

УДК 543.422.3

**СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ,
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В СТРУКТУРУ БИОПОЛИМЕРОВ****¹Волосова Е.В., ¹Безгина Ю.А., ¹Пашкова Е.В., ¹Шипуля А.Н., ²Белик Е.В.**¹*Ставропольский государственный аграрный университет, Ставрополь,
e-mail: Volosova_elena@mail.ru;*²*Ставропольский государственный медицинский университет
Минздрава России, Ставрополь*

Анализ литературных данных по иммобилизованным препаратам показывает, что повышение эффективности иммобилизации энзимов зависит от природы и степени очистки биокатализатора, оптимального состава и структуры используемого носителя, выбора метода иммобилизации, который не оказывает ингибирующего действия на активный центр энзима, что способствует сохранению активности фермента, кроме того, необходимой является оптимизация условий иммобилизации. Кинетические данные иммобилизованных ферментов имеют свои особенности, что также нужно учитывать при практическом использовании препаратов в биотехнологических процессах. В работе был предложен метод спектрофотометрического определения активности протеолитических ферментов, включенных в структуру биополимерных материалов. Представлены данные, свидетельствующие об индивидуальных для ферментов закономерностях зависимости физико-химических свойств, удельной активности и стабильности от типа полимерной матрицы и условий иммобилизации.

Ключевые слова: протеолитические ферменты, биоразлагаемые полимерные материалы, спектрофотометрический метод, активность

**SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF PROTEOLYTIC ACTIVITY
OF THE ENZYME, IMMOBILIZED IN THE STRUCTURE OF BIOPOLYMERS****¹Volosova E.V., ¹Bezgina Yu.A., ¹Pashkova E.V., ¹Shipulya A.N., ²Belik E.V.**¹*Stavropol State Agrarian University, Stavropol, e-mail: Volosova_elena@mail.ru;*²*Stavropol State Medical University, Ministry of Health of Russia, Stavropol*

Analysis of the published data on the immobilized preparations shows that the efficiency of immobilization of enzymes depends upon the nature and degree of purification biocatalyst optimal composition and structure of the support used, the choice of the method of immobilization that does not exert an inhibitory effect on the active site of the enzyme, that contributes to the preservation of the enzyme activity, in addition necessary is to optimize the immobilization conditions. Kinetic data immobilized enzymes have the features that must also be considered in the practical use of preparations in biotechnological processes. The paper proposed a method for spectrophotometric determination of the activity of proteolytic enzyme, included in the structure of the biopolymer materials. Presented data showing individual patterns for the enzymes according the physicochemical properties of the specific activity and stability of the polymer matrix type, and immobilization conditions.

Keywords: proteolytic enzymes, biodegradable polymeric materials, spectrophotometric method, activity

Идеи создания композиций различных синтетических полимеров появились в 70-х годах XX века. На данный момент крупные в области производства полимерной продукции фирмы выдвинули свои версии биоразлагаемых материалов. Немецкая компания Bayer представила новый биоразлагаемый полиэфирамид. Полимер имеет полукристаллическую структуру и производится литьем под давлением или экструдирован на традиционном оборудовании. Сырьем для его производства является гексамителен диамин, бутандиол и адипиновая кислота. Получаемая пленка обладает степенью прозрачности, ранжируемой от полупрозрачной до прозрачной. Процесс биоразложения упаковки происходит в те-

чение 60-ти дней при контакте с бактериями и грибами [12]. Итальянская фирма Novamont SpA разработала четыре композиции материала марки Mater Bi, нетоксичного полиацетата на основе крахмала. Английская компания Environmental Polymers Group (EPG) работает над специальными сортами поливинилового спирта, который способен к биоразложению в горячей и холодной воде [4].

Разработка новых технологических процессов на основе биокатализаторов, иммобилизованных в структуры различной природы, открывает пути не только получения новых материалов, но и способствует совершенствованию уже имеющихся. Сохранение активности и стабильности биологических

веществ (в частности, ферментов) во времени связано с необходимостью создания биоспецифической основы и разработкой методов включения биологических субстанций в структуру материала-носителя.

Известен метод включения фермента в гель или микрокапсулы, ограниченные от раствора полупроницаемой (непроницаемой для макромолекул субстрата) мембраной, суть которого состоит в том, что молекулы фермента включаются в трехмерную сетку из тесно переплетенных полимерных цепей, образующих гель. Дополнительный вклад в удерживание фермента в сетке геля могут вносить также ионные и водородные связи между молекулой фермента и окружающими ее полимерными цепями. Для иммобилизации ферментов в геле существуют два основных способа. При одном из них фермент помещают в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате чего образуется полимерный гель с включенными в него молекулами фермента. В реакционную смесь часто добавляют также бифункциональные (содержащие в молекуле две двойные связи) сшивающие агенты, которые придают образующемуся полимеру структуру трехмерной сетки. В другом случае фермент вносят в раствор готового полимера, который затем каким-либо образом переводят в гелеобразное состояние [9].

Химические методы иммобилизации ферментов в настоящее время являются доминирующим способом получения гетерогенных биокатализаторов. При подборе условий иммобилизации препарата Т.А. Ковалевой с соавторами выявлено, что наиболее предпочтительным носителем является анионообменная смола АВ-17-2П. Оптимальным методом иммобилизации является модифицированный глутаральдегидный способ ковалентного связывания фермента с носителем, заключающийся в процессе наращивания связывающего звена между ферментом и анионитом при обработке рядом органических реагентов [7]. Согласно мнению И.В. Березина, А.А. Клёсова, по сравнению с иммобилизацией ферментов, иммобилизация клеток микроорганизмов имеет ряд преимуществ. При использовании иммобилизованных клеток отпадает необходимость выделения, очистки и иммобилизации ферментов – стадий часто наиболее дорогостоящих при осуществлении промышленного процесса. Ферменты в микроорганизмах находятся в своем естественном окружении, что повышает их

термостабильность и так называемую операционную стабильность (продолжительность работы в условиях технологического процесса) [3]. Известно много примеров, когда ферменты после выделения из организма быстро теряют активность, а иногда их вообще не удается выделить в активной форме. В то же время в составе клеток микроорганизмов они сохраняют каталитические свойства достаточно долго [6].

Наиболее широко применяемыми в клинической практике являются протеолитические ферменты. Поэтому большое количество исследований посвящено получению их иммобилизованных производных. Представляют интерес иммобилизованные системы, в которых биокаталитическое действующее начало (препарат фермента трипсина) включено в матрицу макропористого криогеля поливинилового спирта (ПВС) в составе частиц дисперсного наполнителя, распределенных по всему объему носителя, что позволяет значительно повысить содержание фермента в иммобилизованном биокатализаторе [10]. Первый тип подобных наполнителей – препараты ферментов, сшитых с полимером в растворе бифункциональным сшивающим агентом, содержащим необходимые химические группировки. Второй тип наполнителя разработан зарубежными учеными и представляет собой поперечно-сшитые ферментные кристаллы (ПСФК), или поперечно-сшитые ферменты (ПСФ), или поперечно-сшитые ферментные агрегаты (ПСФА). Такие препараты получают обработкой бифункциональными сшивающими агентами кристаллов фермента, раствора фермента или его агрегатов соответственно [13]. Третий тип наполнителя представляет собой какой-либо мелкодисперсный носитель с присоединенным ферментом; далее частицы подобного иммобилизованного препарата могут быть включены в матрицу криогеля ПВС.

Т.Н. Шеховцовой с соавторами обобщены результаты цикла исследований, посвященных разработке ферментативных методов определения биологически активных соединений – ингибиторов, активаторов и субстратов растворимых и иммобилизованных ферментов классов оксидоредуктаз (пероксидаз, алкогольдегидрогеназ) и гидролаз (щелочных и кислых фосфатаз), выделенных из различных источников. Обсуждены предложенные авторами новые оригинальные подходы к направленному повышению чувствительности, селективности и экспрессности методов. Приведены

многочисленные примеры использования разработанных ферментативных методик в анализе широкого круга объектов [11].

Поэтому перед авторами данной работы стояла задача разработки новых универсальных и совершенствования уже существующих биоактивных материалов с прогнозируемым сроком сохранения активности с использованием фотометрического метода анализа, пролонгируемым эффектом и способностью к биодеструкции.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили композиции, содержащие в качестве основы возобновляемый природный биоразлагаемый материал полисахарид – метилцеллюлозу. Для получения пластичной пленки в композиции вводили пластификатор (глицерин). В качестве дополнительных компонентов, для придания твердости пленочному покрытию, использовали природный белковый комплекс желатина.

Способ получения композиций, подвергающихся биодеструкции, представлен в работе авторов С.С. Аванесян, Е.В. Волосовой и др. [1]. Получали 3–5%-ный раствор метилцеллюлозы внесением ее в горячую воду, выдерживали 1,5–2 часа. Затем в полученный коллоидный раствор вносили желатин (3–5%-ный раствор) и пластификатор глицерин (0,5–1% от общей массы) для придания гибкости и интенсивно перемешивали. Полученную композицию наносили на гладкую стеклянную поверхность желаемой формы толщиной и оставляли на воздухе при температуре 20–22 °С на 2–3 суток до полного высыхания [5].

Для иммобилизаций был использован фермент трипсин, представляющий собой протеиназы, гидролизующие пептидные связи, отличающиеся друг от друга по месту действия на полипептидную цепь белка. Данные протеиназы относятся к мало-специфическим протеиназам или к ферментам тотального протеолиза. Благодаря своим свойствам трипсин важен не только в процессе пищеварения, но и в уничтожении чужеродного, в том числе и атипического, белкового материала.

Для иммобилизации трипсина в структуру пленочного материала была разработана следующая методика. В приготовленный коллоидный раствор метилцеллюлозы вводили раствор фермента в воде объемом 1 мл – 10 мг кристаллического трипсина в 100 мл 0,005 М раствора HCl. Затем формовали биопленки.

Количественное определение белка проводили методом О. Warburg и W. Christian (1941) сравнением поглощения белков при 280 и 260 нм на спектрофотометре СФ-46 (ГОСТ 15150-69), ООО «Уралмеханобр» (Россия) [8].

Определение протеолитической активности трипсина основано на количественном определении тирозина в продуктах расщепления казеина. Для этого готовили 1%-ный раствор казеина в 0,05 М ацетате натрия. К 1 мл полученного раствора казеина добавляли 1,5 мл фосфатного буфера (pH = 8,0), 0,5 мл раствора трипсина (10 мг трипсина в 100 мл 0,005 М HCl). Пробу термостатировали при 37 °С в течение 20 минут. Затем вносили 3 мл 10% трихлоруксусной кислоты (ТХУ). В качестве контроля использовали

пробу, аналогичную опытной, но ТХУ добавляли предварительно (до термостатирования). Осадок отделяли фильтрованием через бумажный фильтр. Оптическую плотность замеряли в пробе против контроля в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 260 и 280 нм. Затем, исходя из оптической плотности, определяли количество тирозина в растворе и рассчитывали удельную активность фермента [2].

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ физико-химических свойств полученных пленок предполагал исследование спектров поглощения в УФ-области. Для определения удельной активности иммобилизованного фермента трипсина была разработана методика, где в качестве субстрата использовали казеин. 0,07 г пленки, содержащей 1,63 мг фермента, растворяли в 20 мл фосфатного буферного раствора pH = 8,15. Для определения активности брали аликвоту раствора пленки объемом от 0,01 до 1 мл. Удельную активность фермента трипсина определяли спектрофотометрически. Однопроцентный раствор казеина готовили растворением навески белка в 0,05 М растворе ацетата натрия. К 1 мл полученного раствора казеина добавляли 1,5 мл фосфатного буферного раствора (pH = 8,15); 0,5 мл раствора трипсина (10 мг трипсина в 100 мл 0,005 М HCl). Пробу термостатировали при температуре 37 °С в течение 20 минут. Затем вносили 3 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). В качестве контроля использовали пробу, аналогичную опытной, но ТХУ добавляли до термостатирования. Осадок отделяли фильтрованием через бумажный фильтр. Оптическую плотность в пробе измеряли против контроля в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 260 и 280 нм. По количеству тирозина в растворе рассчитывали удельную активность фермента.

Калибровочный график в координатах оптическая плотность – количество тирозина представлен на рис. 1.

Для анализа влияния количества фермента на удельную активность растворимого и иммобилизованного трипсина проводили постановку ферментативной реакции с различным содержанием фермента в исследуемых пробах (1,0·10⁻²; 2,5·10⁻² мг; 5,0·10⁻² мг; 7,5·10⁻² мг; 10·10⁻² мг) и одинаковым количеством казеина в них (1 мл 1% казеина – 0,01 г казеина). Для анализа использовали пять экспериментальных серий препарата иммобилизованного фермента трипсина (рис. 2).

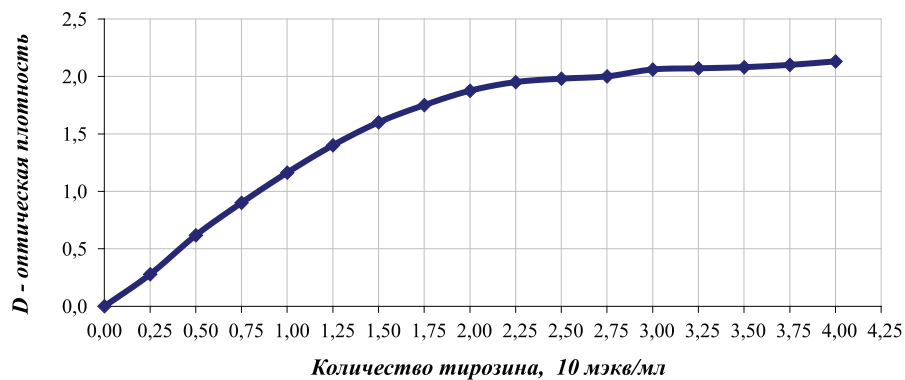


Рис. 1. Спектрофотометрическое определение тирозина в растворе

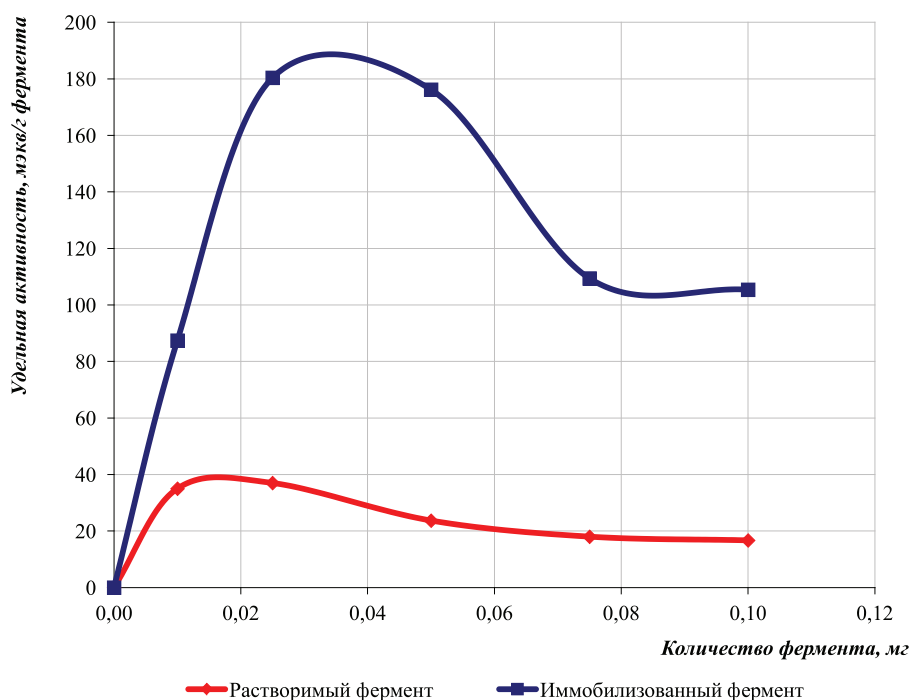


Рис. 2. Влияние количества растворимого и иммобилизованного трипсина, приходящегося на 1 мг субстрата казеина на удельную активность ферментативной реакции

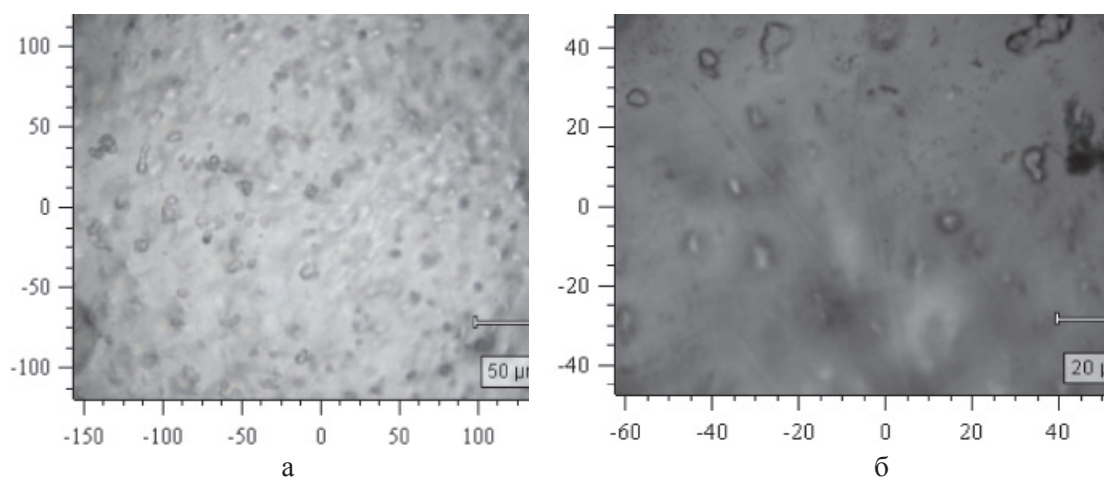


Рис. 3. Микрофотографии пленки с иммобилизованным ферментом трипсином: а – увеличение 20X; б – увеличение 50X

Анализ полученных данных позволил сделать вывод, что максимальная активность наблюдалась в том случае, когда на 1 мг субстрата казеина приходилось 0,025 мг трипсина. При этом значение удельной активности растворимого фермента составило 37 мэкв/г, иммобилизованного – 180,4 мэкв/г.

С помощью микроскопа марки RenishawInvia были сделаны микро-фотографии пленки с иммобилизованным ферментом (рис. 3, а, б).

Биоразлагаемые полимерные материалы с иммобилизованным ферментом отличаются гидрофильностью, эластичностью, прозрачностью и способностью к деградации путем гидролиза основных связей макромолекул основы при взаимодействии с физиологической средой.

Выводы

В результате проведенных исследований получены биodeградируемые полимерные материалы на основе высокомолекулярного природного полисахарида метилцеллюлозы, белкового комплекса желатина и пластификатора – глицерина. Проведена иммобилизация трипсина в пленочные материалы, спектрофотометрически определено, что трипсин, иммобилизованный в пленки, проявлял наибольшую удельную активность – 171,5 мэкв/г при pH среды – 8,15 и температуре – 37°C, время постановки ферментативной реакции – 20 минут. Определено, что оптимальное массовое соотношение компонентов в системе субстрат-фермент при постановке ферментативной реакции следующее: 1 мг казеина на 0,025 мг фермента (40:1), активностью, проявляющейся к концу эксперимента. Включение в состав биоразлагаемых полимерных материалов биологически

активных веществ, в частности различных ферментов, обладающих определенным набором свойств, делает возможным расширить спектр представленных на рынке ранозаживляющих материалов.

Список литературы

1. Аванесян С.С., Андрусенко С.Ф., Волосова Е.В., Воробьева О.В., Каданова А.А. Способ получения композиций, подвергающихся биодеструкции на основе простого эфира целлюлозы // Патент России № 2395540 С 2. 2010, Бюл. № 21.
2. Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В. Руководство к практическим занятиям по биологической химии. – М.: Изд-во Высшая школа, 1988. – С. 44–69.
3. Березин И.В., Клесов А.А., Швядас В.К. и др. Инженерная энзимология. – М.: Высшая школа, 1987. – 144 с.
4. Буряк В.П. Биополимеры – настоящее и будущее // Полимерные материалы. – 2005. – № 12 (79). – С. 22–27.
5. Воробьева О.В., Иванова А.М., Аванесян С.С., Волосова Е.В., Андрусенко С.Ф. Модификация природных полимеров для синтеза материалов подвергающихся биодegradации // Химия в интересах устойчивого развития. – 2011. – № 19. – С. 137–140.
6. Масько А.А., Морозова А.А., Лыга Л.К., Галушко Н.А. Иммобилизация трипсина на углеволокнистых носителях, различающихся текстурой, пористостью и химией поверхности // Прикладная биохимия и микробиология. – 1994. – Т. 28. № 2. – С. 211–216.
7. Ковалева Т.А., Кожокина О.М., Багно О.П., Трофимова О.Д., Беленова А.С. Иммобилизация гидролитических ферментов на анионитах // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – Т. 8. № 6. – С. 1035–1041.8. Дарбре А. Практическая химия белка: пер. с англ. – М.: Мир, 1989. – С. 22–23.
8. Устинов М.Ю., Артеменко С.Е., Овчинникова Г.П., Вихорева Г.А., Гузенко А.Н. Состав и свойства биodeградируемых полимеров // Химические волокна. – 2004. – № 3. – С. 25–28.
9. Шаскольский Б.Л. Биотехнология // Теоретический и научно-практический журнал. – 2009. – № 1. – С. 71–80.
10. Шеховцова Т.Н., Мугинова С.В., Веселова И.А. Enzymatic methods of analysis: novel approaches and applications // Известия Российской академии наук. Серия химическая. – 2007. – № 4. – С. 583.
11. Vaaden B., Carnevale K. Production and consumption of polypropylene fibers and filaments move on // The Chemical Journal. – 2005. – № 6–7. – P. 43.
12. Cao, L. Immobilised enzymes. / L. Cao, L. van Langen, R.A. Sheldon // Curr. Opinion in Biotechnol. – 2003. – Vol. 11. – № 14. – P. 387–394.