

БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ПЛЕНКИ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И ПРОТЕИНАЗ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ

*А.В. Бачева**, *А.А. Ежов***, *И.Ю. Филиппова**

*Химический факультет МГУ, Москва, E-mail: anbach@genebee.msu.ru

**Физический факультет МГУ, Москва

BIOCATALYTIC FILMS BASED ON CHITOSAN AND PROTEASES OF DIFFERENT CLASSES

*A.V. Bacheva**, *A.A. Ezbov***, *I.Yu. Filippova**

*Chemistry Department of Moscow State University, Moscow,

E-mail: anbach@genebee.msu.ru

**Department of Physics, Moscow State University, Moscow

ABSTRACT

Enzyme (subtilisin, chymotrypsin and papain)/chitosan biocomposite films were prepared. The novel preparation technique provided for high loading and uniform enzyme distribution. The influence of glutaraldehyde treatment and concentration, enzyme concentration, kinetics parameters, temperature and pH-dependence of subtilisin/chitosan hydrolytic activity were studied. AFM study showed that the thickness of obtained films was in nanoscale range.

Хитозан, деацетилированное производное хитина, $\beta(1-4)$ -2-амино-2-дезоксид-глюкопираноза, обладает многими замечательными качествами. Во-первых, это гидрофильная непористая матрица, содержащая амино- и гидроксильные группы и позволяющая иммобилизовать ферменты как внутри сетки полимерного геля, так и на ее поверхности различными ковалентными (используя разнообразные сшивающие агенты) и нековалентными (с образованием водородных и ионных связей) способами. Другой привлекательной чертой хитозана является то, что из его разбавленных кислых растворов можно получать носители различной геометрии, а именно: пленки, гели, гранулы и волокна. Способность хитозана образовывать пленки на различных поверхностях позволяет получать стабильные биокаталитические покрытия.

Иммобилизованные ферменты — это ферменты, каким-либо образом закрепленные на носителе. При закреплении на нерастворимых носителях получают гетерогенные биокатализаторы, которые имеют все преимущества ферментов, при этом значительно повышается не только стабильность, но и эффективность полученного биокатализатора за счет легкости выделения из реакционной смеси, контроля над протеканием реакции, возможности повторного или непрерывного использования, что важно для практического применения.

Изменение свойств ферментов при иммобилизации, появление таких качеств, как устойчивость к изменениям температуры, pH, состава растворителей; возможность многократного применения, уменьшение загрязненности продуктов реакции — все это привлекает серьезное внимание к иммобилизованным ферментам на протяжении последних десятилетий. Иммобилизованные ферменты применяются в таких областях, как пищевая промышленность, фармацевтика, медицина и тонкий органический синтез.

Основным недостатком иммобилизованных ферментов является снижение их ак-

тивности, которое может быть связано как с самим процессом иммобилизации, когда фермент становится неактивным из-за неблагоприятных условий иммобилизации (температура, рН, химические реагенты, нестабильность белка при длительной инкубации в растворе), так и с неизбежными проблемами диффузии субстратов и продуктов реакции к/из активного центра фермента. Изменением условий иммобилизации можно добиться значительного увеличения активности полученного биокатализатора.

При приготовлении иммобилизованного биокатализатора мы использовали разработанную нами схему: раствор фермента в воде смешивали с раствором ацетата хитозана в буфере (рН 5,6), потом полученную смесь высушивали с образованием пленки. Эту пленку обрабатывали раствором глутарового альдегида (ГА) и затем отмывали от слабосвязанного белка. Такие биокатализаторы мы назвали биоконкомпозитами, поскольку фермент в них распределен по всему объему пленки. Основание Шиффа, которое получается при взаимодействии аминокрупп хитозана или фермента с ГА, стабильно в нейтральных и щелочных средах. Было изучено влияние концентрации раствора ГА и показано, что раствор с содержанием ГА 2% является оптимальным как для содержания фермента в получаемых образцах, так и для их гидролитической активности.

В работе использовались сериновые протеиназы субтилизин и химотрипсин, а также цистеиновая протеиназа папаин. Для измерения гидролитической активности использовались высокоспецифичные хромогенные пептидные субстраты: активность субтилизина измерялась по Glp-Ala-Ala-Leu-pNA [1, 2], химотрипсина — по Glp-Phe-pNA, папаина — по Glp-Phe-Ala-pNA [3]. При измерении активности следили за изменением оптического поглощения при 410 нм от времени гидролиза.

Мы проверили, как будет себя вести биоконкомпозит, не обработанный сшивающим агентом. Оказалось, что он содержал фермент (8,4 мг/г) и обладал гидролитической активностью, но не очень высокой (7 мкмоль/мин*г биокатализатора). При обработке пленки хитозан/субтилизин глутаровым альдегидом содержание фермента было в три раза выше. При этом для растворения хитозана использовалась разбавленная уксусная кислота (1%), рН около 3, что отрицательно влияет на активность и стабильность фермента, поскольку известно, что субтилизин необратимо денатурирует при рН ниже 4,5.

Основание Шиффа также обладает низкой стабильностью в кислой среде. Поэтому в дальнейших исследованиях использовалась предварительно полученная соль хитозана — ацетат хитозана, который растворялся в ацетатном буфере, рН 5,6, что близко к нейтральному диапазону значений рН. Используя ацетат хитозана, удалось увеличить как нагрузку, так и активность биоконкомпозитов, а двукратная обработка глутаровым альдегидом приводила к нагрузкам около 112 мг белка на грамм биокатализатора, т. е. 11% пленки (по весу) — это фермент. Активность также была довольно высока (110 мкмоль/мин*г биокатализатора).

В оптимизированных условиях были иммобилизованы папаин и химотрипсин, и значения нагрузки составили 95 и 72 мг/г, а активность — 8,4 и 9,8 мкмоль/мин*г биокатализатора соответственно.

Было проверено, как долго будет сохраняться активность пленки биоконкомпозита субтилизин/хитозан при хранении в сухом виде в холодильнике. В течение почти двух недель полностью сохранялась исходная активность, и даже через 6 месяцев осталось еще 87% активности, что свидетельствует о высокой стабильности фермента. Это означает, что молекулы фермента находятся в благоприятном окружении, не происходит агрегации и автолиза протеиназ, т.е. молекулы фермента пространственно разделены.

Была изучена зависимость активности и нагрузки от исходной концентрации двух ферментов — субтилизина и папаина. С увеличением концентрации исходного раствора фермента нагрузка и активность сначала возрастают, а начиная с некоторой концентрации практически перестают увеличиваться, выходят на плато. Эта концентрация фермента составляет 75 мг/мл и была выбрана как оптимальная.

Была исследована зависимость активности пленки субтилизин/хитозан от рН и температуры реакции. Известно, что после иммобилизации может происходить расширение и сдвиг рН-оптимума работы фермента. В нашем случае зависимость имеет типичный колоколообразный вид и сдвига рН-оптимума не наблюдалось, а расширение действительно есть, активность была выше в области как кислых, так и щелочных зна-

чений рН. Так, при рН 3,9 нативный фермент полностью терял свою активность, а пленка субтилизин/хитозан сохраняла 14% от максимальной активности.

Часто иммобилизация приводит и к температурной стабилизации действия фермента. В нашем случае наблюдался значительный сдвиг температурного оптимума в область высоких температур. Если для нативного фермента максимальная активность наблюдается в диапазоне от 30 до 60 °С, при 70 °С ее остается около 70%, а при 80 °С ее совсем не удается детектировать, то для иммобилизованного фермента активность растет с ростом температуры до 70 °С, и при 80 °С остается еще около 70% активности. Через 5 мин при 70 °С нативный фермент инактивируется полностью, а иммобилизованный сохраняет 40% активности.

Были измерены кинетические параметры гидролиза высокоспецифичного хромогенного субстрата Glp-Ala-Ala-Leu-pNA субтилизином. При иммобилизации константа Михаэлиса уменьшается больше чем на порядок, а кинетическая константа — в 20 раз. Это происходит скорее всего по нескольким причинам: ограничение подвижности фермента, частичная инактивация в процессе иммобилизации и ограничение доступа субстрата в активный центр фермента, а также диффузии продукта от фермента.

Мы проверили амидазную (по соответствующим высокоспецифичным хромогенным субстратам), эстеразную (по *п*-нитрофенилацетату) и протеазную (по азоказеину) активности полученных препаратов и сравнили с активностью нативных ферментов. Для иммобилизованного субтилизина по высокоспецифичному хромогенному субстрату Glp-Ala-Ala-Leu-pNA активность составляет 3–5% от активности нативного фермента.

Необходимо учитывать, что активность нативного фермента измеряется при концентрации субстрата порядка 1–2 констант Михаэлиса. Обычно активность иммобилизованного фермента проверяется в тех же условиях, хотя, как показано выше, при иммобилизации K_m сильно меняется. Если измерить активность иммобилизованного и нативного субтилизина при концентрации субстрата, равной 2 K_m для биокомпозита, то активность будет составлять 15–25% от активности нативного фермента.

Для химотрипсина после иммобилизации остается 37% от активности нативного фермента по высокоспецифичному субстрату, а для папаина — около 10%. Поскольку для этих ферментов кинетические параметры еще не получены, то активность измерялась в стандартных условиях для измерения активности нативного фермента.

Эстеразная активность пленок протеиназа/хитозан сохраняется на очень высоком уровне. Для папаина по этому субстрату не удалось измерить активность, так как нативный фермент не гидролизует этот субстрат. Удивительно, что по высокомолекулярному белковому субстрату азоказеину сохраняется довольно высокая активность (45% для субтилизина, 42% для химотрипсина и 20% для папаина), что означает возможность доступа больших субстратов к значительной части иммобилизованного фермента.

Показана возможность многократного использования пленки субтилизин/хитозан в гидролитических реакциях в течение 7 циклов без существенного изменения гидролитической активности.

Биологическая роль протеиназ состоит в гидролизе связей между аминокислотными остатками в полипептидах и белках. При определенных условиях возможно использование протеолитических ферментов и в обратной реакции синтеза пептидных связей. Одним из путей сдвига равновесия является уменьшение содержания воды в системе. Известно, что добавление гидрофильных органических растворителей сильно инактивирует ферменты, и здесь иммобилизация является незаменимым способом увеличения активности ферментов.

Была изучена стабильность препарата субтилизин/хитозан при хранении в ацетонитриле — растворителе, часто применяющемся в ферментативном пептидном синтезе. Образцы пленок выдерживались под ацетонитрилом некоторое время, а затем активность измерялась в стандартных условиях. Оказалось, что пленка биокомпозита хорошо выдерживает хранение в безводной среде, полностью сохраняя свою активность в течение 3-х суток, и даже через 18 сут остается еще около 70% от исходной активности.

Синтазная активность пленки субтилизин/хитозан была проверена на реакции получения Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA. Для субтилизина исходные фрагменты Z-Ala-Ala-

Leu-ОМЕ и Phe-*p*NA очень хорошо отвечают специфичности фермента, и выход составил 80% за 40 мин и доходил до 100% за сутки.

Методом зондовой микроскопии была изучена морфология тонких пленок биокомпозита субтилизин Карлсберг/хитозан. Сначала исследовалась морфология границы поверхности полученных пленок субтилизин/хитозан. Измерения проводились рядом со срезом пленки. Установлено, что толщины пленок, полученных при высыхании капли, скользящей по наклонной поверхности, составляют 500–800 нм, а в случае спиннингования, раскручивания капли — около 200 нм. Затем исследовалась морфология поверхности пленок тех же образцов.

Оказалось, что для исследованных пленок наиболее типичным является присутствие на поверхности неупорядоченных неоднородностей с латеральными размерами от десятков до сотни нанометров, из которых, в свою очередь, формируются более крупные неоднородности с характерными латеральными размерами порядка микрона. Результаты АСМ-исследований позволяют сделать вывод о том, что подавляющее большинство получаемых пленок являются сплошными и не имеют сквозных пор.

Работа поддержана грантом РФФИ № 06-03-33056а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бачева А.В., Исаков М.С., Лысогорская Е.Н. и др. Эффективный биокатализатор для реакций гидролиза и синтеза пептидов — биокомпозит субтилизин Карлсберг/хитозан // Биоорг. Химия. 2008. Т. 34. № 3. С. 371–375.
2. D.J. Macquarrie, A.V. Bacheva. Efficient subtilisin immobilization in chitosan, and peptide synthesis using chitosan–subtilisin biocatalytic films// Green Chemistry. 2008. № 10. P. 692–695.
3. Семашко Т. А., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., и др. Химико-энзиматический синтез новых флуорогенных субстратов цистеиновых протеиназ семейства папаина // Биоорг. химия. 2008. Т. 34. № 3. С. 376–381.