

ИЗУЧЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ПОЛНОТЫ ГИДРОЛИЗА АЗОКАЗЕИНА ЦИСТЕИНОВЫМИ ПРОТЕАЗАМИ ОТ ВРЕМЕНИ ИНКУБАЦИИ**В.А. Королева^{1,2}, Ю.А. Редько¹, М.Г. Холявка¹, В.Г. Артюхов¹**¹ Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия² Воронежский государственный университет им. Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

Протеазы растительного происхождения используются в различных сферах производства: для смягчения мяса в пищевой промышленности, для осветления напитков в пивоварении, на их основе изготавливают ранозаживляющие препараты для медицины и ветеринарии.

Фицин (КФ 3.4.22.3) получают из высушенного латекса растений рода *Ficus*. Оптимальный диапазон pH для фермента составляет от 5,0 до 8,0, а оптимальная температура – от 45 до 55 °C [1]. Папаин (КФ 3.4.22.2) выделяют из латекса *Carica papaya*. Папаин проявляет протеазную, амидазную, эстеразную, трансамидазную, трансэстеразную и тиолэстеразную виды активности. Оптимальный диапазон pH для проявления каталитической способности папаина варьирует в зависимости от природы субстрата в пределах 5,0–7,0, а диапазон оптимальных температур составляет 50–65 °C. Бромелин экстрагируют из стеблей (КФ 3.4.22.32) и незрелых плодов (КФ 3.4.22.33) *Ananas comosus* из семейства Bromeliaceae. Оптимальный уровень pH для проявления активности бромелина составляет 6,0–8,5 для большинства субстратов при 50–60 °C.

Хитозан является перспективным материалом для биомедицинской и фармацевтической промышленности. Хитозаны могут быть использованы при разработке способов направленной доставки лекарственных средств, они контролируют высвобождение, абсорбцию и биоадгезию медицинских субстанций.

Для любой сферы применения протеолитических ферментов важно знать время полного гидролиза субстрата тем или иным энзимом.

Цель работы – изучение зависимости полноты гидролиза азоказеина протеолитическими ферментами (фицином, бромелином и папаином) от времени инкубации.

Объектами исследования являлись фицин, папаин и бромелин (Sigma-Aldrich). Носителями для иммобилизации служили средне- и высокомолекулярный хитозаны (ЗАО «Биопрогресс»). В качестве субстрата для гидролиза был выбран азоказеин (Sigma-Aldrich). Для иммобилизации фицина и папаина на матрицах средне- (pH 10,0 и 9,0) и высокомолекулярного (pH 8,6 и 9,0) хитозанов использовали 0,05 М глициновый буфер. Для сорбции бромелина на матрицах средне-и высокомолекулярного хитозанов использовали 0,05 М трис-глициновые буферы со значениями pH 9,0 и 8,5 соответственно. Инкубация ферментов с субстратом проводилась при оптимальных температурах (37 °C – для фицина, при 60 °C – для папаина и бромелина) в течение 10, 20, 30, 60, 90, 120 и 150 минут.

В ходе анализа значений общей активности (в единицах на мл раствора фермента) было показано, что максимальное количество продуктов гидролиза азоказеина можно наблюдать уже при 30 минутах инкубации. При увеличении времени инкубирования показатели активности фицина, бромелина и папаина варьируют в пределах 5 %. Причем, иммобилизация энзимов не приводит к увеличению скорости гидролиза субстрата.

Таким образом, было показано, что 30-минутная инкубация для 0,5 % раствора азоказеина растительными протеазами является оптимальной.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023–2025 годы, проект № FZGU-2023-0009

Литература

1. 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. T. 180. C. 161–176.