

М. Г. Холявка, В. Г. Артюхов, С. М. Сазыкина, М. А. Наквасина

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГЕТЕРОГЕННЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ ТРИПСИНА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА МАТРИЦЕ ИОНООБМЕННЫХ ВОЛОКОН

Воронежский государственный университет, Россия, 394018, Воронеж,
Университетская площадь, д. 1; e-mail: holyavka@rambler.ru

Разработана методика получения биокатализаторов на основе трипсина, иммобилизованного на матрице ионообменных волокон ВИОН КН-1 и ВИОН АН-1. Исследованы физико-химические и кинетические свойства полученных гетерогенных препаратов. По сравнению с уже существующими образцами (данные литературы) предлагаемые нами препараты иммобилизованного трипсина обладают максимумом функционирования в наиболее щелочной области, что позволяет расширить сферу их использования в медицине и косметологии.

Ключевые слова: адсорбционная иммобилизация; ионообменные волокна; ВИОН КН-1; ВИОН АН-1; трипсин.

Исследования в области получения высокостабильных гетерогенных препаратов на основе иммобилизованных ферментов, в частности трипсина, приобретают все большую актуальность [1 – 4]. Известно, что иммобилизация фермента на нерастворимом носителе позволяет решить несколько важных задач для медицины: 1) получение препаратов пролонгированного действия, благодаря стабилизации и увеличению времени полужизни фермента, 2) возможность адресной доставки вещества и решение проблемы его диффузии в организме, 3) направленное регулирование оптимумов функционирования препарата (температурный оптимум, оптимум рН). С другой стороны, иммобилизация может приводить к жесткой фиксации пространственной структуры молекулы фермента и ее конформационным изменениям, что обычно вызывает частичную или полную потерю его каталитической активности. Поэтому необходимо продолжать поиск путей направленного изменения физико-химических, кинетических и структурно-функциональных свойств ферментов и методов их стабилизации.

В качестве полимеров для иммобилизации трипсина можно использовать ионообменные волокна ВИОН — новые высокоэффективные материалы для очистки воздуха от ряда токсичных и агрессивных газов, а также аэрозолей. Основные преимущества волокон ВИОН заключаются в следующем: степень очистки ионита 98 %, скорость сорбции и регенерации в 10 – 15 раз выше, чем для зернистых материалов, высокая обменная емкость, селективность, гидролитическая устойчивость к действию кислот, щелочей, регенерирующих агентов (сохранение обменной емкости после 100 и более циклов сорбция-регенерация). Волокно ВИОН КН-1, используемое в качестве дезодорирующего и ранозаживляющего материала в ветеринарии, представляет собой слабокислотное катионнообменное хемосорбционное карбоксилсодержащее волокно с трехмерной сеткой. Этот материал характеризуется высокой скоростью сорбции, высокоразвитой

поверхностью, высокой гигроскопической устойчивостью, гидрофильностью. Волокно ВИОН КН-1 очищает и дезинфицирует рану за счет нейтрализации токсических веществ в полости раны, нормализации рН, выводит фиброгнойный экссудат, адсорбирует гнойноспецифический запах, не прилипает к раневой поверхности, не вызывает аллергии и раздражения, что благоприятно сказывается на росте грануляций и эпителизации, сокращает расход перевязочного материала и лекарственных препаратов [5]. Применение волокна эффективно при лечении гнойных ран и пролежней [6].

В связи с вышесказанным главная цель исследования состояла в разработке методики получения гетерогенных биокатализаторов медицинского назначения на основе трипсина, иммобилизованного на матрице ионообменных волокон ВИОН КН-1 и ВИОН АН-1, а также изучении их физико-химических и кинетических характеристик.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования выбран трипсин быка фирмы “MP biomedical”, субстратом для гидролиза служил бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы “Sigma-Aldrich”, носителями для иммобилизации — ионообменные волокна ВИОН КН-1 и ВИОН АН-1 (ООО “ЛИРСОТ”, Россия, рис. 1, а и б, соответственно).

Содержание белка в препаратах определяли методом Лоури [7], каталитическую активность фермента — методом Лоури с модификацией (без добавления в реакционную среду сульфата меди) [8]. Методики подготовки носителей и сорбционной иммобилизации трипсина подробно описаны в работе [9]. Значения рН растворов определяли с помощью рН-метра 211 (HANNA Instruments). Статистическую обработку полученных результатов проводили при уровне значимости 5 % с использованием *t*-критерия Стьюдента.

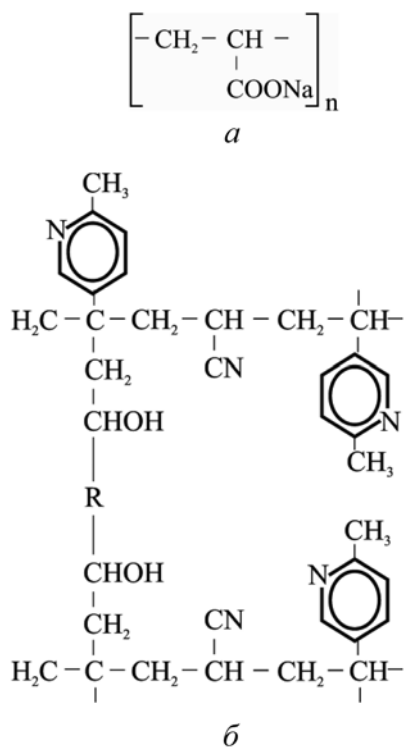


Рис. 1. Структура элементарного звена катионита VIION KH-1 (*a*) анионита VIION AH-1 (*б*).

Результаты и их обсуждение

При подборе условий для получения высокоактивных биокатализаторов на основе трипсина, иммобилизованного на матрице ионообменных волокон VIION KH-1 и VIION AH-1, в качестве иммобилизационной среды мы использовали разные буферные растворы: 0,05 М глициновый буфер в диапазоне pH 8,6 – 10,5; 0,05 М трис-глициновый буфер в диапазоне pH 8,5 – 9,0; 0,05 М боратный буфер с добавлением KCl в диапазоне pH 8,0 – 10,0; 0,1 М карбонатный буфер в диапазоне pH 9,0 – 10,4; 0,05 М трис-HCl-буфер в диапазоне pH 7,5 – 9,0.

В первой серии экспериментов мы определяли содержание сорбированного белка в иммобилизованных препаратах (рис. 2, 3) и их удельную активность

Таблица 1
Значения K_m' и V_{max}' для реакции гидролиза БСА иммобилизованным трипсином

| Условия иммобилизации | K_m' , мМ | V_{max}' , мМ/мин · мг |
|------------------------------|-----------------|--------------------------|
| ВИОН АН-1, карбонатный буфер | $6,93 \pm 0,32$ | $770 \pm 4,1$ |
| ВИОН KH-1, боратный буфер | $5,87 \pm 0,57$ | $653 \pm 6,7$ |
| ВИОН KH-1, карбонатный буфер | $1,08 \pm 0,14$ | $119 \pm 3,4$ |

(рис. 4, 5). По сочетанию этих 2 параметров для дальнейших экспериментов мы выбрали следующие образцы: трипсин, иммобилизованный на VIION KH-1 в карбонатном и боратном буфере (pH 9,0); трипсин, иммобилизованный на VIION АН-1 при использовании карбонатного буфера (pH 10,0).

Известно, что оптимум функционирования свободного трипсина составляет ~37 °С и pH 7,6 – 8,6 [10 – 15]. При его иммобилизации на VIION АН-1 в карбонатном буфере (pH 10,0) температурный оптимум соответствует диапазону 42 – 47 °С, на VIION KH-1 (при использовании как карбонатного, так и боратного буферов, pH 9,0) — 40 – 47 °С (рис. 6). Смещение температурного оптимума в сторону более высоких значений позволит использовать гетерогенные ферментные соединения при воспалении, когда температура тела пациента выше оптимума активности растворимого трипсина [16].

Оптимальный диапазон pH для трипсина, иммобилизованного на волокнах VIION, сдвигается в более щелочную сторону, по сравнению со свободным ферментом, с максимумом 9,0 – 9,5 (рис. 7). Это позволяет предположить, что при адсорбционной иммобилизации трипсина на матрице ионообменных волокон VIION происходят изменения в степени ионизации отдельных компонентов ферментативной системы. Смещение оптимума pH при иммобилизации можно объяснить различием между локальными значениями pH микроокружения активного центра и pH, измеряемым в объеме раствора.

Исследование кинетических аспектов реакций позволяет выяснить особенности поведения протеолитических ферментов при их использовании в качестве фармацевтических препаратов. Изучение фермента-

Характеристика соединений трипсина, иммобилизованного на различных носителях

Таблица 2

| Носитель для иммобилизации | Оптимум функционирования | | Источник литературы |
|--|--------------------------|-----------|---------------------|
| | t , °С | pH | |
| Поли-N-винилпирролидон | 37 – 50 | 4,0 – 9,0 | [20] |
| Хитозан из панцирей крабов с высокой вязкостью | 50 | 8,0 | [21] |
| Мезопористая пена кремнезема | 55 | 8,5 | [22] |
| Переработанные зерна глиоксаля | 50 – 60 | 8,0 | [23] |
| Поли(акрилат/N,N'-метилден-бисакриламид) гидрогель | | 4,0 – 8,0 | [24] |
| Низкомолекулярный хитозан (1 кДа) | 37 | 8,0 | [25] |
| Ионообменные волокна: | | | Собственные данные |
| ВИОН KH-1 | 40 – 47 | 9,0 – 9,5 | |
| ВИОН АН-1 | 42 – 47 | 9,0 – 9,5 | |

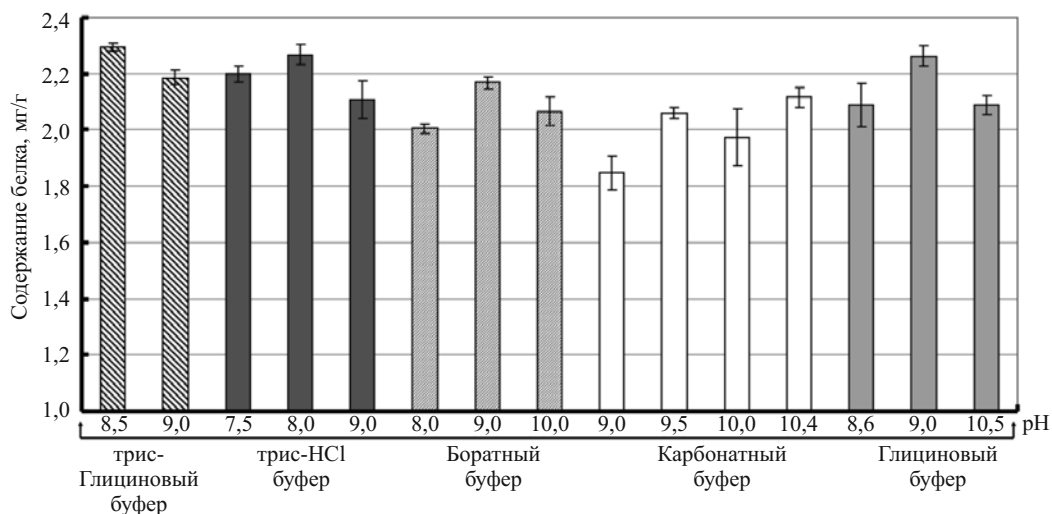


Рис. 2. Содержание белка (мг на 1 г носителя) в соединениях трипсина, иммобилизованных на ВИОН КН-1 при использовании различных буферных систем.

тивного катализа иммобилизованными соединениями необходимо также для выявления механизмов действия мембраносвязанных ферментов и полиферментных систем, сконструированных по модульному принципу [17].

К иммобилизованным образцам применимы основные положения теории гетерогенного катализа. Иммобилизация ферментов, как правило, приводит к изменению кинетических параметров реакций, поэтому их обозначают как кажущиеся (K_m' , V_{max}' и т.д.). Для большинства иммобилизованных ферментов K_m' увеличивается, а V_{max}' — уменьшается [18, 19].

Нами установлено, что кинетика реакции, катализируемой свободным и иммобилизованным на волокнах ВИОН трипсином, подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен. С помощью преобразования кривых зависимости V от S в координатах Лайнуивера-Берка, Хейнса и Иди-Хофсти определены K_m' и V_{max}' реакции

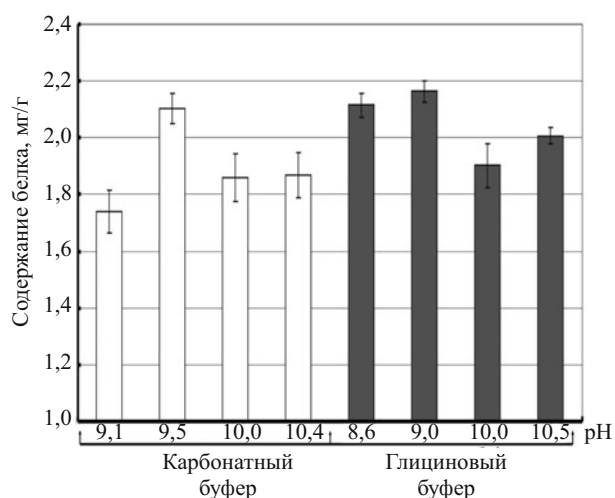


Рис. 3. Содержание белка (мг на 1 г носителя) в соединениях трипсина, иммобилизованных на ВИОН АН-1 при использовании различных буферных систем.

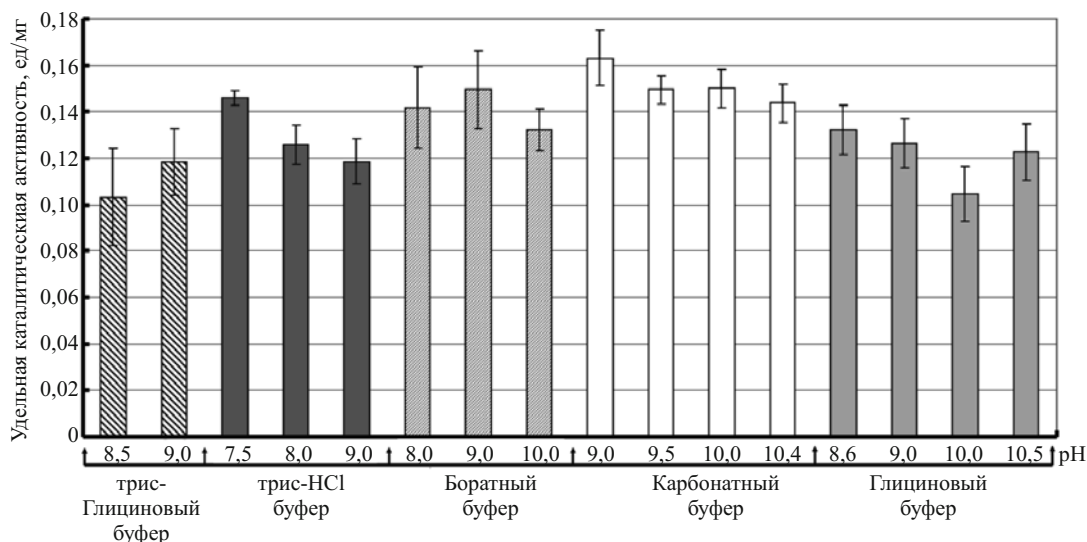


Рис. 4. Удельная каталитическая активность (ед. на мг белка в образце) соединений трипсина, иммобилизованных на ВИОН КН-1 при использовании различных буферных систем.

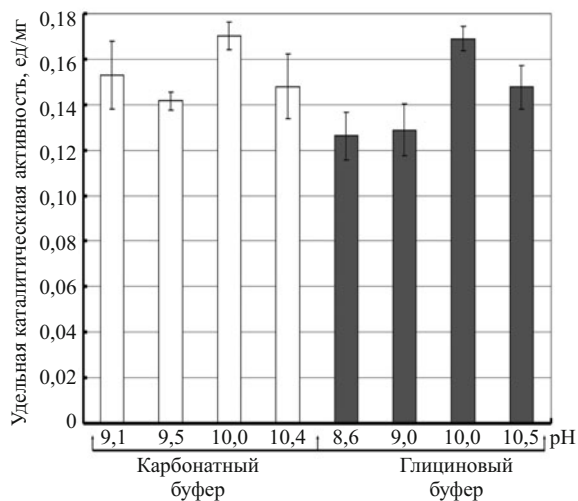


Рис. 5. Удельная каталитическая активность (ед. на мг белка в образце) соединений трипсина, иммобилизованных на ВИОН АН-1 при использовании различных буферных систем.

гидролиза БСА изучаемыми ферментными препаратами (табл. 1). Самым высоким сродством к субстрату обладал ферментный препарат, иммобилизованный на ВИОН КН-1 при использовании карбонатного буфера (рН 9,0), а наибольшее значение максимальной скорости реакции было характерно для трипсина, иммобилизованного на ВИОН АН-1, также при использовании карбонатного буфера, но с рН 10,0.

Если сравнить предлагаемые нами соединения иммобилизованного трипсина с уже разработанными образцами (табл. 2), можно заключить, что они обладают максимумом функционирования в наиболее щелочной области, что позволяет использовать их с подщелачивающими среду средствами, направленными на подавление размножения паразитических грибков, вирусов и бактерий. Известно, что щелочной показатель рН 8,0 – 8,5 способствует исчезновению грибка и пигментных пятен с кожи, применение щелочного жидко-

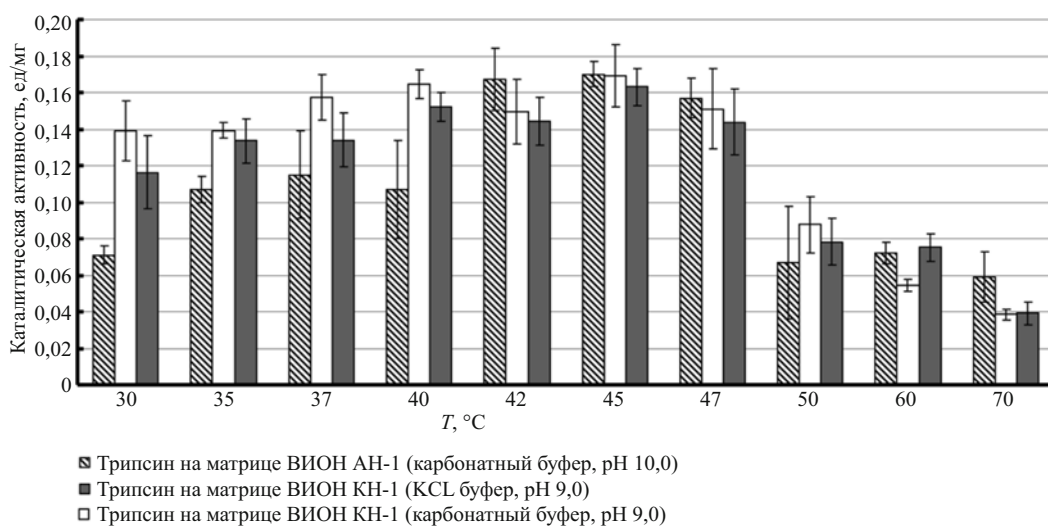


Рис. 6. Зависимость каталитической активности иммобилизованных препаратов трипсина от температуры.

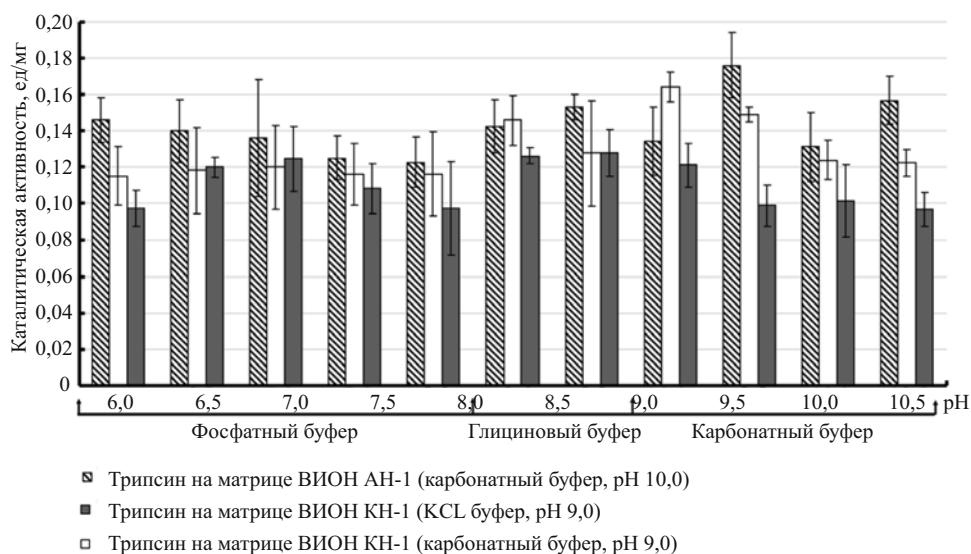


Рис. 7. Зависимость каталитической активности иммобилизованных препаратов трипсина от рН среды.

го мыла с уровнем pH 9,5 – 10 препятствует появлению пролежней. Все это расширяет сферу использования предлагаемых нами соединений в медицине и косметологии.

Таким образом, нами разработана методика получения гетерогенных биокатализаторов на основе трипсина, иммобилизованного на матрице ионообменных волокон ВИОН КН-1 и ВИОН АН-1, которые в перспективе могут применяться в медицине и косметологии. Изучены физико-химические и кинетические свойства гетерогенных ферментных препаратов, что в дальнейшем позволяет подобрать наиболее оптимальные условия для их функционирования и способствует более рациональному использованию при терапии ран и ожогов.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания вузам в сфере научной деятельности на 2014 – 2016 годы. Проект № 1090.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Ковалева, М. Г. Холявка, В. Г. Артюхов, *Биотехнология*, № 1, 43 – 63 (2012).
2. А. С. Шурина, Е. И. Кулиш, С. В. Колесов, В. П. Захаров, *Хим.-фарм. журн.*, 49(3), 43 – 45 (2015); *Pharm. Chem. J.*, 49(3), 196 – 198 (2015).
3. А. А. Новожилов, Г. Ю. Кнорринг, А. Л. Сухоруков и др., *Полиферментные препараты в гнойной хирургии. Методические рекомендации*, Москва (2005).
4. А. В. Бледнов, *Новости хирургии*, 14(1), 9 – 19 (2006).
5. Д. Р. Валиева, *Ткань ВИОН КН-1 для лечения гнойных ран у кошек*; <http://www.vetportal.ru/>
6. В. Л. Белобородов, Т. А. Сайфуллин, Д. В. Белобородов и др., *Ранозаживляющий материал*, Патент RU 2229311: А61L15 / 00, А61L15 / 16, А61L15 / 22
7. О. О. Логинова, М. Г. Холявка, В. Г. Артюхов и др., *Вестник ВГУ. Сер. "Химия. Биология. Фармация"*, 2, 116 – 119 (2013).
8. О. Folin, V. Ciocalteu, *J. Biol. Chem.*, 73, 627 (1929).
9. Т. А. Ковалева, М. Г. Холявка, А. С. Таха, *Биотехнология*, 3, 80 – 87 (2007).
10. В. И. Кулакова, В. А. Насонова, В. С. Савельева, *Системная энзимотерапия. Опыт и перспективы*, Интер-Медика, Санкт-Петербург (2004).
11. F. R. Melo, D. J. Rigden, O. L. Franco, et al., *Proteins Struct. Funct. Genet.*, 48, 311 – 319 (2002).
12. J. Guerrero-Beltran, Y. Estrada-Giron, B. Swanson, et al., *Food Chem.*, 116, 676 – 679 (2009).
13. R. F. Qi, Z. X. Liu, S. Q. Xu, et al., *FEBS J.*, 277, 224 – 232 (2010).
14. E. F. Fang, J. H. Wong, T. B. Ng, *J. Biosci. Bioeng.*, 109, 211 – 217 (2010).
15. R. K. Wati, T. Theppakorn, S. Benjakul, et al., *J. Food Sci.*, 75, 223 – 228 (2010).
16. S. E. Huether, K. L. McCance, *Study Guide for Understanding Pathophysiology*, Elsevier (2012).
17. Г. И. Квеситадзе, *Грибные и бактериальные амилазы*, Мецниереба, Тбилиси (1984).
18. С. Д. Варфоломеев, К. Г. Гуревич, *Биокинетика*, ФАИР-ПРЕСС, Москва (1999).
19. Т. Келети, *Основы ферментативной кинетики*, Мир, Москва (1990).
20. И. И. Романовская, *Доклады национальной академии наук Украины*, 9, 182 – 187 (2009).
21. M. Kamburov and I. Lalov, *Preparation of Chitosan Beads for Trypsin Immobilization*, Pharmaceutical Biotechnology, 50 Years Roumen Tsanev Institute of Molecular Biology, 06 – 07 October, Sofia (2011).
22. Zhou Cheng, Jiang Bo, Sheng Zecui, et al., *Korean J. Chem. Eng.*, 28(3), 853 – 859 (2011).
23. C. Rocha, M. P. Goncalves, J. F. Teixeira, et al., *Process Biochem.*, 46, 505 – 511 (2011).
24. Lili Gai and Daocheng Wu, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 158(3), 747 – 760 (2009).
25. А. И. Сливкин, А. С. Беленова, М. Г. Холявка и др., *Сорбц. и хроматографические процессы*, 13(1), 53 – 59 (2013).

Поступила 21.02.15

PHYSICAL, CHEMICAL, AND KINETIC PROPERTIES OF HETEROGENEOUS BIOCATALYSTS BASED ON TRYPSIN IMMOBILIZED ON ION-EXCHANGE FIBER MATRIX

M. G. Holyavka*, V. G. Artyukhov, S. M. Sazykina, and M. A. Nakvasina

Voronezh State University, Voronezh, 394018 Russia

* e-mail: holyavka@rambler.ru

A method for obtaining biocatalysts on the basis of trypsin immobilized on a matrix of the VION KN-1 and VION AN-1 ion-exchange fibers has been developed. The physical, chemical, and kinetic properties of obtained heterogeneous preparations were investigated. In comparison to existing samples (published data), the fiber-immobilized trypsin preparations are more functional in the most alkaline media, which allows expansion of the sphere of their use in medicine and cosmeceutics.

Keywords: adsorption immobilization; ion-exchange fibers; VION KN-1; VION AN-1; trypsin.