

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И КИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БРОМЕЛИНА В СВОБОДНОМ И ИММОБИЛИЗОВАННОМ СОСТОЯНИИ

Королева В.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г.

Воронежский государственный университет

Университетская пл., 1, г. Воронеж, 394018, РФ; e-mail: koroleva_victoria@bk.ru

Поступила в редакцию: 25.07.2019

Аннотация. Бромелин обладает широким спектром терапевтической эффективности: демонстрирует *in vitro* и *in vivo* противовоспалительную, антитромботическую и фибринолитическую виды активности. Энзим модулирует функции молекул адгезии в крови и эндотелиальных клетках, а также регулирует и активирует различные иммунные клетки и продукцию цитокинов. Фермент используется в качестве альтернативного или дополнительного лекарственного средства для глюкокортикоидов, нестероидных противовоспалительных средств и иммуномодулирующих агентов. В представленной работе изучены физико-химические и кинетические свойства бромелина, свободного и иммобилизованного на матрице хитозана. Установлено, что диапазон температур для функционирования растворимого и сорбированного бромелина находится в пределах от 50 до 70°C; оптимальное значение pH для функционирования нативного и иммобилизованного фермента составляет 7,5; максимальные значения скорости ферментативного катализа для свободного и иммобилизованного препарата наблюдаются при концентрации азоказеина 0,4 мМ; максимальная скорость реакции для бромелина, иммобилизованного на среднемoleкулярном хитозане, снижается в 2,2 раза, а для сорбированного на высокомолекулярном хитозане – в 1,7 раза. Иммобилизация бромелина на матрице хитозана не приводит к сдвигу температурного оптимума, но увеличивает термостабильность фермента.

Ключевые слова: бромелин, иммобилизация, физико-химические свойства ферментов, хитозан.

Бромелайн или бромелин получают путем экстракции из ананаса (плоды и стебли). Препараты бромелина из плодов (КФ 3.4.22.33) отличаются от образцов бромелина из стеблей (КФ 3.4.22.32), они содержат различные ферментные композиции, такие как тиол-эндопептидазы и другие, еще не полностью охарактеризованные компоненты, такие как фосфатазы, глюкозидазы, пероксидазы, целлюлазы, гликопротеины и углеводы [1]. Бромелайн содержит сложную смесь протеазных и нестеаровых компонентов. Бромелин из стеблей содержит ряд цистеиновых протеиназ. Бромелин из плодов – гликопротеиновая протеиназа, присутствующая в ананасовом соке, которая гидролизует внутренние полипептидные связи широкого спектра белков [2, 3].

Для природного бромелаина ферментативная активность детектируется в пределах pH 5,5-8,0 [4-6]. Надзира К.З. и сотрудники сообщили, что бромелаиновая активность стабильна при pH 3,0-6,5 [3]. Амид А. и сотрудники отметили, что очищенный рекомбинантный бромелайн обладает оптимальной активностью при pH 4,6 и 45°C. Корзо С.А. и его коллеги заявили, что мало исследований было выполнено для определения оптимальной температуры для бромелиновой активности, но работы показали, что оптимальная температура находится между 30 и 60 °C и зависит от pH среды [3, 7].

Бромелайн способен гидролизировать сложные эфиры и амиды, такие как этиловый эфир N-бензоил-L-аргинина и N-бензоил-L-аргинин амид. Хотя реакция не является специфичной, бромелин расщепляет гликоль, анаил и лейцильные связи. Препарат готовят из охлажденного ананасового сока путем центрифугирования, ультрафильтрации и лиофилизации. Этот процесс дает желтоватый порошок, активность фермента в котором определяется с помощью различных субстратов, таких как казеин, желатин или хромогенные трипептиды [8, 9]. При температуре 21 °C протеолитическая активность растворенного бромелина быстро снижается благодаря автолизу. Бромелин в концентрированных формах (более 50 мг/мл) – это стабильный препарат в течение недели при комнатной температуре с минимальной инактивацией [7].

Бромелин обладает широким спектром терапевтической эффективности: демонстрирует *in vitro* и *in vivo* противовоспалительную, антитромботическую и фибринолитическую виды активности. Энзим модулирует функции молекул адгезии в крови и эндотелиальных клетках, а также регулирует и активирует различные иммунные клетки и продукцию цитокинов. Фермент используется в качестве альтернативного или дополнительного лекарственного средства для глюкокортикоидов, нестероидных противовоспалительных средств и иммуномодулирующих агентов. Его низкая токсичность делает энзим подходящим инструментом для борьбы с хроническими воспалительными заболеваниями [7].

Исследования в области получения высокостабильных гетерогенных биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов и клеток приобретают все большую актуальность. Общеизвестно, что при промышленном масштабировании каталитических процессов гетерогенный режим их проведения является экономически более выгодным по сравнению с гомогенными технологиями, так как при этом значительно упрощается и удешевляется весь производственный цикл. Очевидно, что носители для гетерогенных биокатализаторов должны быть доступными, обладать хорошими эксплуатационными свойствами и высокой адсорбционной емкостью по отношению к каталитически активному компоненту [9].

Хитозан и его производные обладают превосходными свойствами в качестве носителей для различных ферментов, которые могут быть применены в области медицины. В настоящее время доставка лекарств с помощью хитозана является актуальной проблемой благодаря различным характеристикам биополимера: химической модификации, биodeградации, воздействию на различные ткани и органы тела, мукоадгезии, ассоциации хитозана с неорганическими соединениями.

Хитозан является биосовместимым и не вызывает побочных реакций при контакте с клетками человека. Олигомеры хитозана могут активировать макрофаги и стимулировать синтез гиалуроновой кислоты. Хитозан обеспечивает строительные блоки для реконструкции компонентов внеклеточного матрикса. С другой стороны, хитозан «распознает» опухолевые клетки, и, следовательно, он может обеспечить адресную доставку лекарств к мишени [10].

Хитозан безопасен для организма человека, поэтому медицинские и фармацевтические препараты на его основе могут быть разработаны совместными усилиями специалистов в различных областях [11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования был выбран бромелин фирмы «Sigma». Носителями для иммобилизации биокатализатора являлись кислоторастворимые высокомолекулярный ($M_r = 350$ кДа, степень деацетилирования – 94,85%) и средномолекулярный ($M_r = 200$ кДа, СД = 82%) хитозаны, синтезированные ЗАО «Биопрогресс».

Для адсорбционной иммобилизации бромелина на высокомолекулярном и средномолекулярном хитозанах использовали 0,05 М трис-глициновый буфер со значениями pH 8,5 и 9,0 соответственно [12]. Концентрацию белка в системе энзим-носитель определяли методом Лоури. Каталитическую активность ферментов измеряли спектрофотометрически по количеству окрашенного продукта реакции в результате расщепления азоказеина фирмы «Sigma» [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Важными характеристиками энзимов, определяющими их каталитическую активность, являются оптимальные диапазоны температуры, pH и концентрации субстрата.

Ферментативная активность нативного и иммобилизованного на кислоторастворимом хитозане бромелина в зависимости от температуры представлена на рисунке 1. В ходе наших экспериментов было установлено, что для растворимого бромелина диапазон рабочих температур находится между 50 и 70°C, а для иммобилизованного на кислоторастворимом хитозане – от 40 до 70 °C. Однако при 80 °C свободный энзим был термически инактивирован на 76%, в то время как сорбированный на средномолекулярном хитозане фермент сохраняет порядка 69% активности от максимального значения, а иммобилизованный на высокомолекулярном – 79%. Таким образом, иммобилизация бромелина на матрице хитозана не приводит к сдвигу температурного оптимума, но увеличивает термостабильность фермента. Можно сделать предположение о том, что матрица хитозана предотвращает преждевременную денатурацию белка.

Результаты наших исследований каталитической активности ферментных препаратов от кислотности среды показали, что максимумы активности нативного и сорбированного на средномолекулярном и высокомолекулярном хитозанах бромелина наблюдаются при значении pH, равном 7,5. При pH 9,0 растворимый бромелин полностью инактивирован, в то время как иммобилизованный на средномолекулярном и высокомолекулярном хитозанах энзим активен на 53 и 63% соответственно (рис. 2).

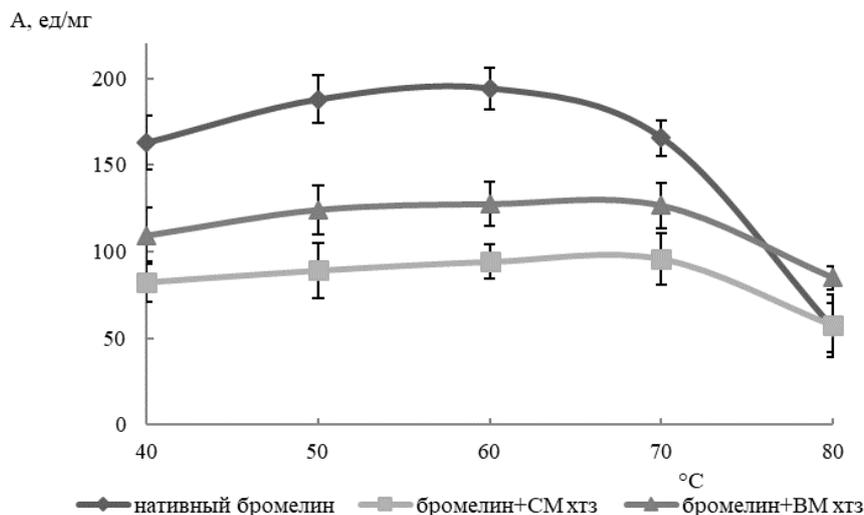


Рисунок 1. Зависимость каталитической активности свободного и иммобилизованного на хитозане бромелина от температуры инкубации

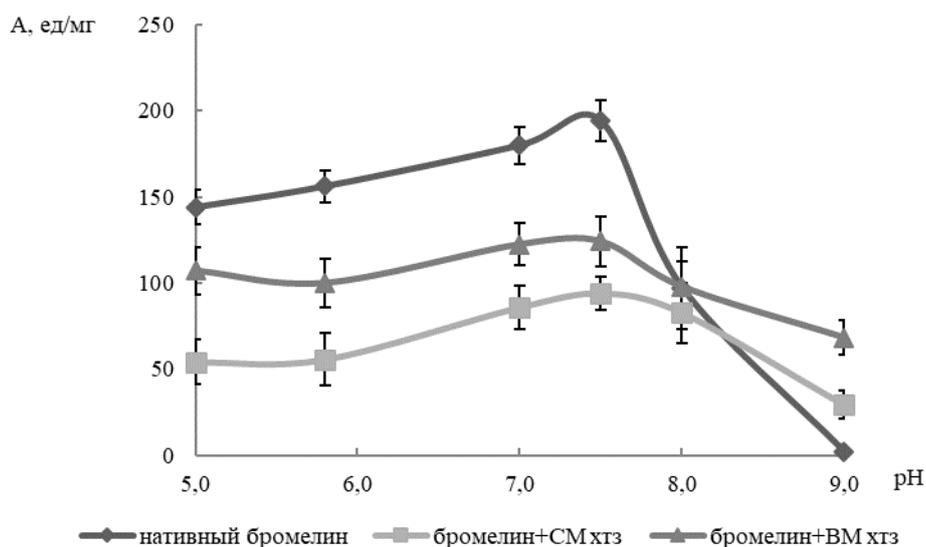


Рисунок 2. Зависимость каталитической активности свободного и иммобилизованного на хитозане бромелина от pH среды

Исследования по определению оптимальной концентрации субстрата проводились нами в диапазоне концентраций азоказеина от 0,0001 до 0,1 мМ. Результаты зависимости ферментативной активности свободного и сорбированного на матрице хитозана бромелина представлены на рис. 3. Максимальные значения скорости ферментативной реакции для нативного и иммобилизованных на матрице двух видов хитозана препаратов наблюдаются при концентрации субстрата, равной 0,04 мМ, при дальнейшем увеличении концентрации субстрата до 0,1 мМ не происходит статистически достоверных изменений в скорости ферментативного катализа.

Главной характеристикой энзима является степень его сродства к субстрату. Иммобилизация биокатализатора на нерастворимых носителях, как правило, способствует изменению кинетических параметров ферментативного катализа. Основываясь на результатах предыдущих экспериментов, нами были определены значения константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции гидролиза азоказеина свободным и иммобилизованным бромелином, которые представлены в таблице 1. Иммобилизация бромелина на нерастворимом носителе привела к снижению значений V_{\max} и увеличению степени сродства фермента к субстрату (уменьшение величины K_m).

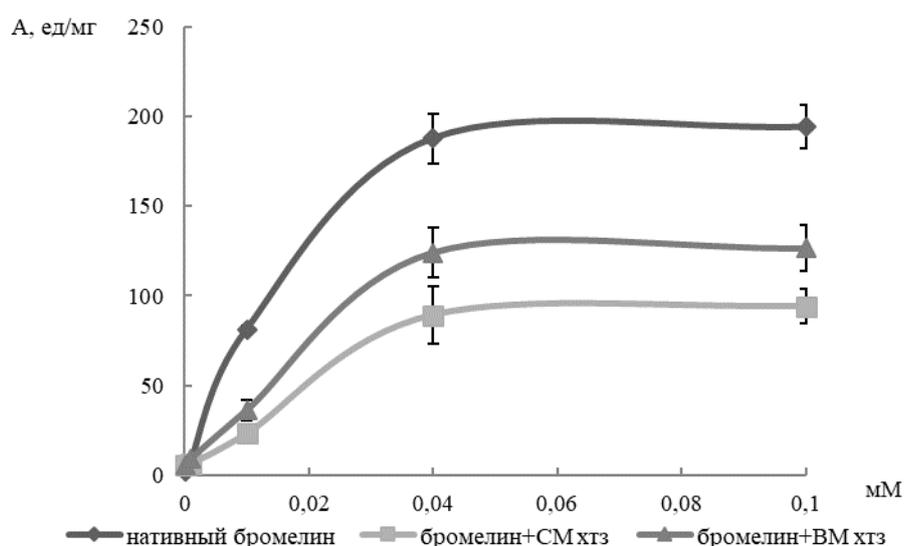


Рисунок 3. Зависимости каталитической активности свободного и иммобилизованного на хитозане бромелина от концентрации субстрата

Таблица 1. Кинетические свойства нативного и иммобилизованного бромелина

Препарат	V_{\max} , мкМ/(мг·мин)	K_m , мМ
Нативный бромелин	238 ± 2	$0,019 \pm 0,003$
Бромелин + среднемолекулярный хитозан	110 ± 1	$0,010 \pm 0,002$
Бромелин + высокомолекулярный хитозан	144 ± 2	$0,010 \pm 0,001$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованы физико-химические и кинетические свойства нативного и иммобилизованного на матрице хитозана бромелина. Установлены оптимальные условия каталитической реакции растворимого и иммобилизованного на матрице хитозана бромелина. Полученные результаты вносят определенный вклад в совокупность знаний для выбора оптимальных условий применения иммобилизованных образцов бромелина в биотехнологических целях.

Список литературы / References:

1. Amini A., Masoumi-Moghaddam S., Morris D.L. *Utility of bromelain and N-acetylcysteine in treatment of peritoneal dissemination of gastrointestinal mucin-producing malignancies*. Springer, 2016, 246 p.
2. Homaei A.A., Sajedi R.H., Sariri R., Seyfzadeh S., Stevanato R. Cysteine enhances activity and stability of immobilized papain. *Amino Acids*, 2010, vol. 38, pp. 937-942. DOI: 10.1007/s00726-009-0302-3
3. Martins B.C., Rescolino R., Coelho D.F., Espindola F.S., Zanchetta B., Tambourgi E.B., Silveira E. Studies of stability and characterization this enzyme bromelain in pineapple (*Ananas comosus*). *BMC Proceedings*, 2014, vol. 8, p. 137. DOI: 10.1186/1753-6561-8-S4-P137
4. Глик Б., Пастернак Д. *Молекулярная биотехнология. Принципы и применение*. М.: Мир, 2002, 589 с. [Glik B., Pasternak D. *Molecular biotechnology. Principles and application*. М.: Mir, 2002, 589 p. (In Russ.)]
5. Келети Т. *Основы ферментативной кинетики*. М.: Мир, 1990, 350 с. [Keleti T. *Basics of enzymatic kinetics*. М.: Mir, 1990, 350 p. (In Russ.)]
6. Ленинджер А. *Основы биохимии. Т. 1*. М.: Мир, 1985, 365 с. [Leninzher A. *Basics of biochemistry. Vol. 1*. М.: Mir, 1985, 365 p. (In Russ.)]
7. Husain S.S., Lowe G. The amino acid sequence around the active-site cysteine and histidine residues, and the buried cysteine residue in ficin. *Biochem. J*, 1970, vol. 117, pp. 333-340.
8. Devaraj K.B., Kumar P.R., Prakash V. Purification, characterization, and solvent-induced thermal stabilization of ficin from *Ficus carica*. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, vol. 56, pp. 11417-11423. DOI: 10.1021/jf802205a.
9. Скрыбин К.Г. *Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение*. М.: Наука, 2002, 368 с. [Skryabin K.G. *Chitin and chitosan. Preparation, properties and application*. М.: Nauka, 2002, 368 p. (In Russ.)]
10. Magnin D., Lefebvre J., Chornet E., Dumitriu S. Physicochemical and structural characterization of a polyionic matrix of interest in biotechnology, in the pharmaceutical and biomedical fields. *Carbohydrate Polymers*, 2004, vol. 55, pp. 437-453. DOI: 10.1016/j.carbpol.2003.11.013.
11. Kumar M.N.V.R., Muzzarelli R.A.A., Muzzarelli C., Sashiwa H., Domb A.J., Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem. Rev.*, 2004, vol. 104, pp. 6017-6084. DOI: 10.4236/ajac.2014.510077.
12. Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Королева В.А. *Способ получения гетерогенного препарата различной дисперсности на основе бромелайна и хитозана*. Патент на изобретение № 2677232, 2019. [Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Koroleva V.A. *The method of obtaining a heterogeneous preparation of different dispersion based on bromelain and chitosan*. Patent for invention № 2677232, 2019. (In Russ.)]
13. Королева В.А., Холявка М.Г., Сазыкина С.М., Ольшаникова С.С., Артюхов В.Г. Исследование сорбционной емкости кислоторастворимых хитозанов по отношению к бычьему сывороточному альбумину. *Вестник ВГУ. Серия «Химия. Биология. Фармация»*, 2015, № 4, с. 85-89. [Koroleva V.A., Holyavka M.G., Sazykina S.M., Olshannikova S.S., Artyukhov V.G. Study of the sorption capacity of acid-soluble chitosans toward bovine serum albumin. *Vestnik VGU. Seriya «Himiya. Biologiya. Farmaciya»*, 2015, no. 4, pp. 85-89. (In Russ.)]

**INVESTIGATION OF THE PHYSICO-CHEMICAL AND KINETIC PROPERTIES OF BROMELAIN
IN THE FREE AND IMMOBILIZED STATE****Koroleva V.A., Holyavka M.G., Artukhov V.G.**

Voronezh state university

Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394018, Russia; e-mail: koroleva_victoria@bk.ru

Abstract. Bromelain has a wide range of therapeutic efficacy: it demonstrates *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory, antithrombotic and fibrinolytic activities. The enzyme modulates the functions of adhesion molecules in the blood and endothelial cells, as well as regulates and activates various immune cells and cytokine production. The enzyme is used as an alternative or additional preparation for glucocorticoids, non-steroidal antirheumatic preparations and immunomodulating agents. In the present work, the physico-chemical and kinetic properties of bromelain in free and immobilized on the chitosan matrix states were studied. It has been established that the temperature range for the functioning of soluble and sorbed bromelain ranges from 50 to 70°C; the optimum pH for the functioning of the native and immobilized enzyme is 7.5; the maximum rate of enzymatic catalysis of free and immobilized preparations is observed at azocasein concentrations of 0.4 mM; the maximum reaction rate for bromelain immobilized on medium molecular chitosan decreases 2.2 times, and for enzyme sorbed on high molecular chitosan it decreases 1.7 times. Immobilization of bromelain on the chitosan matrix does not lead to a shift in the temperature optimum, but increases the thermal stability of the enzyme.

Key words: *bromelain, immobilization, physico-chemical properties of enzymes, chitosan.*