

УДК 577.325

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕТЕРОГЕННОГО БИОКАТАЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ ТРИПСИНА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА МАТРИЦЕ ХИТОЗАНА

Логинава О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Беленова А.С.

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж, e-mail: o-lic@mail.ru

Исследовано влияние pH среды на степень иммобилизации трипсина при его адсорбции на четырех видах хитозана (кислоторастворимый высоко- и среднемoleкулярный хитозан, низкомолекулярный пищевой хитозан и водорастворимый сукцинат хитозана). Установлены наиболее перспективные условия для создания гетерогенного биокатализатора: значения pH 5,0–6,5 и температура около 20 °С. Хитозан кислоторастворимый высокомолекулярный проявил большую сорбционную емкость по сравнению с хитозаном кислоторастворимым среднемoleкулярным, а, следовательно, оказался более эффективным для использования в качестве матрицы для иммобилизации трипсина. Показано, что иммобилизованный трипсин способен сохранять активность при хранении в течение нескольких суток.

Ключевые слова: хитозан, трипсин, адсорбционная иммобилизация

DEVELOPMENT OF METHOD FOR PRODUCING OF HETEROGENEOUS BIOCATALYST, BASED ON TRYPSIN, IMMOBILIZED ON THE CHITOSAN MATRIX

Loginova O.O., Holiyavka M.G., Artyukhov V.G., Belenova A.S.

Voronezh State University, Voronezh, e-mail: o-lic@mail.ru

The effect of pH on the degree of trypsin's immobilization of its adsorption on four chitosan types (acid-soluble high- and medium molecular weight chitosan, food water-soluble low molecular weight chitosan and chitosan succinate) was investigated. The most optimal conditions for heterogeneous biocatalyst synthesis was established: pH 5,0–6,5 and temperature of 20 °C. Acid-soluble high molecular weight chitosan showed more large sorption capacity than medium molecular weight acid-soluble chitosan, and hence it is more effective for use as a matrix for trypsin immobilization. It was shown that the immobilized trypsin is able to maintain its activity when stored for several days.

Keywords: chitosan, adsorptive immobilization, trypsin

Хитозаны являются сополимерами 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкозамина и 2-ацетиамидо-2-дезоксид-β-D-глюкозамина, связанных β (1 → 4) связями. Функциональные свойства этих катионных полиэлектролитов зависят от молекулярной массы, полидисперсности, степени деацетилирования (СД) и микроструктуры (распределения сомономеров по длине цепи) [1]. Молекулы хитозана содержат гидроксильные и аминогруппы, его полимерная матрица позволяет иммобилизовать ферменты как внутри сетки, так и на ее поверхности. Производные хитозанов характеризуются нетоксичностью, биоразлагаемостью, биосовместимостью и слабой иммуногенностью [2, 3]. Хитозан является слабым основанием с рКа = 6,5, что близко значению рКа остатков D-глюкозамина [4].

При закреплении ферментов на нерастворимых носителях получают гетерогенные биокатализаторы, которые обладают рядом преимуществ: значительно повышается не только стабильность, но и эффективность полученного препарата за счет возможности управления процессом протекания реакции. Однако практика показывает, что использование одного и того же метода иммобилизации в случае различных

ферментов приводит к резко отличающимся конечным результатам.

Целью нашей работы была разработка эффективной методики адсорбционной иммобилизации трипсина на матрице хитозана.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования был выбран бычий трипсин фирмы «MP biomedical». В качестве носителя использовали четыре вида хитозана, синтезированных ЗАО «Биопрогресс»: хитозан пищевой кислоторастворимый ХТЗ № 07 (Mг = 200 кДа, степень деацелирования СД 82%), хитозан кислоторастворимый высокомолекулярный ХТЗ № 12 (Mг = 350 кДа, СД = 94,85%), хитозан пищевой низкомолекулярный (ХТЗ пищ) и сукцинат хитозана водорастворимый ХТЗ № 02.

Иммобилизацию трипсина на хитозане осуществляли адсорбционным методом. К 50 мг хитозана добавляли 1 мл буферного раствора и 1 мл раствора трипсина (в концентрации 5·10⁻⁵М), инкубировали в течение 24 часов с периодическим перемешиванием. О степени иммобилизации судили по количеству белка в надосадочной жидкости, отобранной после инкубации фермента с носителем и центрифугирования при 1.500 г в течение 10 мин (выражается в процентном соотношении адсорбированного белка к исходной концентрации фермента). Определение количества белка осуществляли модифицированным методом Лоури (по реакции Фолина–Чикальтеу) [5].

При подборе оптимальных условий для иммобилизации трипсина использовали 0,1 М цитратный буфер (рН 3,0–5,0), 0,1 М фосфатный буфер (рН 5,8–7,5) и 0,1 М трис-буфер (рН 8,0–11,0). Каталитическую активность фермента определяли спектрофотометрически по количеству окрашенного продукта реакции в результате расщепления N- α -бензоил-DL-аргинин-п-нитроанилида (BAPNA) [6].

Результаты исследования и их обсуждение

Установлено, что сукцинат хитозана и низкомолекулярный хитозан в отличие от высокомолекулярных хитозанов вносят значительный вклад в окрашивание среды в реакции Фолина–Чикальтэу (рис. 1).

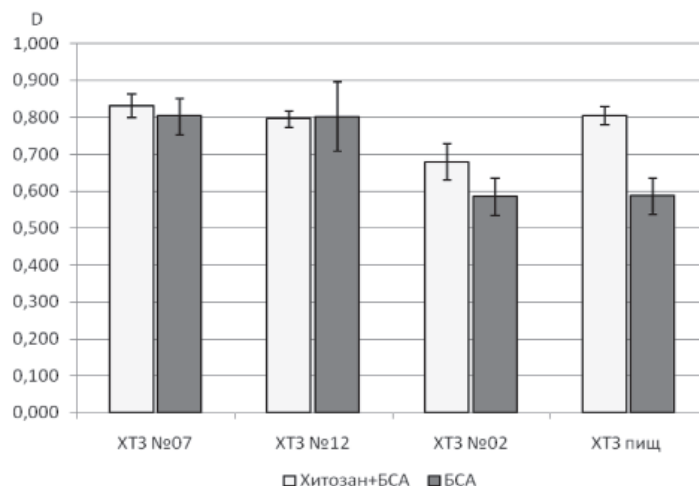


Рис. 1. Зависимость величины оптической плотности от типа используемого хитозана в реакции Фолина–Чикальтэу

При сравнительном анализе степени иммобилизации (α) трипсина на четырех видах хитозана нами установлено, что наиболее эффективной является иммобилизация трипсина на высокомолекулярных видах носителя (XTЗ № 12 и № 07), для пищевого низкомолекулярного хитозана и сукцината хитозана степень иммобилизации была ниже 20%, что, вероятно, связано с низкой стерической доступностью активных групп носителя для адсорбции фермента, так как он в данных условиях имеет гелеобразную структуру. При кислых значениях рН низкомолекулярный

хитозан полностью растворялся, а сукцинат хитозана приобретал желатинообразную консистенцию, поэтому определение степени иммобилизации фермента на матрицу оказывалось затруднительным.

В следующей серии экспериментов нами была проведена иммобилизация трипсина при рН 3,0; 4,0; 5,0; 5,8 и 6,5. Степень иммобилизации на хитозан № 12 была выше, чем на хитозан № 7 во всех случаях и составила 55,2; 43,8; 32,2; 64,9 и 59,9% соответственно, для хитозана № 7 – 40,6; 19,5; 19,7; 40,6 и 29,2% (рис. 2).

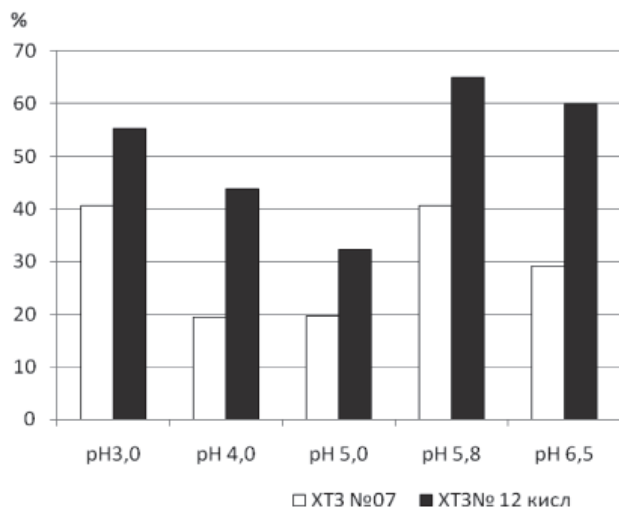


Рис. 2. Степень иммобилизации (α) трипсина на хитозан № 07 и № 12 при различных значениях рН

Сравнение активности иммобилизованного трипсина на ХТЗ № 12 и № 07 при pH 3,0; 4,0; 5,0; 5,8 и 6,5 показало, что наибольшую активность проявлял фермент, иммобилизованный на ХТЗ № 12, при большинстве используемых значений pH и составила 32,6; 43,5; 78,6; 57,4

и 65,4% от активности свободного фермента соответственно. Для трипсина, иммобилизованного на ХТЗ № 07, активность составила 36,0; 38,8; 76,5; 43,3 и 61,1% соответственно (рис. 3). Активность свободного фермента варьировалась от 4,37 до 5,47 мкМ/мин.

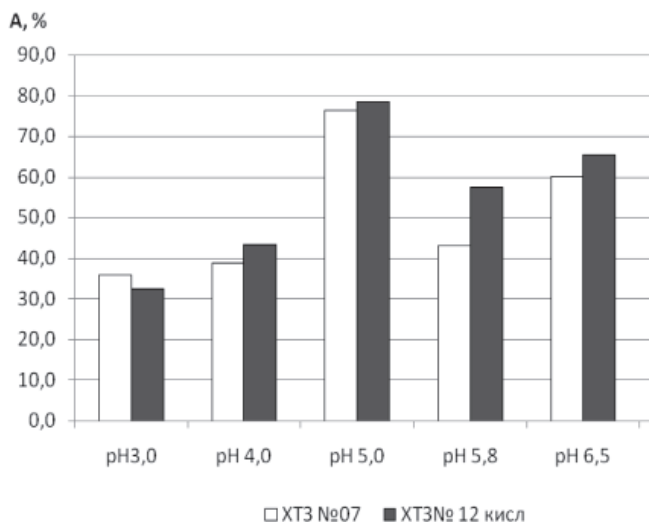


Рис. 3. Общая каталитическая активность трипсина (А), иммобилизованного на ХТЗ № 07 и ХТЗ № 12 при различных значениях pH (% от активности свободного фермента)

В ходе хранения высушенных иммобилизованных на матрице хитозана образцов трипсина в течение трех суток в холодильнике активность гетерогенного биокатализатора снизилась в среднем на

20% и составляла от 30 до 55% от активности свободного фермента. Наибольшую каталитическую способность (2,12 мкМ/мин) сохранял трипсин, иммобилизованный на ХТЗ № 07 при pH 6,5 (рис. 4).

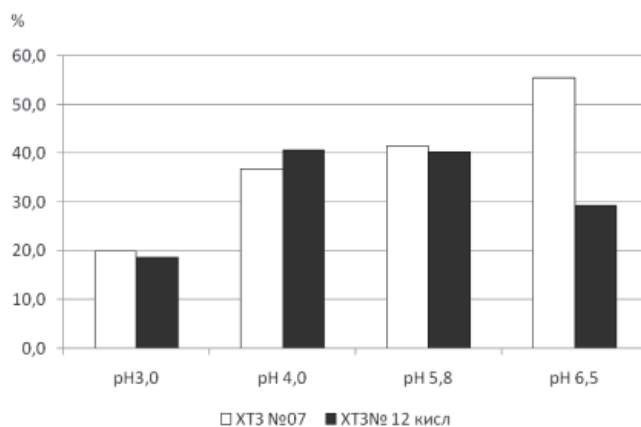


Рис. 4. Общая каталитическая активность трипсина (А), иммобилизованного при различных pH среды на хитозан № 07 и № 12, после хранения в течении 3 суток (% от активности свободного фермента)

Заключение

Таким образом, нами было показано, что ХТЗ № 12 наиболее эффективен для использования в качестве матрицы для

иммобилизации, так как обладает большей сорбционной емкостью по сравнению с хитозаном № 07. В ходе проведенных исследований была разработана методика

адсорбционной иммобилизации трипсина на матрице хитозана, в результате которой сохраняется до 78% активности фермента при степени иммобилизации до 65%. Оптимальными условиями для иммобилизации оказались значения pH 5,0–6,5, что, вероятно, связано с тем, что рКа хитозана колеблется около величин 6,3–6,5 в зависимости от степени деацелирования молекулы. Мы также установили, что активность иммобилизованного на ХТЗ № 07 и № 12 трипсина сохраняется на 30–55% в течение трех суток при хранении образцов в высушенном состоянии.

Список литературы

1. Бачева А.В., Эффективный биокатализатор для реакций гидролиза и синтеза пептидов – биоконкомпозит субтилизин Карлсберг/хитозан // А.В. Бачева, М.С. Исаков, Е.Н. Лысогорская, Д.Дж. Маккверри., И.Ю. Филиппова / Биоорганическая химия. – 2008. – Т. 34 (3). – С. 371–375.
2. Muzzarelli R.A.A. In: Chitosan in Natural Chelating Polymers; Alginic acid, Chitin, and Chitosan // Ed. R. Belcher. Oxford: Pergamon Press. – 1973. – P. 144–176.
3. Muzzarelli R.A.A. Chitosan-based dietary foods // Carbohydr. Polym. – 1996. – Vol. 29. – P. 309.
4. MacLaughlin F.C. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery / F.C. MacLaughlin R.J. Mumper, J. Wang, J.M. Tagliaferri, I. Gill, M. Hinchcliffe, and A.P. Rolland // J. Controlled Release. – 1998. – Vol. 56. – P. 259–272.
5. Folin O. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins / O. Folin, V. Ciocalteu // J. Biol. Chem. – 1929. – Vol. 73. – P. 627.

References:

1. Erlanger D.F. Proteinases activity in biological substrats / D.F. Erlanger, N. Kokowski, W. Cohen // Arch. Biochem. Biophys. 1961. Vol. 95. pp. 271–278. Bacheva A.V., Lysogorskaya E.N., Macquarrie D.J., Filippova I.Yu Efficient biocatalyst for the hydrolysis and synthesis of peptides biocomposite subtilisin Carlsberg/ chitosan Bioorganic chemistry. 2008. no. 34 (3). pp. 371–375.
2. Muzzarelli R.A.A. In: Chitosan in Natural Chelating Polymers; Alginic acid, Chitin, and Chitosan // Ed. R. Belcher. Oxford: Pergamon Press 1973. pp. 144–176.
3. Muzzarelli R.A.A. Chitosan-based dietary foods // Carbohydr. Polym. 1996. Vol. 29. pp. 309.
4. MacLaughlin F.C. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery/ F.C. MacLaughlin R. J. Mumper, J. Wang, J. M. Tagliaferri, I. Gill, M. Hinchcliffe, and A. P. Rolland // J. Controlled Release, 1998. Vol. 56. pp. 259–272.
5. Folin O. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins / O. Folin, V. Ciocalteu // J. Biol. Chem. 1929. Vol. 73. pp. 627.
6. Erlanger D.F. Proteinases activity in biological substrats / D.F. Erlanger, N. Kokowski, W. Cohen // Arch. Biochem. Biophys. 1961. Vol. 95. pp. 271–278.

Рецензенты:

Епринцев А.Т., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, г. Воронеж;

Селеменов В.Ф., д.х.н., профессор, заведующий кафедрой аналитической химии, Воронежский государственный университет, г. Воронеж.

Работа поступила в редакцию 16.12.2013.