

ВЛИЯНИЕ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ И ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ ПАПАИНА**Королева В.А.^{1,2}, Панкова С.М.^{1,2}, Редько Ю.А.¹, Холявка М.Г.^{1,3}, Артюхов В.Г.¹**¹ Воронежский государственный университет

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

² Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко

ул. Студенческая, 10, г. Воронеж, 394006, РФ

³ Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

Поступила в редакцию 03.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0589x

Аннотация. Папаин (КФ 3.4.22.2) является эндолитической цистеиновой протеазой, которую получают из латекса папайи (*Carica papaya L.*). На сегодняшний день данный фермент рассматривается в качестве противовоспалительного, антикоагулянтного и гемолитического средства, также субстанции, ускоряющей восстановление тканей. Хитозан относят к универсальному сорбенту, который связывает широкий ряд веществ органического и неорганического происхождения. Он обладает антимикробной активностью, биоразлагаемостью, нетоксичностью и биоадгезивными свойствами. Целью нашей работы является изучение сочетанного действия УФ-излучения и температуры на активность свободного и иммобилизованного на матрице средне- и высокомолекулярного хитозанов папаина. В качестве объекта исследования был выбран папаин, субстратами для гидролиза служили бычий сывороточный альбумин (БСА) и азоказеин, носителями для иммобилизации – средне- (Mг = 200 кДа, степень деацетилирования (СД) 82 %) и высокомолекулярный (Mг = 350 кДа, СД = 94,85 %) хитозаны. Показано, что энзим становится более устойчивым к изменению температурного режима, а также к УФ-облучению после его иммобилизации. При 90 °С нативный папаин полностью инактивируется, в то время как сорбированный фермент на средне- и высокомолекулярном хитозанах сохраняет 45 и 57 % своей начальной активности, соответственно. После сорбции папаина на матрице полисахаридов при воздействии доз от 151 до 6040 Дж/м² каталитическая способность фермента изменялась в меньшей степени, чем у его растворимой формы. Протеолитическая способность иммобилизованного на высокомолекулярном хитозане биокатализатора после УФ-облучения даже увеличивалась на 13-27 % от первоначального уровня.

Ключевые слова: папаин, иммобилизация, хитозан, УФ-облучение.

ВВЕДЕНИЕ

Протеолитические ферменты широко используются для различных медицинских целей, таких как обработка ран, а также удаление некротизированных и инфицированных тканей в ранах или ожогах. Протеазы растений обладают некоторыми общими преимуществами по сравнению с протеазами млекопитающих из-за более низкого риска передачи заболеваний [1-5]. Среди них папаин (КФ 3.4.22.2), фермент эндолитической цистеиновой протеазы из латекса папайи (*Carica papaya L.*), в настоящее время рассматривается в качестве противовоспалительного, антикоагулянтного и гемолитического средства, также вещества, ускоряющего восстановление тканей [6-9]. Кроме того, сообщалось, что папаин является субстанцией против биопленки, зубного налета и гингивита.

Папаин – полипептид, состоящий из 212 аминокислотных остатков, на N-конце молекулы которого расположен изолейцин, на C-конце – аспарагин. Он активен не только в кислых, но и в нейтральных и щелочных средах (диапазон pH 3-12, оптимум pH 5-8). Папаин сохраняет активность в температурном диапазоне до 50-60 °С, обладает относительно широкой специфичностью.

Хитозан, продукт деацетилирования хитина, является универсальным сорбентом, связывающим большой спектр веществ как органического, так и неорганического происхождения, что делает его отличным кандидатом для целей иммобилизации ферментов [10,11]. Низкая стоимость, широкая доступность, антимикробная активность, биоразлагаемость, нетоксичность и биоадгезивные свойства делают хитозан перспективным носителем многих энзимов для получения высокоактивных и термостабильных иммобилизованных катализаторов. Свойства хитозана могут быть модифицированы, например, путем воздействия ультрафиолетового облучения.

Использование ультрафиолетового света коротковолнового спектра для лечения ожоговых ран оказалось эффективным способом благодаря выраженному антибактериальному эффекту УФ-облучения. Показано, что применение УФ-света может стимулировать активность компонентов иммунной системы.

Комплексное использование действия УФ-излучения, папаина и хитозана, возможно, будет востребовано в ожоговой терапии из-за более быстрого восстановления тканей, заживления кожных покровов, поэтому целью нашей работы было изучить влияние сочетанного действия УФ-излучения и температуры на активность папаина, свободного и иммобилизованного на матрице средне- и высокомолекулярного хитозанов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования был выбран папаин (Sigma-Aldrich), субстратами для гидролиза служили бычий сывороточный альбумин (БСА) и азоказеин (Sigma-Aldrich), носителями для иммобилизации – средне- (СМхтз, Мг = 200 кДа, степень деацетилирования (СД) 82 %) и высокомолекулярный (ВМхтз, Мг = 350 кДа, СД = 94,85 %) хитозаны. Иммобилизацию папаина на матрице хитозанов осуществляли адсорбционным методом с использованием 0.05 М глицинового буфера со значением pH 9,0 [12].

Зависимость каталитической способности нативного и иммобилизованного фермента от температуры исследовали в диапазоне от 25 до 90 °С.

Определение каталитической активности протеаз при использовании азоказеина в качестве субстрата. К 200 мкл раствора свободного фермента в 50 мМ трис-НСl буфере с pH 7,5, содержащему 1 мМ раствор цистеина (или к суспензии 50 мг иммобилизованного образца в 200 мкл 50 мМ трис-НСl буфера с pH 7,5, содержащей 1 мМ раствор L-цистеина,), добавляли 400 мкл 1 % раствора азоказеина (в 50 мМ трис-НСl буфере, pH 7,5) и инкубировали 30 минут при температуре при 60 °С. После инкубации добавляли 800 мкл 5 % раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), инкубировали 5 минут при -4 °С, а затем центрифугировали в течение 3 минут при 13 000 об/мин для удаления негидролизованного азоказеина. К 1200 мкл супернатанта добавляли 240 мкл 3 % раствора NaOH для нейтрализации кислоты, после чего измеряли оптическую плотность опытной пробы при 410 нм в 1 см кювете. Контрольная проба содержала 400 мкл азоказеина, 800 мкл ТХУ; 50 мг образца и 200 мкл буфера вносили после инкубации в течение 30 минут при температуре при 60 °С [13].

Процесс УФ-облучения происходил при непрерывном перемешивании раствора или суспензии в объеме 4 мл (толщина слоя в середине кюветы 7 мм) магнитной мешалкой в круглодонной термостатируемой кювете (20±1 °С) с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240-390 нм в течение 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40 минут. Доза облучения составила соответственно 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м².

Статистическую обработку полученных результатов проводили при уровне значимости 5 % с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оптимальная температура для функционирования папаина, иммобилизованного на хитозанах 200 и 350 кДа, была аналогична таковой для растворимого фермента – 60 °С. При 80 °С ферментативная активность нативного папаина снижалась на 68 % от исходной, а полная инактивация наблюдалась при 90 °С (рис. 1). Напротив, папаин, иммобилизованный на обоих типах хитозана, сохранял соответственно 80 и 98 % своей активности при 80 °С, а также 45 и 57 % своей начальной каталитической способности при 90 °С. Эти данные свидетельствуют о том, что адсорбция на хитозане повышает термостабильность папаина, по-видимому, путем ограничения конформационной подвижности белка, что предотвращает его преждевременную денатурацию.

После воздействия дозы УФ-света 453 Дж/м² на раствор папаина выявлено снижение каталитической способности энзима на 32 % по сравнению с контрольным (необлученным) образцом. При повышении дозы

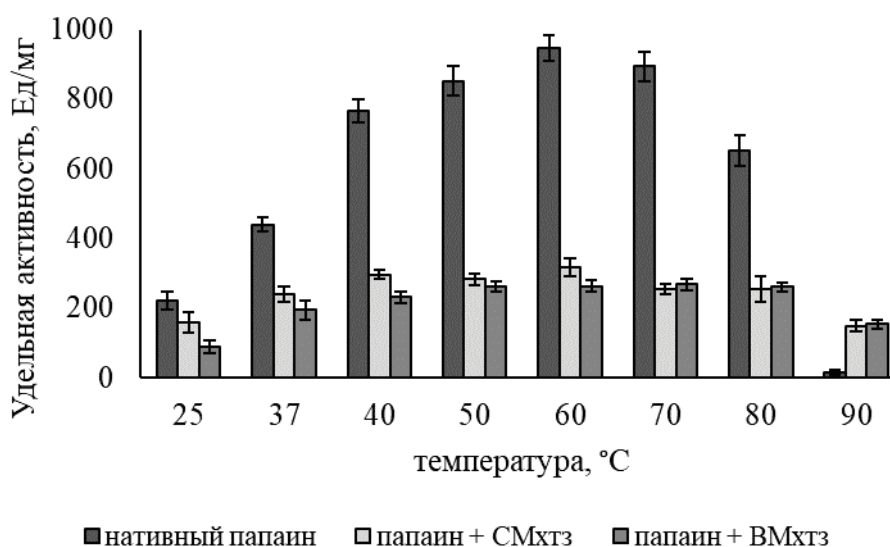


Рисунок 1. Зависимость удельной каталитической активности (в Ед/мг белка) свободного и иммобилизованного на средне- (СМхтз) и высокомолекулярном (ВМхтз) хитозанах папаина от температуры

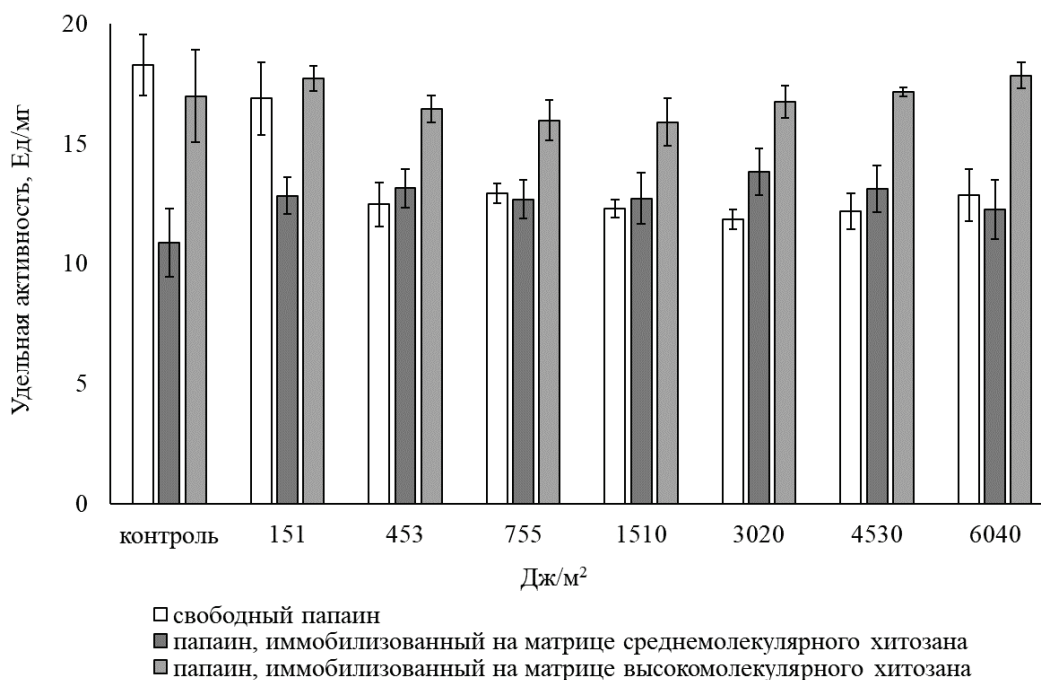


Рисунок 2. Влияние УФ-излучения на удельную каталитическую активность (Ед/мг белка) свободного и иммобилизованного на средне- и высокомолекулярном хитозане папаина

облучения от 755 Дж/м² до 6040 Дж/м² фермент сохранял свою активность на относительно постоянном уровне 65-75 % от первоначального значения.

После иммобилизации папаина на матрице среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов при воздействии доз от 151 до 6040 Дж/м² каталитическая способность фермента изменялась в меньшей степени, чем у его растворимой формы. В частности, после адсорбции на среднемолекулярном хитозане при воздействии УФ-света во всем изучаемом нами диапазоне доз активность папаина колебалась в пределах ~ 5 %, а после образования комплекса с высокомолекулярным хитозаном активность биокатализатора даже увеличивалась на 13-27 % от его первоначального уровня (рис. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммобилизованный на средне- и высокомолекулярном хитозанах папаин имеет ряд преимуществ по сравнению с его свободной формой. Показано, что фермент становится более устойчивым к изменению температурного режима, а также к УФ-облучению. При 90 °С нативный папаин полностью инактивируется, в то время как фермент, сорбированный на средне- и высокомолекулярном хитозанах, сохраняет 45 и 57 % своей начальной активности. После адсорбции папаина на матрице носителя при воздействии доз от 151 до 6040 Дж/м² каталитическая способность фермента изменялась в меньшей степени, чем у его растворимой формы. Протеолитическая способность иммобилизованного на высокомолекулярном хитозане биокатализатора даже увеличивалась после УФ-облучения на 13-27 % от первоначального уровня.

Список литературы / References:

- Holyavka M., Koroleva V., Olshannikova S., Artyukhov V., Faizullin D., Zakhartchenko N., Zuev Y., Kondratyev M., Zakharova E. Novel biotechnological formulations of cysteine proteases, immobilized on chitosan. Structure, stability and activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, vol. 180, pp. 161-176.
- Холявка М.Г., Наквасина М.А., Артюхов В.Г. *Практикум по биотехнологии: иммобилизованные биологические объекты в системе лабораторных работ*. Учебное пособие, Воронеж, 2017 [Holyavka M.G., Nakvasina M.A., Artyukhov V.G. *Praktikum po biotekhnologii: immobilizovannyye biologicheskiye ob"ekty v sisteme laboratornykh rabot*. Uchebnoye posobie, Voronezh, 2017 (In Russ.)].
- Холявка М.Г., Артюхов В.Г. *Иммобилизованные биологические системы: биофизические аспекты и практическое применение*. Учебное пособие, Воронеж, 2017 [Holyavka M.G., Artyukhov V.G. *Immobilizovannyye biologicheskiye sistemy: biofizicheskiye aspekty i prakticheskoye primeneniye*. Uchebnoye posobie, Voronezh, 2017 (In Russ.)].
- Baidamshina D.R., Trizna E.Y. et al. Anti-biofilm and wound-healing activity of chitosan-immobilized ficin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, vol. 164, pp. 4205-4217.
- Fileti A.M.F., Fischer G.A., Tambourgi E.B. Neural modeling of bromelain extraction by reversed micelles. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2010, vol. 53, pp. 455-463, doi: 10.1590/S1516-89132010000200026.

6. Grzonka Z., Kasprzykowski F., Wiczek W. Cysteine proteases. *Industrial Enzymes*, Springer, New York. *J. Polaina*, 2007, pp. 181-195.
7. Konno K., Hirayama C., Nakamura M., Tateishi K., Tamura Y., Hattori M., Kohno K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *The Plant Journal*, 2004, vol. 37, pp. 370-378, doi: 10.1046/j.1365-3113X.2003.01968.x.
8. Khanna N., Panda P.C. The effect of papain on tenderization and functional properties of spending hen meat cuts. *Indian Journal of Animal Research*, 2007, vol. 41, pp. 55-58.
9. Baidamshina D.R., Trizna E.Y., Kayumov A.R., Koroleva V.A., Olshannikova S.S., Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Bogachev M.I. Biochemical properties and anti-biofilm activity of chitosan-immobilized papain. *Marine Drugs*, 2021, vol. 19, p. 197.
10. Silva D.F., Rosa H., Carvalho A.F.A., Neto P.O. Immobilization of papain on chitin and chitosan and recycling of soluble enzyme for deflocculation of *Saccharomyces cerevisiae* from bioethanol distilleries. *Enzyme Research*, 2015, art. id 573721, doi: 10.1155/2015/573721.
11. 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. Epiphanies of well-known and newly discovered macromolecular carbohydrates - A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, vol. 156, pp. 51-66, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.046.
12. Королева В.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Сазыкина С.М., Тимошилова А.А., Олыпанникова С.С. Разработка методики иммобилизации фичина на матрицах кислоторастворимых хитозанов. В сборнике: *Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. Межрегиональный сборник научных работ. Воронежский государственный аграрный университет им. Императора Петра I. Воронеж, 2015, с. 99-102* [Koroleva V.A., Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Sazykina S.M., Timoshilova A.A., Olypannikova S.S. *Razrabotka metodiki immobilizacii ficina na matricah kislotorastvorimyh hitozanov. V sbornike: Organizaciya i regulaciya fiziologo-biohimicheskikh processov. Mezhhregional'nyj sbornik nauchnyh rabot. Voronezhskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet im. Imperatora Petra I. Voronezh, 2015, pp. 99-102 (In Russ.)*].
13. Sabirova A.R., Rudakova N.L., Balaban N.P., Ilyinskaya O.N., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Rudenskaya G.N., Sharipova M.R. A novel secreted metzincin metalloproteinase from *Bacillus intermedius*. *FEBS Lett.*, 2010, vol. 584, no. 21, pp. 4419-4425, doi: 10.1016/j.febslet.2010.09.049.

EFFECT OF UV RADIATION AND TEMPERATURE ON PAPAIN ACTIVITY
Koroleva V.A.^{1,2}, Pankova S.M.^{1,2}, Redko Yu.A.¹, Holyavka M.G.^{1,3}, Artyukhov V.G.¹

¹ Voronezh State University

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

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

Student st., 10, Voronezh, 394006, Russia

³ Sevastopol State University

Universitetskaya st., 33, Sevastopol, 299053, Russia

Received 03.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0589

Abstract. Papain (EC 3.4.22.2) is an endolytic cysteine protease derived from papaya latex (*Carica papaya* L.). Today, this enzyme is considered as an anti-inflammatory, anticoagulant and hemolytic agent, as well as a substance that accelerates tissue repair. Chitosan is classified as a universal sorbent that binds a wide range of substances of organic and inorganic origin. It has antimicrobial activity, biodegradability, non-toxicity and bioadhesive properties. The aim of our work is to study the combined effect of UV-radiation and temperature on the activity of free papain and papain immobilized on a matrix of medium and high molecular weight chitosan. Papain was chosen as the object of study, bovine serum albumin (BSA) and azocasein served as substrates for hydrolysis, medium- ($M_r = 200$ kDa, degree of deacetylation (DD) 82%) and high molecular weight ($M_r = 350$ kDa, DD = 94.85%) chitosan were used as carriers for immobilization. It has been shown that the enzyme becomes more resistant to changes in the temperature regime, as well as to UV irradiation after its immobilization. At 90°C, native papain is completely inactivated, while the sorbed enzyme on medium and high molecular weight chitosan retains 45 and 57% of its initial activity, respectively. After the sorption of papain on the polysaccharide matrix at doses from 151 to 6040 J/m², the catalytic ability of the enzyme changed to a lesser extent than that of its soluble form. The proteolytic ability of the biocatalyst immobilized on high molecular weight chitosan after UV irradiation even increased by 13-27% of the initial level.

Key words: papain, immobilization, chitosan, UV-irradiation.