

СТАБИЛИЗАЦИЯ АКТИВНОСТИ БРОМЕЛИНА, ПАПАИНА И ФИЦИНА ПУТЕМ ИХ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ С ГРАФТ-СОПОЛИМЕРАМИ ХИТОЗАНА И *N*-ВИНИЛИМИДАЗОЛА

А.В. Сорокин^{1,2}, С.С. Ольшанникова¹, М.С. Лавлинская^{1,2}, М.Г. Холявка¹, В.Г. Артюхов¹

¹ ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия

² ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия

Протеолитические ферменты являются одними из наиболее часто используемых в различных сферах деятельности человека энзимами, что обусловлено значительным количеством их практически важных свойств. Так, например, растительные цистеиновые протеазы бромелин (КФ 3.4.22.32/3.4.22.33), папаин (КФ 3.4.22.2) и фицин (КФ 3.4.22.3) характеризуются широкой субстратной специфичностью в физиологических значениях рН среды и температуры и вследствие этого обладают противовоспалительным и антибактериальным действием. Однако, как и абсолютное большинство протеолитических энзимов, указанные ферменты обладают низкой стабильностью и склонностью к автолизу, что ограничивает их применение в биомедицине, биофармацевтике и биотехнологии. В связи с этим, целью настоящей работы является стабилизация активности цистеиновых протеаз – бромелина, папаина и фицина – путем их комплексобразования с графт-сополимерами хитозана и *N*-винилимидазола.

Графт-сополимеры хитозана с молекулярной массой 350 кДа и степенью деацетилирования 0.85 (ООО «Биопрогресс», РФ) и *N*-винилимидазола (Sigma Aldrich, Германия) с различным содержанием звеньев последнего получали растворной радикальной прививочной полимеризацией в присутствии иницирующей смеси персульфата калия и метабисульфита натрия. Полученные сополимеры охарактеризованы методами ИК-спектроскопии, динамического рассеяния света и лазерного доплеровского микроэлектрофореза. Показано, что сополимеры независимо от состава водорастворимы и проявляют поликатионные свойства и склонность к самоассоциации, а размер их частиц в водном растворе и величина заряда поверхности последних коррелирует с содержанием привитых цепей поли-*N*-винилимидазола в макромолекулах.

Исследование взаимодействия синтезированного графт-сополимера с цистеиновыми протеазами методом ИК-спектроскопии показало, что в процессе образования комплекса принимают участие функциональные группы как основной хитозановой цепи, так и боковые винилимидазольные фрагменты синтезированных макромолекул. Методом гибкого молекулярного докинга показано, что связывание цистеиновых протеаз происходит с вовлечением в процесс аминокислот активного центра ферментов. При этом протеолитическая активность полученных ферментных препаратов, определенная спектрофотометрически по продуктам гидролиза субстрата азоказеина, достигает в некоторых случаях 100 % от значения величины нативного белка.

Комплексообразование бромелина, папаина и фицина с синтезированным графт-сополимером хитозана и *N*-винилимидазола значительно увеличивает стабильность ферментных препаратов. После однодневной инкубации при 37 °С в 50 мМ Трис-НСl буфере с рН 7.5 иммобилизованный фицин сохраняет более 97 % своей активности, в то время как нативный – только около 51 %; бромелин проявляет 84 % и 53 % протеолитической активности для иммобилизованного и нативного белка, соответственно. Иммобилизованный папаин сохраняет 80 % активности после пятидневной инкубации, в то время как для нативного фермента эта величина составляет только 57 %. По прошествии 7 и более дней различия в потере каталитической способности нативных и иммобилизованных ферментов становились более значительными.

Таким образом, показано, что комплексобразование бромелина, папаина и фицина с графт-сополимерами хитозана и *N*-винилимидазола – перспективный способ стабилизации протеолитической активности рассматриваемых ферментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 21-74-20053