

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ СТЕПЕНИ ГИДРОЛИЗА АЗОКАЗЕИНА ФИЦИНОМ, БРОМЕЛИНОМ И ПАПАИНОМ ОТ ВРЕМЕНИ ИНКУБАЦИИ

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 17.07.2023 г.

Аннотация. Протеазы активно используются в пищевой промышленности и медицине. Примерами таких ферментов являются фицин (КФ 3.4.22.3), бромелин (КФ 3.4.22.4) и папаин (КФ 3.4.22.2). Для рационального использования данных энзимов необходимо знать время полного гидролиза субстрата тем или иным ферментом, поэтому целью работы являлось изучение зависимости степени гидролиза азоказеина фицином, бромелином и папаином (растворимыми и иммобилизованными на матрицах средне- и высокомолекулярного хитозанов) от времени инкубации ферментов с субстратом.

Объектами исследования были выбраны фицин, бромелин и папаин, носителями для иммобилизации – средне- (Mr = 200 кДа, степень деацетилирования – 82 %) и высокомолекулярный (Mr = 350 кДа, степень деацетилирования – 94.85%) хитозаны. Иммобилизацию цистеиновых протеаз проводили методом адсорбции. Инкубацию ферментов с азоказеином осуществляли при оптимальных для их функционирования температурах (37 °С – для фицина, 60 °С – для папаина и бромелина) в течение 10, 20, 30, 60, 90, 120 и 150 минут.

Максимальная степень насыщения фермента субстратом наблюдалась через 30 минут как у фицина, бромелина и папаина в растворе, так и у иммобилизованных образцов. Через 10 минут инкубации степень гидролиза азоказеина нативным и иммобилизованным на средне- и высокомолекулярном хитозанах фицином составила 35.5, 37.8, 36.8 %, а через 20 минут инкубации – уже 72.4, 78.0, 78.9 %. Активность бромелина после 10 и 20 минут инкубации с субстратом составила 35.3 и 73.2 % для нативного фермента, для иммобилизованного на матрице средномолекулярного хитозана – 37.1 и 76.2 %, для сорбированного на высокомолекулярном хитозане – 34.5 и 72.4 %. Через 10 минут инкубации степень гидролиза азоказеина нативным и иммобилизованным на средне- и высокомолекулярном хитозанах папаином составила 37.9, 37.9 и 40.2 % соответственно, через 20 минут инкубации – 78.5, 78.4 и 75.7 %. При увеличении времени инкубирования ферментов с субстратом (до 60 минут и более) показатели активности фицина, бромелина и папаина варьировали в пределах 5 %.

Ключевые слова: фицин, бромелин, папаин, степень гидролиза, хитозан

Фицин (КФ 3.4.22.3) является цистеиновой протеазой, получаемой из латекса растений рода *Ficus*. Фермент имеет довольно широкую субстратную специфичность и проявляет высокую активность в диапазоне рН от 6.5 до 9.5. Молекулярная масса фицина равна 25-26 кДа. Фермент предпочтительно гидролизует в белках связи тирозина и фенилаланина, но не происходит процесс расщепления по связям аргинина и лизина. Фермент проявляет антимикробную активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий [1-5].

Бромелин (КФ 3.4.22.4) представляет собой высокомолекулярный гликопротеид, содержащийся в наибольшем количестве в соке зеленых плодов ананаса, расщепляет белки до поли- и олигопептидов. При этом гидролиз происходит в широком диапазоне значений рН: от 3.0 до 8.0. Молекулярная масса бромелина составляет около 33 кДа. Бромелин используется для ослабления воспалительных процессов при травмах, снятия отека мягких тканей, а также для ускорения процессов их восстановления после повреждений. Показаны его противораковые свойства и способность предотвращать образование тромбов. Бромелин обла-

дает иммуномодулирующим действием, ускоряет процессы репарации тканей в результате деполимеризации межклеточных структур и модификации проницаемости сосудов [6-13].

Папаин (КФ 3.4.22.2) является монотиоловой цистеиновой эндопротеазой с молекулярной массой 23 кДа. Папаин проявляет свою активность в кислых, нейтральных и щелочных средах: диапазон рН от 3.0 до 12.0 при оптимуме рН 6-7. Папаин катализирует гидролиз белков до полипептидов и аминокислот, причем происходит разрыв любых пептидных связей, кроме связей пролина и связей глутаминовой кислоты с диссоциированной карбоксильной группой. Биокатализатор способствует разрушению токсинов многих возбудителей инфекционных заболеваний, в частности, столбняка. Папаин ускоряет заживление ран, трофических язв, пролежней, способствуя их очищению от некротических масс, осуществляет очищение раны от патогенной микрофлоры, создает оптимальные условия для репаративных процессов. Папаин широко применяется в биологических и биомедицинских научных исследованиях: при химическом анализе, изучении структуры белков, очистке различных биологически активных веществ и т.д. [14-17].

Для любой сферы применения протеолитических ферментов важно знать время полного гидролиза субстрата тем или иным энзимом, поэтому целью работы являлось изучение зависимости полноты гидролиза азоказеина протеолитическими ферментами (фицином, бромелином и папаином) от времени инкубации.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объектов исследования были выбраны фицин, бромелин и папаин фирмы «Sigma-Aldrich», носителями для иммобилизации – среднемолекулярный (СМхтз, $M_r = 200$ кДа, степень деацетилирования – 82 %) и высокомолекулярный хитозаны (ВМхтз, $M_r = 350$ кДа, степень деацетилирования – 94.85%) фирмы ЗАО «Биопрогресс».

В качестве субстрата для гидролиза был выбран азоказеин (Sigma-Aldrich). Для иммобилизации фицина и папаина на матрицах средне- (рН 10.0 и 9.0) и высокомолекулярного (рН 8.6 и 9.0) хитозанов использовали 0.05 М глициновый буфер. Для сорбции бромелина на матрицах средне- и высокомолекулярного хитозанов использовали 0.05 М трис-глициновый буфер со значениями рН 9.0 и 8.5 соответственно [18, 19]. Инкубация ферментов с субстратом проводилась при оптимальных температурах (37 °С – для фицина, 60 °С –

для папаина и бромелина) в течение 10, 20, 30, 60, 90, 120 и 150 минут.

В качестве субстрата для определения активности ферментов применяли азоказеин. Методика подробно изложена в работе [20].

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

На рис. 1 изображена зависимость полноты гидролиза азоказеина растворимым и иммобилизованным на средне- и высокомолекулярном хитозанах фицином от времени инкубации. Установлено, что максимальная эффективность гидролиза субстрата-белка нативным и сорбированным энзимом происходит при 30-минутной инкубации при 37 °С. Через 10 минут инкубации степень гидролиза азоказеина нативным и иммобилизованным на средне- и высокомолекулярном хитозанах фицином составляет 35.5, 37.8, 36.8 % от оптимального значения соответственно (табл. 1). Через 20 минут инкубации – 72.4, 78.0, 78.9 %. При увеличении времени инкубации свыше 60 минут не происходит изменения в скорости гидролиза белкового субстрата фицином (нативным и сорбированным).

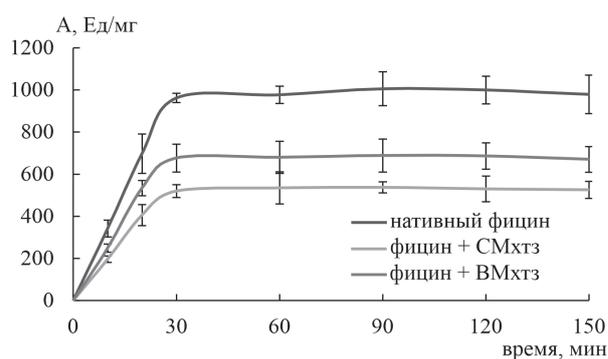


Рис. 1. Зависимость удельной активности (в Ед/мг) нативного и иммобилизованного на матрице хитозана фицина от времени инкубации с субстратом

При гидролизе азоказеина бромелином, нативным и иммобилизованным на средне- и высокомолекулярном хитозанах, оптимальное время инкубации энзима и субстрата составляет 30 минут

при 60 °С (рис. 2). Активность нативного фермента после 10 и 20 минут инкубации равна 35.3 и 73.2 %, иммобилизованного на матрице среднемолекулярного хитозана – 37.1 и 76.2 %, сорбированного на высокомолекулярном хитозане – 34.5 и 72.4 % (табл. 1). Значения активности бромелина (интактного и иммобилизованного на хитозане) после 30, 60, 90, 120 и 150 минут инкубации с субстратом отличаются друг от друга на 5 % и менее.

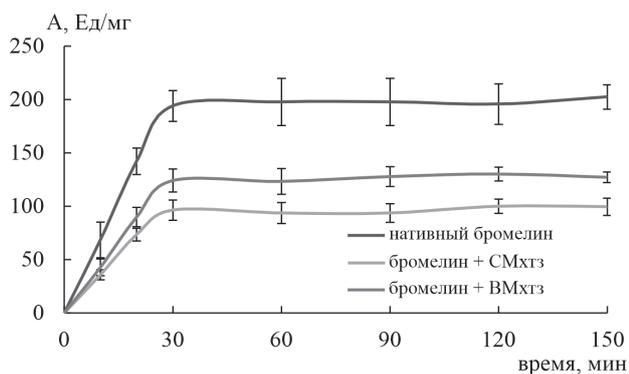


Рис. 2. Зависимость удельной активности (в Ед/мг) нативного и иммобилизованного на матрице хитозана бромелина от времени инкубации с субстратом

При исследовании эффективности гидролиза субстрата папаином показано, что максимальная активность нативного и иммобилизованного на матрице средне- и высокомолекулярного хитозанов энзима наблюдается при 30-минутной инкубации при 60 °С (рис. 3). Через 10 минут инкубации полнота гидролиза азоказеина нативным и иммобилизованным на средне- и высокомолекулярном хитозанах папаином составляет 37.9, 37.9 и 40.2 % от максимального значения соответственно (табл. 1), а через 20 минут инкубации – 78.5, 78.4 и 75.7 %.

Исходя из представленных в таблице значений, можно отметить, что максимальная степень насыщения фермента субстратом наблюдается

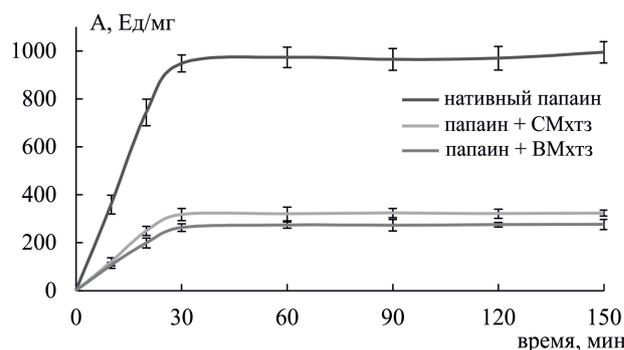


Рис. 3. Зависимость удельной активности (в Ед/мг) нативного и иммобилизованного на матрице хитозана папаина от времени инкубации с субстратом

через 30 минут инкубации, как у нативных цистеиновых протеаз, так и у гетерогенных иммобилизованных биокатализаторов.

ВЫВОДЫ

В ходе анализа значений удельной активности (в единицах на мг фермента) было показано, что максимальное количество продуктов гидролиза азоказеина можно получить уже при 30 минутах инкубации ферментов с субстратом. При увеличении времени инкубирования показатели активности фицина, бромелина и папаина варьируют в пределах 5 %.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Holyavka M., Koroleva V., Olshannikova S., Artyukhov V., Faizullin D., Zakhartchenko N., Zuev Y., Kondratyev M., Zakharova E. // International Journal of Biological Macromolecules. 2021. Vol. 180, pp. 161-176.

Таблица 1

Степень гидролиза (%) азоказеина нативными и сорбированными на матрице хитозана цистеиновыми протеазами

образец	Время инкубации с субстратом, мин						
	10	20	30	60	90	120	150
Нативный фицин	35.5	72.4	100.0	101.5	104.5	103.9	101.7
Фицин + СМхтз	37.8	78.0	100.0	102.9	103.4	102.0	101.1
Фицин + ВМхтз	36.8	78.9	100.0	100.5	101.8	101.5	99.1
Нативный бромелин	35.3	73.2	100.0	101.9	101.9	100.9	104.3
Бромелин + СМхтз	37.1	76.2	100.0	97.2	97.2	103.7	103.3
Бромелин + ВМхтз	34.5	72.4	100.0	99.4	103.0	105.0	102.4
Нативный папаин	37.9	78.5	100.0	102.7	101.7	102.3	104.9
Папаин + СМхтз	37.9	78.4	100.0	100.8	101.9	101.0	101.8
Папаин + ВМхтз	40.2	75.7	100.0	104.0	103.7	104.6	105.0

*За 100 % принято значение активности фицина, бромелина и папаина через 30 минут инкубации

2. Холявка М.Г., Артюхов В.Г. Имобилизованные биологические системы: биофизические аспекты и практическое применение. учебное пособие. Воронеж, 2017.

3. Baidamshina D.R., Trizna E.Y., Agafonova M.N., Chirkova M.N., Vasileva O.S., Akhmetov N., Shubina V.V., Porfiriyev A.G., Semenova E.V., Sachenkov O.A., Baltina T.V., Kayumov A.R., Koroleva V.A., Pankova S.M., Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Bogachev M.I. // International Journal of Biological Macromolecules. 2020. Vol. 164, pp. 4205-4217.

4. Fileti A.M.F., Fischer G.A., Tambourgi E.B. // Brazilian Archives of Biology and Technology. 2010. Vol. 53, pp. 455-463.

5. Grzonka Z., Kasprzykowski F., Wiczak W. Cysteine proteases, in: J. Polaina, A. P. MacCabe (Eds.), Industrial Enzymes, Springer. New York. 2007, pp. 181-195.

6. Konno K., Hirayama C., Nakamura M., Tateishi K., Tamura Y., Hattori M., Kohno K. // The Plant Journal. 2004. Vol. 37, pp. 370-378.

7. Khanna N., Panda P.C. // Indian Journal Of Animal Research. 2007. Vol. 41, pp. 55-58.

8. Silva D.F., Rosa H., Carvalho A.F.A., Neto P.O. // Enzyme Research, 2015. Article ID 573721

9. Albuquerque P.B.S., de Oliveira W.F., dos Santos Silva P.M., dos Santos Correia M.T., Kennedy J.F., Coelho L.C.B.B. // International Journal of Biological Macromolecules. 2020. Vol. 156, pp. 51-66.

10. Dicosimo R., McAuliffe J., Poulouse A.J., Bohlmann G. // Chemical Society Reviews. 2013. Vol. 42, pp. 6437-6474.

11. Thallinger B., Prasetyo E.N., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M. // Biotechnol. 2013. Vol. 8, pp. 97-109.

12. Benucci I., Lombardelli C., Liburdi K., Acciaro G., Zappino M., Esti M. // Journal of Food Science and Technology. 2015. Vol. 23. pp. 1-16.

13. Bekhit A., Hopkins D.L., Geesink G., Bekhit A.A., Franks P. // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2013. Vol. 54, pp. 1012-1031.

14. Baidamshina D.R., Trizna E.Y., Kayumov A.R., Koroleva V.A., Olshannikova S.S., Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Bogachev M.I. // Marine Drugs. 2021. Vol. 19, pp. 197.

15. Benucci I., Liburdi K., Garzillo A.M.V., Esti M. // Food Chemistry. 2011. Vol. 124, pp. 1349-1353.

16. Akpan I.P., Omojola A.B. // Journal of Meat Science and Technology. 2015. Vol. 3, pp. 42-46.

17. González-Rábade N., Badillo-Corona J.A., Aranda-Barradas J.S., Oliver-Salvador M.D.C. // Biotechnol. 2011. Vol. 29, pp. 983-996.

18. Холявка М.Г., Наквасина М.А., Артюхов В.Г. Практикум по биотехнологии: иммобилизованные биологические объекты в системе лабораторных работ. учебное пособие. Воронеж, 2017.

19. Королева В.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Сазыкина С.М., Тимошилова А.А., Ольшанникова С.С. // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. Межрегиональный сборник научных работ. Воронежский государственный аграрный университет им. Императора Петра I. Воронеж, 2015, С. 99-102.

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, pp. 4419-4425.

*Воронежский государственный университет
*Королева В. А., младший научный сотрудник
кафедры биофизики и биотехнологии*

*ассистент кафедры биологии, Воронежский
государственный медицинский университет им.
Н.Н. Бурденко*

E-mail: koroleva_victoria@bk.ru

*Холявка М. Г., д.б.н., профессор кафедры био-
физики и биотехнологии.*

*профессор кафедры «Физика», Севастополь-
ский государственный университет*

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, Department of Biology,
Voronezh State Medical University N.N. Burdenko.
E-mail: koroleva_victoria@bk.ru*

*Holyavka M.G., DSci, Professor, Biophysics and
Biotechnology Department*

*Professor, Physics Department, Sevastopol State
University*

E-mail: holyavka@rambler.ru

*Artyukhov V.G., DSci., Professor, head of the
Biophysics and Biotechnology Department*

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

INVESTIGATION OF THE DEGREE OF AZOCASEIN HYDROLYSIS BY FICIN, BROMELAIN AND PAPAINE DEPENDENCE ON THE INCUBATION TIME

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

1 – Voronezh State University

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

3 – Sevastopol State University

Abstract. Proteases are actively used in the food industry and medicine. Examples of such enzymes are ficin (EC 3.4.22.3), bromelain (EC 3.4.22.4) and papain (EC 3.4.22.2). For the rational use of these enzymes, it is necessary to know the time of the substrate complete hydrolysis by one or another enzyme; therefore, the aim of the work was to study the dependence of the degree of azocasein hydrolysis by ficin, bromelain, and papain (soluble and immobilized on matrices of medium and high molecular weight chitosan) on the incubation time of enzymes with the substrate.

Ficin, bromelain, and papain were chosen as the objects of study, medium (Mr = 200 kDa, degree of deacetylation – 82%) and high molecular (Mr = 350 kDa, degree of deacetylation – 94.85%) weight chitosans were chosen as carriers for immobilization. The immobilization of cysteine proteases was carried out by the adsorption method. Enzymes were incubated with azocasein at temperatures optimal for their functioning (37 °C for ficin, 60 °C for papain and bromelain) for 10, 20, 30, 60, 90, 120, and 150 minutes.

The maximum degree of saturation of the enzyme with the substrate was observed after 30 minutes both in ficin, bromelain and papain in solution and in heterogeneous immobilized ones. After 10 minutes of incubation, the degree of azocasein hydrolysis by ficin, native and immobilized on medium and high molecular weight chitosan, was 35.5, 37.8, 36.8 %, and after 20 minutes of incubation, it was already 72.4, 78.0, 78.9 %. The activity of bromelain after 10 and 20 minutes of incubation with the substrate was 35.3 and 73.2% for the native enzyme; for enzyme immobilized on the medium molecular weight chitosan matrix – 37.1 and 76.2%; and for sorbed on high molecular weight chitosan – 34.5 and 72.4%. After 10 minutes of incubation, the degree of azocasein hydrolysis by native and immobilized on medium and high molecular weight chitosan papain was 37.9, 37.9, and 40.2 %, respectively; after 20 minutes of incubation, it was 78.5, 78.4, and 75.7 %. With an increase in the time of incubation of enzymes with a substrate (up to 60 minutes or more), the activity of ficin, bromelain, and papain varied within 5 %.

Keywords: ficin, bromelain, papain, degree of hydrolysis, chitosan

REFERENCES

1. Holyavka M., Koroleva V., Olshannikova S., Artyukhov V., Faizullin D., Zakhartchenko N., Zuev Y., Kondratyev M., Zakharova E., International Journal of Biological Macromolecules, 2021, Vol. 180, pp. 161-176.
2. Holyavka M.G., Artyukhov V.G. Immobilizovannye biologicheskie sistemy: biofizicheskie aspekty i prakticheskoe primenenie. uchebnoe posobie : Voronezh, 2017
3. Baidamshina D.R., Trizna E.Y., Agafonova M.N., Chirkova M.N., Vasileva O.S., Akhmetov N., Shubina V.V., Porfiryev A.G., Semenova E.V., Sachenkov O.A., Baltina T.V., Kayumov A.R., Koroleva V.A., Pankova S.M., Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Bogachev M.I., International Journal of Biological Macromolecules, 2020, Vol. 164, pp. 4205-4217.
4. Fileti A.M.F., Fischer G.A., Tambourgi E.B., Brazilian Archives of Biology and Technology, 2010, Vol. 53, pp. 455-463.
5. Grzonka Z., Kasprzykowski F., Wiczek W. Cysteine proteases, in: J. Polaina, A. P. MacCabe (Eds.), Industrial Enzymes, Springer. New York. 2007, pp. 181-195.
6. Konno K., Hirayama C., Nakamura M., Tateishi K., Tamura Y., Hattori M., Kohno K., The Plant Journal., 2004, Vol. 37, pp. 370-378.
7. Khanna N., Panda P.C., Indian Journal Of Animal Research, 2007, Vol. 41, pp. 55-58.
8. Silva D.F., Rosa H., Carvalho A.F.A., Neto P.O., Enzyme Research, 2015. Article ID 573721.
9. Albuquerque P.B.S., de Oliveira W.F., dos Santos Silva P.M., dos Santos Correia M.T., Kennedy J.F., Coelho L.C.B.B., International Journal of Biological Macromolecules, 2020, Vol. 156, pp. 51-66.

10. Dicosimo R., McAuliffe J., Poulouse A.J., Bohlmann G., *Chemical Society Reviews*, 2013, Vol. 42, pp. 6437-6474.
11. Thallinger B., Prasetyo E.N., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M., *Biotechnol.*, 2013, Vol. 8, pp. 97-109.
12. Benucci I., Lombardelli C., Liburdi K., Acciaro G., Zappino M., Esti M., *Journal of Food Science and Technology*, 2015, Vol. 23, pp. 1-16.
13. Bekhit A., Hopkins D.L., Geesink G., Bekhit A.A., Franks P., *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2013, Vol. 54, pp. 1012-1031.
14. Baidamshina D.R., Trizna E.Y., Kayumov A.R., Koroleva V.A., Olshannikova S.S., Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Bogachev M.I., *Marine Drugs*, 2021, Vol. 19, pp. 197.
15. Benucci I., Liburdi K., Garzillo A.M.V., Esti M., *Food Chemistry*, 2011, Vol. 124, pp. 1349-1353.
16. Akpan I.P., Omojola A.B., *Journal of Meat Science and Technology*, 2015, Vol. 3, pp. 42-46.
17. González-Rábade N., Badillo-Corona J.A., Aranda-Barradas J.S., Oliver-Salvador M.D.C., *Biotechnol.*, 2011, Vol. 29, pp. 983-996.
18. Holyavka M.G., Nakvasina M.A., Artyuhov V.G. *Praktikum po biotekhnologii: immobilizovannye biologicheskie ob"ekty v sisteme laboratornyh rabot. uchebnoe posobie : Voronezh*, 2017
19. Koroleva V.A., Holyavka M.G., Artyuhov V.G., Sazykina S.M., Timoshilova A.A., Ol'shannikova S.S. *Razrabotka metodiki immobilizacii ficina na matricah kislotorastvorimyh hitozanov. V sbornike: Organizaciya i regulyaciya fiziologo-biohimicheskikh processov. Mezhhregional'nyj sbornik nauchnyh rabot. Voronezhskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet im. Imperatora Petra I. Voronezh*, 2015, pp. 99-102.
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, pp. 4419-4425.