

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФИЦИНА И ПАПАИНА, СВОБОДНЫХ И ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА МАТРИЦЕ ХИТОЗАНА

Королева В.А., Холявка М.Г., Панкова С.М., Ольшанникова С.С.,
Ермолаева В.В., Сакибаев Ф.А., Шеломенцева Т.Н., Артюхов В.Г.

Воронежский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. Исследованы физико-химические и кинетические свойства цистеиновых протеиназ – фицина и папаина. Выявлено, что фицин высоко активен в диапазоне температур от 37 до 60 °С. При 70 °С свободный фицин полностью инактивирован, сорбированный на хитозане энзим сохраняет порядка 50 % активности. Диапазон рабочих температур растворимого и иммобилизованного папаина находится между 50 и 70 °С. При 80 °С нативный фермент больше подвержен термической инактивации, чем энзим, сорбированный на хитозане. Показано, что иммобилизация фицина и папаина на матрицах хитозана способствует расширению их оптимума pH в щелочную область. Максимальная скорость ферментативной реакции нативных и иммобилизованных цистеиновых протеаз наблюдается при концентрации субстрата, равной 0,04 мМ. Сорбция биокатализаторов привела к снижению скорости ферментативного катализа, а также к изменению степени сродства энзимов к субстрату.

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

Фицин (КФ 3.4.22.3) – протеолитический фермент, присутствует в латексе фиговых деревьев, относится к цистеиновым протеазам, содержит остаток цистеина в активном центре. До настоящего времени большая часть работ была проведена на ферменте, полученном из латекса *Ficus glabrata*, меньшее количество исследований – на фицине, выделенном из латекса видов *Ficus carica*. Известно, что фицин из обоих видов встречается в нескольких формах, что подтверждается методами ионообменной хроматографии. Englund [et al.] в 1968 г. изучили фицин среди нескольких активных компонентов латекса *F. glabrata* и показали, что он представляет собой белок с единственной полипептидной цепью [1].

Папаин (КФ 3.4.4.10) – растительная цистеиновая протеаза, осуществляющая гидролиз белков до аминокислот. В значительных количествах содержится в дынном дереве – папайе (*Carica papaya*) [2].

Фицин и папаин обладают широкой субстратной специфичностью, катализируют реакции гидролиза эфиров и тиоэфиров, амидов и пептидов. Эти цистеиновые протеиназы растений могут быть использованы как альтернативные или взаимодополняющие препараты при лечении глюкокортикоидами, нестероидными противовоспалительными средствами и иммуномодулирующими агентами. Низкая токсичность протеолитических энзимов обеспечивает их безопасное использование в качестве средств для лечения воспалительных заболеваний [3].

После иммобилизации на нерастворимых носителях ферменты приобретают ряд преимуществ: увеличивается время их полужизни, повышается стабильность к агрессивным факторам окружающей среды [4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были выбраны фицин и папаин фирмы «Sigma». Носителями для иммобилизации биокатализаторов 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 фицина на высокомолекулярном и средномолекулярном хитозанах использовали 0,05 М глициновый буфер со значением pH 8,6 и 10,0 соответственно, для сорбции папаина – 0,05 М глициновый буфер (pH 9,0). 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» [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

Каталитическая активность свободного и иммобилизованного на матрицах хитозана фицина в зависимости от температуры представлена на рисунке 1. Из литературных данных известно, что температурный оптимум нативного фицина – от 40 до 60 °С [1]. В ходе наших экспериментов было установлено, что для фицина, растворимого и иммобилизованного, оптимальный диапазон рабочих температур находится между 37 и 60 °С.

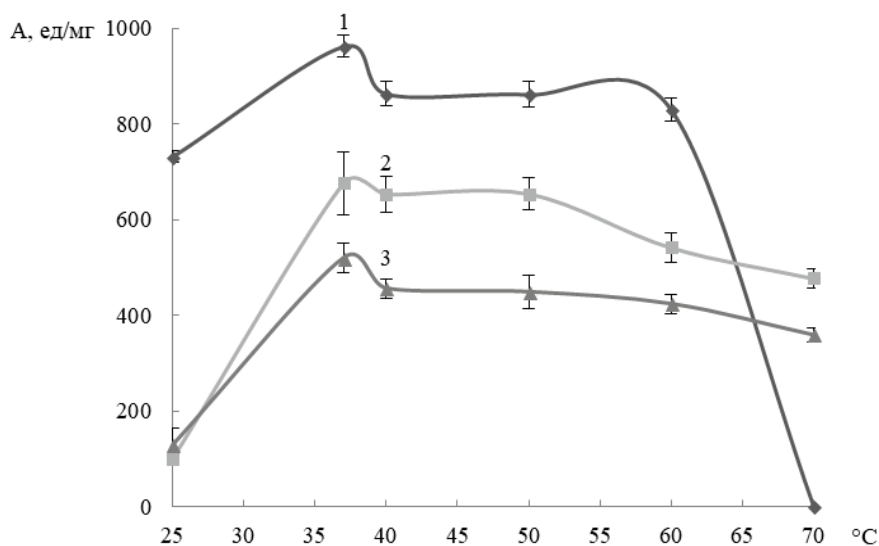


Рисунок 1. Зависимость каталитической активности (А) фицина от температуры: 1 – нативный фицин, 2 – фицин, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане, 3 – фицин, иммобилизованный на низкомолекулярном хитозане

При 70 °С свободный фермент инактивирован полностью, в то время как сорбированный на низкомолекулярном и высокомолекулярном хитозанах фермент сохраняет порядка 50 % активности. Ввиду сказанного выше, можно сделать вывод о том, что иммобилизация фицина на матрицах хитозана не привела к сдвигу оптимального диапазона температур, но увеличила его термостабильность. (рис. 1).

Свободный фицин активен при значениях рН от 6,5 до 9,0 [1]. Результаты наших исследований показывают, что колоколообразные кривые зависимости удельной активности фермента от значения рН среды совпадают по форме и значению: максимум активности нативного и сорбированного фермента наблюдается при значении рН, равном 7,5 (рис. 2). Выявлена тенденция к некоторому расширению оптимального диапазона рН в щелочную среду: при рН = 9,0 нативный фицин практически полностью теряет свою каталитическую способность, что нельзя сказать об ферменте, сорбированном на матрицах низкомолекулярного и высокомолекулярного хитозанов. Изменение оптимального значения рН при иммобилизации фицина на матрице кислоторастворимого хитозана можно объяснить различием между локальными значениями рН микроокружения активного центра в иммобилизованном состоянии и в растворе фермента.

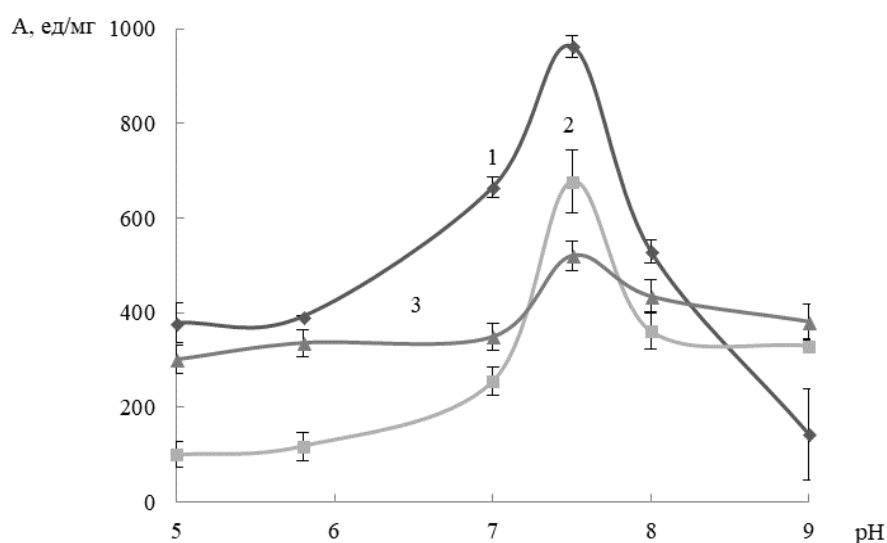


Рисунок 2. Зависимость каталитической активности (А) фицина от рН среды: 1 – нативный фицин, 2 – фицин, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане, 3 – фицин, иммобилизованный на низкомолекулярном хитозане

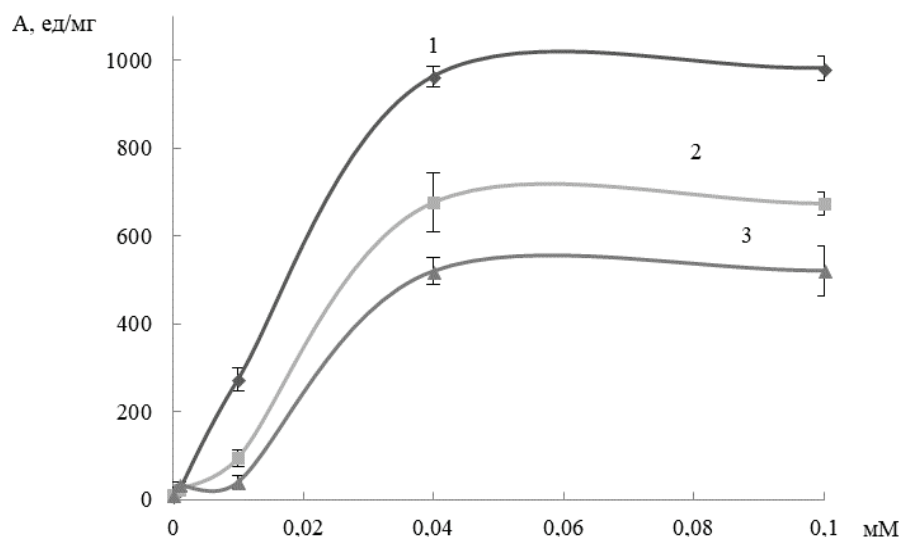


Рисунок 3. Зависимость каталитической активности (А) фицина от концентрации субстрата: 1 – нативный фицин, 2 – фицин, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане, 3 – фицин, иммобилизованный на среднемолекулярном хитозане

Эксперименты по определению оптимальной концентрации субстрата проводились в диапазоне его концентрации от 0,0001 до 0,1 мМ. Результаты измерения зависимости каталитической активности свободного и сорбированного на матрицах хитозана фицина представлены на рисунке 3. Максимальная скорость ферментативной реакции нативного и иммобилизованных препаратов наблюдается при концентрации субстрата, равной 0,04 мМ, при дальнейшем увеличении концентрации азоказеина до 0,1 мМ не происходит статистически достоверных изменений в скорости ферментативного катализа.

Иммобилизация энзима на нерастворимых носителях, как правило, способствует изменению кинетических параметров ферментативного катализа. Нами были определены константа Михаэлиса и максимальная скорость реакции, величина которых представлены в таблице 1. Иммобилизация фицина на хитозане приводит к снижению значения V_{max} и некоторому уменьшению степени сродства фермента к субстрату.

В следующей серии экспериментов мы исследовали физико-химические и кинетические свойства папаина. Ферментативная способность папаина, нативного и адсорбированного на матрице хитозана, в зависимости от температуры представлена на рисунке 4. Установлено, что для растворимого и иммобилизованного папаина диапазон рабочих температур находится между 50 и 70 °С. При 80 °С свободный энзим термически инактивирован на 32 %, в то время как сорбированный на среднемолекулярном хитозане фермент сохраняет порядка 80 % активности от максимального значения. Комплексный препарат папаина и высокомолекулярного хитозана проявляет активность независимо от температуры инкубации в диапазоне температур 50-80 °С. Таким образом, иммобилизация папаина на матрице хитозана не приводит к сдвигу температурного оптимума, но при этом увеличивает термостабильность фермента. Можно сделать предположение о том, что матрица хитозана предотвращает преждевременную денатурацию белка.

По литературным данным, рабочий диапазон рН для папаина находится в пределах от 5,0 до 9,0 [6]. В ходе наших экспериментов показано, что максимумы активности нативного и сорбированного на среднемолекулярном хитозане фермента наблюдаются при значении рН, равном 7,5. Для энзима, иммобилизованного на высокомолекулярном хитозане, выявлена тенденция к сглаживанию пика в области рН 7,5 (рис. 5).

Максимальная скорость реакции растворимого и иммобилизованного папаина наблюдается при концентрации азоказеина, равной 0,04 мМ, при увеличении концентрации субстрата до 0,1 мМ не выявляется возрастания скорости ферментативного катализа (рис. 6).

Таблица 1. Кинетические свойства нативного и иммобилизованного фицина

Препарат	V_{max} , мкМ/(мг*мин)	K_m , мМ
Нативный фицин	104.17±0.99	0.025±0.003
Фицин+ высокомолекулярный хитозан	90.90±1.46	0.028±0.005
Фицин+ среднемолекулярный хитозан	83.33±1.02	0.031±0.009

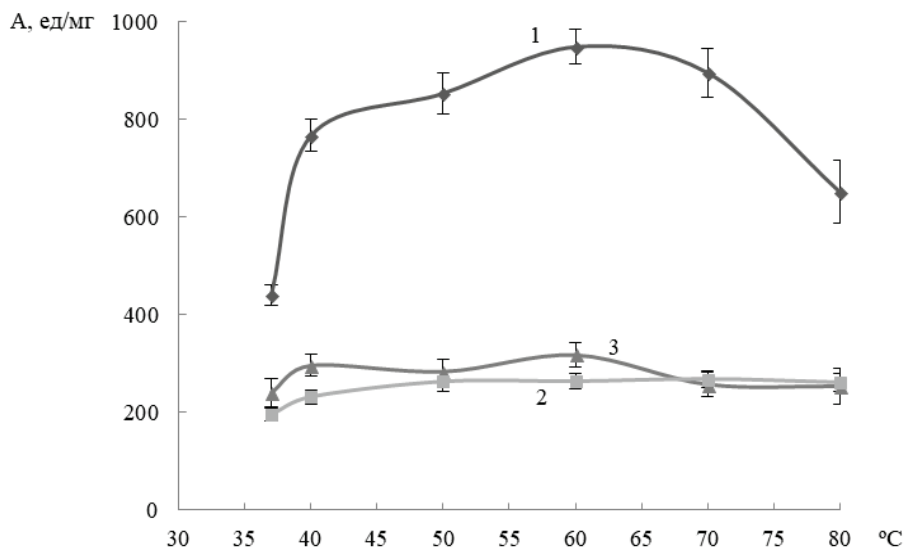


Рисунок 4. Зависимость каталитической активности (A) папаина от температуры инкубации: 1 – нативный папаин, 2 – папаин, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане, 3 – папаин, иммобилизованный на среднемoleкулярном хитозане

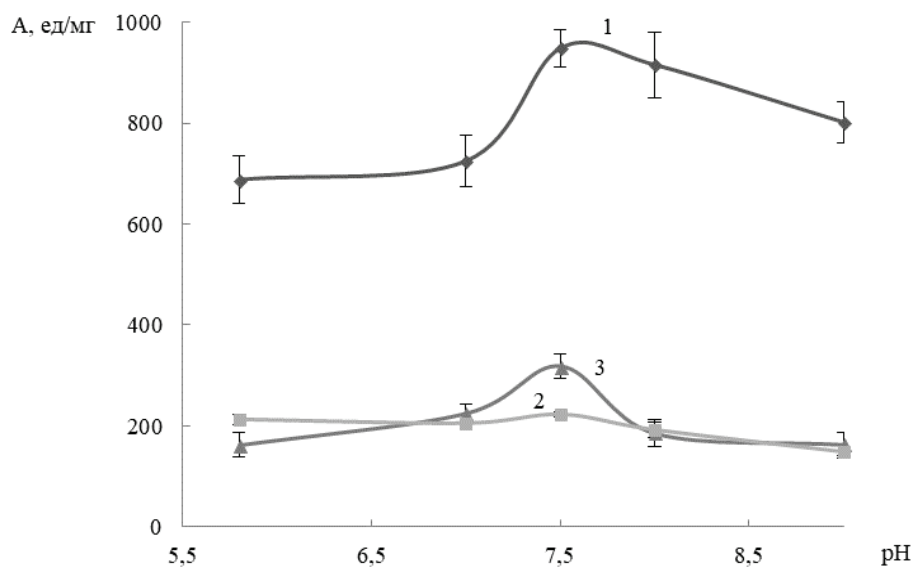


Рисунок 5. Зависимость каталитической активности (A) папаина от pH среды: 1 – нативный папаин, 2 – папаин, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане, 3 – папаин, иммобилизованный на среднемoleкулярном хитозане

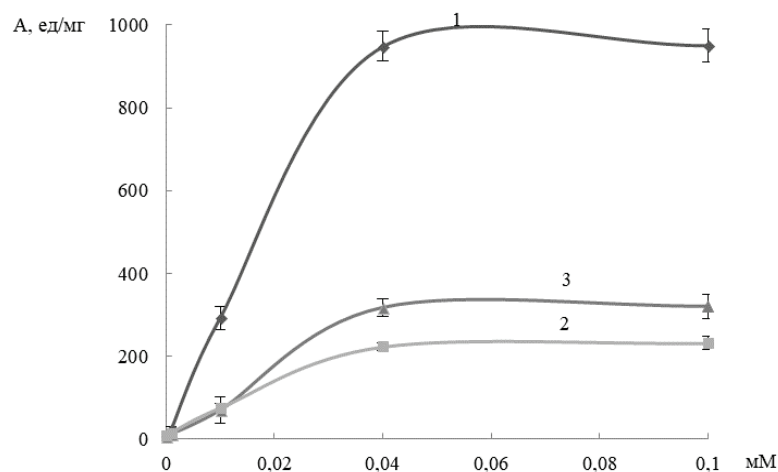


Рисунок 6. Зависимость каталитической активности (A) папаина от концентрации субстрата: 1 – нативный папаин, 2 – папаин, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане, 3 – папаин, иммобилизованный на среднемoleкулярном хитозане

Таблица 2. Кинетические свойства нативного и иммобилизованного папаина

Препарат	V _{max} , мкМ/(мг*мин)	K _m , мМ
Нативный папаин	1250±38	0,038±0,007
Папаин+ высокомолекулярный хитозан	263±9	0,013±0,001
Папаин+ среднемолекулярный хитозан	417±20	0,025±0,006

В таблице 2 представлены значения константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции гидролиза азоказеина свободным и сорбированным на хитозане папаином. Иммобилизация папаина на нерастворимом носителе приводит к снижению V_{max} и увеличению степени сродства фермента к субстрату, которое, вероятно, связано с концентрированием молекул азоказеина в матрице хитозана и субстратным ингибированием папаина.

Следует отметить, что рабочий оптимальный диапазон температур для фицина находится между 37 и 60 °С, для папаина – 50-70 °С. Фицин высоко активен в диапазоне рН от 5,0 до 8,0, каталитическая способность папаина проявляется в зоне рН 5,8-9,0. Иммобилизация фицина на хитозане приводит к незначительному снижению скорости реакции, что нельзя сказать о папаине: после его иммобилизации на матрицах высокомолекулярного и среднемолекулярного хитозанов скорость ферментативного катализа уменьшилась в 4,7 и 3,0 раз соответственно. У сорбированного фицина увеличивается значения K_m по сравнению с его растворимой формой, у иммобилизованного папаина наблюдается снижение этого показателя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе наших исследований было установлено, что иммобилизация фицина и папаина на матрицах кислоторастворимого хитозана не приводит к сдвигу оптимальных значений рН и температуры (при расширении рабочих диапазонов в зону щелочной среды и повышенных температур). Сорбция биокатализаторов способствует снижению скорости ферментативного катализа, а также к изменению степени сродства энзимов к субстрату.

Список литературы / References:

1. 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.
2. Mohr T., Desser L. Plant proteolytic enzyme papain abrogates angiogenic activation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) *in vitro*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2013, vol. 13, pp. 231-239.
3. Nor M.Z.M., Ramchandran L., Duke M., Vasiljevic T. Characteristic properties of crude pineapple waste extract for bromelain purification by membrane processing. *J Food Sci Technol.*, 2015. vol. 52, pp. 7103-7112.
4. Холявка М.Г., Беленова А.С., Макарова Е.Л., Ковалева Т.А., Артюхов В.Г. Иммобилизация гидролаз как один из путей регулирования и стабилизации их активности. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*, 2013, № 7, с. 29-36. [Holyavka M.G., Belenova A.S., Makarova E.L., Kovaleva T.A., Artyukhov V.G. Immobilization of hydrolases as one of the ways to regulate and stabilize their activity. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii*, 2013, no. 7, pp. 29-36. (In Russ.)]
5. Королева В.А., Холявка М.Г., Сазыкина С.М., Олшанникова 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.)]
6. 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.

PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF FREE AND IMMOBILIZED ON THE CHITOSANE MATRIX FICIN AND PAPAINE**Koroleva V.A., Holyavka M.G., Pankova S.M., Olshannikova S.S., Ermolaeva V.V., Sakibaev F.A., Shelometseva T.N., Artukhov V.G.**

Voronezh State University

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

Abstract. The physical, chemical and kinetic properties of cysteine proteinases – ficin and papain were studied. It was found that ficin is high active in the temperature range from 37 to 60 °C. The free ficin is completely inactivated at 70 °C, the enzyme sorbed on the chitosan retains about 50 % of the activity. The operating temperature range of soluble and immobilized papain is between 50 and 70 °C. The native enzyme is more incur to thermal inactivation than the enzyme sorbed on chitosan at 80 °C. It is shown that the immobilization of ficin and papain on chitosan matrices promotes the expansion of their pH optimum to the alkaline region. The maximum rate of enzymatic reaction of native and immobilized cysteine proteases is observed at a substrate concentration of 0,04 mM. Sorption of biocatalysts led to a decrease in the rate of enzymatic catalysis, as well as to a change in the degree of affinity of the enzymes to the substrate.

Key words: *ficin, papain, immobilization, physical and chemical properties of enzymes, chitosan.*