

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОЛЛАГЕНАЗЫ, СВОБОДНОЙ И ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА МАТРИЦЕ ХИТОЗАНА

С.М. Панкова, Ф.А. Сакибаев, Т.Н. Беляева, А.Н. Дубовицкая, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Коллагеназа (КФ 3.4.4.19) – фермент семейства металлопротеаз, способный к гидролизу коллагена. Молекулярная масса клостридиальных коллагеназ составляет 68–130 кДа. Значения изоэлектрической точки коллагеназы – 5.62 [1]. Бактериальная коллагеназа может быть использована в диагностических и лабораторных целях: для удаления некротических тканей из ран, лечения заболеваний глаз, операционных спаек, для профилактики морщин, ускорения рассасывания швов и рубцовых образований [2]. Одна из наиболее перспективных задач современной медицинской биотехнологии – создание биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов для применения в лечебных и фармацевтических целях.

Хитозан – аминополисахарид животного происхождения, деацилированная производная хитина, широко используемая как перспективный носитель для иммобилизации ферментов, ввиду ряда ценных характеристик. Он нетоксичен, неиммуногенен, обладает высокой сорбционной ёмкостью, проявляет антибактериальное и противогрибковое действие, влияет на процессы регенерации поврежденных кожных покровов, биodeградируеm естественным метаболическим путем. [3]

Методом адсорбции нами были получены гетерогенные биопрепараты коллагеназы, иммобилизованной на матрицах кислоторастворимых среднемoleкулярного ($M_r = 200$ кДа, степень деацетилирования – 82 %) и высокомолекулярного ($M_r = 350$ кДа, СД = 94.85 %) хитозанов [4]. Изучена зависимость протеолитической активности свободной коллагеназы и полученных гетерогенных биокатализаторов от температуры инкубации, кислотности среды и концентрации субстрата – азоказеина.

Выявлено, что иммобилизация коллагеназы на матрице хитозана приводит к сдвигу температурного оптимума в сторону более высоких температур (с 37 до 40 °C). Оптимальное значение pH для функционирования нативного фермента равно 7.5. Сорбированный на матрицах хитозана энзим высоко активен при pH 7.0–7.5. Значения K_m и V_{max} для иммобилизованной на высокомолекулярном хитозане и свободной коллагеназы не отличаются; у фермента, сорбированного на среднемoleкулярном хитозане, наблюдается снижение максимальной скорости реакции и изменение степени сродства энзима к субстрату. Иммобилизация коллагеназы на матрицах кислоторастворимых среднемoleкулярного и высокомолекулярного хитозанов приводит к повышению стабильности фермента по отношению к денатурирующим факторам, в частности к воздействию высоких температур.

Работа выполнена при финансовой поддержке в форме гранта, выполняемых молодыми учеными под руководством кандидатов и докторов наук в научных организациях Российской Федерации РФФИ 19–34–50042 мол_нр.

ЛИТЕРАТУРА

1. H.E. Van Wart // Handbook of proteolytic enzymes. – 3rd Edn. – Academic Press, 2013. – V. 1. – P. 607–611.
2. U. Eckhard, D. Nu, P. Ducka, E. Scho, Brandstetter H. // Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications. J. 64, (2008).
3. М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов Иммобилизованные биологические системы: биофизические аспекты и практическое применение: учебное пособие / Воронежский государственный университет. – Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2017. – 261 с.
4. М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов, С.М. Сазыкина Исследование процессов УФ-модификации свободного и иммобилизованного трипсина // Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. Т. 57. № 1. С. 66–70.