ускорять многие химические реакции, как внутри клетки, так и вне организма, называют ферментами или энзимами. Важнейшим свойством ферментов является их каталитическая активность. Благодаря своим уникальным особенностям энзимы широко применяют в химической, пищевой, легкой и фармацевтической промышленности. Применение биокатализаторов в производстве выгодно с экономической и экологической точек зрения, так как они нетоксичны и функционируют в более мягких условиях по сравнению с химическими катализаторами. Ферменты не утрачивают способность осуществлять каталитическую активность и проявлять высокую субстратную специфичность как внутри, так и вне клеток организма-производителя.

Однако ферменты часто нестабильны и ингибируются различными соединениями и факторами. Решить данные проблемы возможно путём их иммобилизации на полимерных носителях. Иммобилизация значительно улучшает стабильность биомолекул в различных условиях реакции и предоставляет возможность их повторного использования.

Одним из перспективных носителей для иммобилизации ферментов является хитозан, получаемый из хитина путем деацетилирования. Хитозан – это универсальный сорбент, который связывает широкий спектр веществ органической и неорганической природы, в том числе и молекулы ферментов. Хитозан и его производные являются перспективными полимерами для фармации благодаря их высокой биосовместимости и низкой токсичности.

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 синтезировано целевое производное – ацетат хитозана с молекулярными массами 600, 350 и 200 кДа, структура которого подтверждена методом ИК-спектроскопии, а степень замещения рассчитана на основе титриметрических данных. Проведена иммобилизация папаина на данных полимерах. 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 папаина на матрице ацетата хитозана с молекулярной массой 350 кДа.

Изучены типы взаимодействий, энергии связывания, аминокислотный состав поверхностей папаина, которые в процессе комплексообразования взаимодействуют с носителем. Установлено, что связи и взаимодействия папаина с ацетатом хитозана образуются, в том числе с участием аминокислотных остатков, расположенных вблизи активного центра фермента (Cys25 и His159), аффинность связывания папаина с ацетатом хитозана составила –8.1 ккал/моль.

Ключевые слова: папаин, ацетат хитозана, иммобилизация

сутствующей в остатке цистеина. Цистеиновые протеазы катализируют реакцию расщепления белков и пептидов посредством гидролиза пептидной связи, имеют широкое распространение в природе, встречаются как в растительных, так и в животных организмах [1]. Благодаря своей доступности цистеиновые протеазы нашли широкое применение в различных областях деятельности человека, таких как биотехнология [2, 3], косметология [4], фармация [5, 6], медицина [7, 8], пищевая промышленность [9].

Перспективным для фармации ферментом является папаин (КФ 3.4.22.2) – цистеиновая протеаза, которую получают из латекса папайи *Carica papaya*. Фермент стабилен при высоких температурах и активен в диапазоне pH 3.0-9.0. Изоэлектрическая точка равна 8.75 [10]. Благодаря широкой субстратной специфичности, доступности и невысокой стоимости папаин применяется в качестве терапевтического агента в различных медицинских и косметологических средствах [11]. Папаин обладает противовоспалительными, противогрибковыми и антимикробными свойствами. Фермент способствует заживлению некротических язв, стимулирует метаболизм и ускоряет регенерацию тканей, а также повышает эффективность проникновения других лекарственных средств через кожные покровы без нарушения целостности здоровых тканей [12].

Ферменты часто являются неустойчивыми к денатурирующим факторам внешней среды, поэтому целесообразно иммобилизовать их на матрице полимеров [13, 14]. Для успешной иммобилизации ферментов носители должны обладать следующими свойствами: химической и биологической устойчивостью, механической прочностью, не должны вызывать неспецифической адсорбции и глубоких конформационных изменений молекулы белка, при этом легко гранулироваться и активироваться.

Для практического применения достаточно перспективными являются хитозан и его производные, которые в отличие от хитина, растворимы в разбавленных кислотах, что расширяет возможности их промышленного использования. Хитозан – природный биополимер, получаемый деацетилированием хитина. Хитозан и его производные обладают уникальными свойствами в качестве носителей для различных ферментов, применяемых в медицинской и фармацевтической промышленности [15]. Низкая стоимость, доступность, антимикробная активность, биоразлагае-

мость и высокая адгезивная способность делают хитозан перспективным носителем для создания лекарственных средств на его основе. Иммобилизованные на хитозане ферменты становятся устойчивыми к микробному воздействию, у них повышается термостабильность [16-18].

Одним из структурных производных хитозана является ацетат хитозана, представляющий собой растворимую форму названного полимера. Ацетат хитозана – полисахарид, содержащий ионизованные первичные аминогруппы. Он также обладает многочисленными значимыми для биомедицины свойствами, включая антимикробные и ранозаживляющие, перспективен для адресной доставки лекарств [19].

Таким образом, цель настоящего исследования – разработка методики иммобилизации папаина на водорастворимом производном хитозана – ацетате хитозана с различными молекулярными массами.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объектов исследования был выбран папаин из *Carica papaya* (Sigma, США), субстратом для гидролиза служил азоказеин (Sigma, США), для синтеза ацетата хитозана был использован хитозан со средней молекулярной массой 600 кДа и степенью деацетилирования 0.85 (Биопрогресс, Россия).

Синтез ацетата хитозана 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 Уббеллоде в смеси водных растворов 0.3 М уксусной кислоты и 0.2 М ацетата натрия при 25 °С. Из данных вискозиметрии с помощью уравнения Мар-

аминокислотных остатков, расположенных вблизи активного центра фермента (Cys25 и His159), что, естественно, должно отразиться на активности полученных комплексов. Аффинность связывания папаина с ацетатом хитозана составила -8.1 ккал/моль.

Анализ содержания белка в иммобилизованных препаратах показал, что наибольшее количество папаина (в мг на г носителя) связывается с ацетатом хитозана с молекулярной массой 600 кДа (рис. 2). Общая активность папаина (в ед. на мл раствора) оказалась выше при его иммобилизации на ацетате хитозана с молекулярной массой 350 кДа (рис. 3). Наибольшую удельную активность показали образцы в комплексе с ацетатом хитозана с молекулярной массой 350 кДа (рис. 4).

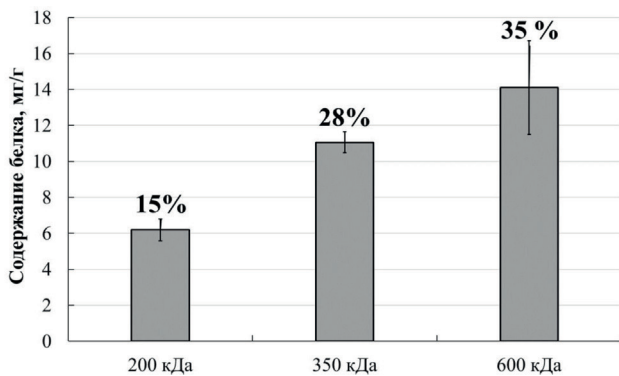


Рис. 2. Содержание белка (мг/г носителя) в препаратах папаина, иммобилизованного на матрице ацетата хитозана. Отдельно указана эффективность комплексообразования папаина (по содержанию белка), выраженная в процентах сорбированного фермента от его количества в растворе в процессе комплексообразования, принятого за 100 %

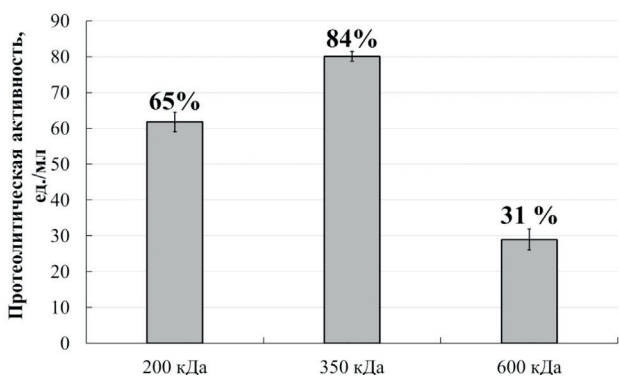


Рис. 3. Общая каталитическая активность (ед./мл раствора) в препаратах папаина, иммобилизованного на матрице ацетата хитозана. Отдельно указана эффективность комплексообразования папаина (по общей каталитической активности), выраженная в процентах сохранения протеолитической активности фермента после иммобилизации по отношению к активности папаина в растворе, принятой за 100 %

Таблица 1
Аминокислотные остатки папаина, которые образуют связи и взаимодействия с ацетатом хитозана в ходе образования между ними комплексов

Аминокислотные остатки, формирующие	
водородные связи и длина связи	иные типы взаимодействий
Asn18, 3.17 Å; Gly20, 2.86 Å; Cys63, 3.06 Å; Asn64, 2.84 Å; Gly66, 3.13 и 2.82 Å; Asp158, 2.88 Å; His159, 3.03 Å; Gly180, 3.17 Å	Gln19, Ser21, Cys22, Gly23, Gly65, Tyr67, Gln142, Trp177, Trp181

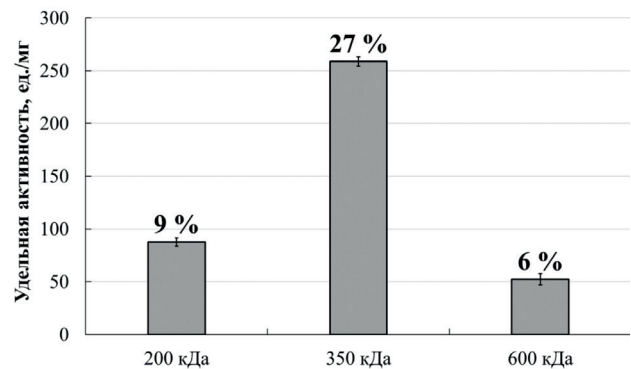


Рис. 4. Удельная каталитическая активность (ед./мг белка) в препаратах папаина, иммобилизованного на матрице ацетата хитозана. Отдельно указана эффективность комплексообразования папаина (по удельной каталитической активности), выраженная в процентах сохранения удельной протеолитической активности фермента после иммобилизации по отношению к активности папаина в растворе, принятой за 100 %

Таким образом, 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 папаина на матрице ацетата хитозана с молекулярной массой 350 кДа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проделанной работы нам удалось синтезировать производные хитозана, а именно ацетат хитозана с молекулярными массами 200, 350 и 600 кДа. Была проведена иммобилизация папаина 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 папаина на матрице ацетата хитозана с молекулярной массой 350 кДа.

Гончарова С. С., Редько Ю. А., Лавлинская М. С., Сорокин А. В., Кондратьев М. С., Юдин Н. Е., Путинцева О. В., Наквасина М. А., Холявка М. Г., Артюхов В. Г.

Показано, что связи и взаимодействия папаина при комплексообразовании с ацетатом хитозана образуются, в том числе с участием аминокислотных остатков, расположенных вблизи активного центра фермента (Cys25 и His159), что объясняет снижение каталитической активности иммобилизованных образцов по сравнению со свободной формой фермента.

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. Silva M.Z.R., Oliveira J.P.B., Ramos M.V., Farias D.F., de Sa 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, pp. 125574. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125574.
3. 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.
4. Secchi G. // *Clinics in Dermatology*. 2008. Vol. 26, pp. 321-325. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2008.04.004.
5. 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., Porfiriyev 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.
6. McKerrow J.H. // *PLoS Negl Trop Dis*. 2018. Vol. 12. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005639.
7. 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, pp. 101638. DOI: 10.1016/j.psj.2021.101638.
8. 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, pp. 197. DOI: 10.3390/md19040197.
9. Gagaoua M., Dib A.L., Lakhdera 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.
10. Kong Y.R., Jong Y.X., Balakrishnan M., Bok Z.K, Weng J.K.K., Tay K.C., Goh B.H., Ong Y.S., Chan K.G., Lee L.H., Khaw K.Y. // *Biology*. 2021. Vol. 10, pp. 287-307. DOI: 10.3390/biology10040287
11. Hu R., Chen G., Li Y. // *Molecules*. 2020. Vol. 25(18), p. 4091. DOI: 10.3390/molecules25184091
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(11), pp. 1240-1244. DOI: 10.1007/s11094-022-02564-8.
13. Barbosa, O.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Torres, R.; Rodrigues, R.C.; Fernandez-Lafuente, R. // *Biotechnol. Adv*. 2015. Vol. 33(5), pp. 435-456. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.03.006
14. Kaur N., Bhardwaj P., Singh G., Arya S.K. // *Process Biochemistry*. 2021. Vol. 107, pp. 153-163. DOI: 10.1016/j.procbio.2021.05.017
15. Sorokin A., Lavlinskaya M. // *Polymer Bulletin*. 2022. Vol. 79, pp. 407-427. DOI: 10.1007/s00289-020-03521-9.
16. Crini G., Badot P. // *Progress in Polymer Science*. 2008. Vol. 33, pp. 399-447. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.11.001
17. Kulikov S.N., Bayazitova L.T., Tyupkina O.F., Zelenikhin P.V., Salnikova M.M., Bezrodnykh E.A., Tikhonov V.E. // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2016. Vol. 52 (5), 502-507. DOI: 10.1134/S0003683816050100
18. Banshee P.S., Selvakumara D., Kadirvelub K., Kumara N.S. // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. Vol. 150, pp. 1072-1083. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113
19. Farrar D. // *Advanced wound repair therapies*. Woodhead Publishing. 2011. Vol. 1, p. 672.
20. Kasaai M. R. // *Carbohydrate Polymers*. 2007. Vol. 68. pp. 477-488. doi:10.1016/j.carbpol.2006.11.006.
21. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Faar A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. pp. 265-275.
22. 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
Гончарова С. С., младший научный сотрудник
кафедры биофизики и биотехнологии
E-mail: Olshannikovas@gmail.com

Voronezh State University
Goncharova S. S., Junior Researcher, department
of biophysics and biotechnology
E-mail: Olshannikovas@gmail.com

Редько Ю. А., магистрант кафедры биофизи-
ки и биотехнологии

Redko Yu. A., master student, department of
biophysics and biotechnology

Лавлинская М. С., к.х.н., старший научный со-
трудник кафедры биофизики и биотехнологии;
старший научный сотрудник НИЛ «Биоресурс-
ный потенциал приморской территории», Се-
вастопольский государственный университет;
старший научный сотрудник лаборатории ме-
тагеномики и пищевых биотехнологий, Воронеж-
ский 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 высоко-
молекулярных соединений и коллоидной химии;
младший научный сотрудник кафедры биофизики
и биотехнологии; младший научный сотрудник
НИЛ «Биоресурсный потенциал приморской тер-
ритории», Севастопольский государственный
университет; младший научный сотрудник лабо-
ратории метагеномики и пищевых биотехноло-
гий, Воронежский государственный университет
инженерных технологий

Sorokin A. V., postgraduate student, department
of polymer science and colloid chemistry; Researcher,
Department of Biophysics and Biotechnology;
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

Юдин Н. Е., магистрант кафедры высокомо-
лекулярных соединений и коллоидной химии

Yudin N. E., master student, department of
polymer science and colloid chemistry

Путинцева О. В., д.б.н., профессор кафедры
биофизики и биотехнологии

Putintseva O. V., DSci., Professor, department of
biophysics and biotechnology

Наквасина М. А., д.б.н., профессор кафедры
биофизики и биотехнологии

Nakvasina M. A., DSci., Professor, department of
biophysics and biotechnology

Холявка М. Г., д.б.н., профессор кафедры био-
физики и биотехнологии; профессор кафедры
«Физика» Севастопольского государственного
университета

Holyavka M. G., DSci., 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. кафе-
дрой биофизики и биотехнологии

Artyukhov V. G., DSci., professor, Head of the
Biophysics and Biotechnology Department

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Институт биофизики клетки РАН – обосо-
бленное подразделение ФИЦ «Пуцинский науч-

Institute of Cell Biophysics of the Russian
Academy of Sciences

Гончарова С. С., Редько Ю. А., Лавлинская М. С., Сорокин А. В., Кондратьев М. С., Юдин Н. Е., Путинцева О. В.,
Наквасина М. А., Холявка М. Г., Артюхов В. Г.
ный центр биологических исследований РАН»

Кондратьев М. С., к.ф.-м.н. зав. лабораторией
структуры и динамики биомолекулярных систем,
старший научный сотрудник кафедры биофизики
и биотехнологии, Воронежский государственный
университет

Kondratyev M. S., PhD., head Laboratory of
Structure and Dynamics of Biomolecular System,
Senior Researcher, Department of Biophysics and
Biotechnology, Voronezh State University

DEVELOPMENT OF A BIOCATALYST BASED ON PAPAINE IMMOBILIZED ON CHITOSAN ACETATE

S. S. Goncharova¹, Yu. A. Redko¹, M. S. Lavlinskaya^{1,2,3}, A. V. Sorokin^{1,2,3}, M. S. Kondratyev^{1,4},
N. E. Yudin¹, O. V. Putintseva¹, M. A. Nakvasina¹, M. G. Holyavka^{1,2*}, V. G. Artyukhov¹

¹Voronezh State University

²Sevastopol State University, Sevastopol

³Voronezh State University of Engineering Technologies

⁴Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences

Abstract. Substances of a protein nature that have the ability to selectively accelerate many chemical reactions both within cell and outside the body are called enzymes. The most important property of enzymes is their catalytic activity. Due to their peculiar properties, enzymes are widely used in the chemical, food, light and pharmaceutical industries. The use of biocatalysts in production is beneficial from an economic and environmental point of view, since they are non-toxic and operate under milder conditions compared to chemical catalysts. Enzymes do not lose the ability to carry out catalytic activity and exhibit high substrate specificity both inside and outside the cells of the producer organism.

However, enzymes are often unstable and inhibited by various compounds and factors. It is possible to solve these problems by immobilizing them on polymer carriers. Immobilization significantly improves the stability of biomolecules under various reaction conditions and allows their reuse.

One of the promising carriers for the immobilization of enzymes is chitosan obtained from chitin by deacetylation. Chitosan is a universal sorbent that binds a wide range of organic and inorganic substances, including enzyme molecules. Chitosan and its derivatives are promising polymers for pharmacy due to their high biocompatibility and low toxicity.

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. The target derivative, chitosan acetate with molecular weights of 600, 350, and 200 kDa, was synthesized from the obtained samples, the structure of which was confirmed by IR spectroscopy, and the degree of substitution was calculated on the basis of titrimetric data. Papain was immobilized on these polymers. The protein content and catalytic activity of the preparations were determined. 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 papain was immobilized on a chitosan acetate matrix with a molecular weight of 350 kDa.

The types of interactions, binding energies, amino acid composition of papain surfaces, which interact with the carrier in the process of complexation have been studied. It was revealed that the bonds and interactions of papain with chitosan acetate are formed with the participation of amino acid residues located near the active site of enzyme (Cys25 and His159); the binding affinity of papain with chitosan acetate was – 8.1 kcal/mol.

Keywords: papain, chitosan acetate, immobilization