

ПОВЫШЕНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И СТАБИЛЬНОСТИ ХИМОТРИПСИНА ЗА СЧЕТ КОВАЛЕНТНОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ Fe_3O_4 *

Изучены современные химические способы модификации ферментов, позволяющие увеличить каталитическую активность и стабильность. Представлены преимущества использования магнитных наночастиц для получения стабильных иммобилизованных ферментных препаратов. Установлено, что иммобилизация химотрипсина на наночастицах Fe_3O_4 , модифицированных аминогруппами, приводит к переходу 88 % фермента в твердую фазу. Показано изменение оптимальных диапазонов температур и pH, а также повышение стабильности для иммобилизованного химотрипсина по сравнению с нативным.

Каталитическая активность, магнитные наночастицы, химотрипсин, глутаральдегидная методика, иммобилизация.

Человечество использует ферменты для приготовления продуктов питания с незапамятных времен. Эмпирическим путем люди выяснили, что существуют природные субстраты, которые при внесении их в тот или иной вид сырья вызывают в нем желательные изменения. Изучать ферменты начали в XVIII в., когда были открыты пищеварительные ферменты, а также выделены ферменты из биологических объектов: пероксидаза из хрена, α -амилаза из зерна и др. В XIX в. получены первые чистые формы ферментов и предложен термин «энзим». Возникновение энзимологии как самостоятельной научной дисциплины стало возможным с развитием химии, биологии и медицины [1].

Достижения современной энзимологии значительно расширили возможности применения ферментов, в первую очередь в медицине и пищевой промышленности. Это обусловлено их очевидными преимуществами по сравнению с химическими катализаторами: избирательность и стереоспецифичность действия, возможность достижения высоких скоростей превращения субстратов при относительно мягких условиях технологии, безвредность для окружающей среды и человека [1, 2].

В пищевых технологиях используют главным образом ферменты, присутствующие в пищевом сырье, которые поступают в организм человека при потреблении свежих фруктов и овощей, орехов, молока, сброженных и консервированных продуктов. Продолжается поиск новых возможностей использования ферментов в различных биотехнологических областях. Основными направлениями исследования являются следующие: модификация свойств индивидуальных ферментов с целью повышения их активности и удешевления целевых продуктов; скрининг новых микроорганизмов-продуцентов ферментов; получение новых рекомбинантных ферментов с заданными свойствами; применение ферментативных реакций для получения ценных

пищевых ингредиентов и биологически активных веществ; разработка пищевых нанотехнологий с использованием ферментов [2].

Современные методы модификации ферментов позволяют увеличивать стойкость энзимов к действию различных химических реагентов и ингибиторов, pH, температурному воздействию; изменять pH оптимума ферментов, их субстратную специфичность и связывающие свойства; регулировать предпочтения определенных металлов-кофакторов и каталитические свойства ферментов [2].

Наиболее известным способом модификации ферментов является их химическая модификация [3, 4], методы которой должны отвечать ряду требований. Во-первых, используемые химические реагенты должны быть безвредными, особенно в случаях дальнейшего использования ферментов в пищевых технологиях. Во-вторых, условия модификации не должны быть жесткими, приводящими к ухудшению свойств ферментов. В-третьих, модифицированные ферменты должны отделяться от реакционной среды относительно простыми и недорогими способами. Наконец, применение модифицированных ферментов должно быть экономически выгодным [4].

Примером химической модификации ферментов служит использование неполярной среды [5]. Происходящее при этом снижение активности воды в реакционной системе существенно изменяет свойства ферментов, а именно: реакция сдвигается в сторону синтеза; повышается термостабильность фермента и стабильность при хранении; фермент приобретает способность катализировать новые реакции, не протекающие в водной среде; энзимы проявляют активность в органических растворителях при температуре выше 100 °С. Способ химической модификации применим для таких ферментов, как липаза, химотрипсин, трипсин, субтилизин, термоллизин, полифенолоксидаза, глюкоамилаза, папаин, химозин.

*Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы. Гос. контракт П 20-64.

К активно развивающимся областям энзимологии относится разработка биологических методов модификации ферментов. Особенно многообещающим является направление, получившее название «белковая инженерия». Методы белковой инженерии, основанные на знании зависимости между аминокислотной последовательностью, трехмерной структурой и каталитической активностью ферментов, позволяют успешно модифицировать ферменты для улучшения их технологических свойств [6, 7]. Широко используется способ замены определенных аминокислот в структурах молекул ферментов.

Путем замены аминокислот в структурах молекул ферментов можно варьировать также их субстратную специфичность [8]. Например, изменение соотношения активности к растворимому и нерастворимому субстратам у целлобиогидролаз достигается путем замены внешних остатков ароматических аминокислот, которые захватывают конец молекулы полисахарида и направляют ее внутрь активного центра. Увеличение стабильности ферментов к температуре и экстремальным значениям pH достигается путем таких замен среди сближенных в его третичной структуре аминокислотных остатков, которые приводят к образованию дополнительных нековалентных гидрофобных связей, солевых мостиков или ковалентных S-S-связей, повышающих общую стабильность глобулы молекулы фермента.

Химотрипсин – это фермент класса гидролаз, расщепляющий белки и пептиды преимущественно по связям, образованным ароматическими аминокислотами – тирозином, фенилаланином, триптофаном. Химотрипсин является одним из наиболее часто используемых ферментов в различных областях биотехнологии, в том числе в пищевой промышленности. Для регуляции каталитической активности этого фермента в литературе предлагаются различные приемы: изменение степени гидратации в системах гидратированных обращенных мицелл поверхностно-активных веществ [9]; использование неполярных растворителей; адсорбция; удерживание в пористых матрицах; ковалентное связывание; электрохимическая полимеризация и др. Однако в большинстве случаев эти приемы приводят к снижению протеолитической активности и повышению константы Михаэлиса химотрипсина в результате конформационных изменений.

Одним из определяющих направлений в подобных исследованиях является иммобилизация фермента на различных органических и неорганических носителях, как природных, так и синтетических. Такой способ универсален, поскольку отличается простотой применяемых методик, обеспечивает равномерное распределение фермента в объеме носителя и получение стабильных, хорошо воспроизводимых по аналитическим характеристикам иммобилизованных препаратов. Кроме того, закрепление ферментов на твердых носителях позволяет значительно улучшить механические свойства ферментных препаратов.

Среди большого разнообразия носителей для иммобилизации биомолекул в последнее время значительный интерес исследователей проявляется к наночастицам [10, 11]. Повышенное внимание к наноматериалам обусловлено тем, что при переходе в наноразмерное состояние происходит изменение ряда фундаментальных свойств вещества. Одним из главных факторов, определяющих физические характеристики наноразмерных объектов, выступает развитая поверхность, что способствует преобладанию поверхностных явлений. Благодаря своим размерам, сопоставимым с размерами клеток, вирусов, белков, ДНК, наночастицы могут приближаться к биообъекту, взаимодействовать и связываться с ним.

Таким образом, в настоящее время нанотехнология признана мировой общественностью приоритетным направлением исследований, интегрирующим передовые научные достижения в области физики, химии и биологии. Эта дисциплина имеет громадный потенциал, реализация которого затрагивает все сферы жизнедеятельности человека. Ключевым аспектом современных исследований в области нанобиотехнологии является разработка подходов к высокоточному управлению живыми системами на субклеточном уровне.

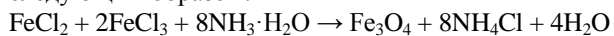
В связи со всем вышесказанным настоящее исследование направлено на оптимизацию условий образования высокоактивного и стабильного иммобилизованного ферментного препарата химотрипсина на основе наночастиц Fe_3O_4 , а также оценка перспективности и целесообразности его использования в различных биотехнологических областях.

Условием успешной иммобилизации фермента является количество активных групп на поверхности носителя. Однако на поверхности наночастиц Fe_3O_4 практически отсутствуют реакционноспособные группы, которые можно было бы использовать для ковалентного связывания фермента, поэтому возникает необходимость их предварительной химической модификации. В литературе описаны различные способы модификации наночастиц Fe_3O_4 : алкилирование, ацетилирование, аминирование, силанизирование, покрытие полисахаридами, полианилином и т.д. Используя аминогруппы на поверхности модифицированных наночастиц и аминогруппы фермента, можно осуществить ковалентную иммобилизацию химотрипсина с помощью глутарового альдегида, выступающего в роли спейсера.

В работе использовали кристаллический α -химотрипсин (Sigma, США) с активностью 40–60 ед/мг. Глутаровый альдегид (70 %), L-тирозин (99,9 %) – продукты фирмы Sigma-Aldrich-Louis (США). Казеинат натрия с массовой долей белка 92 % предоставлен фирмой Velka (Москва). Остальные использованные реактивы марки «х.ч.» – отечественного производства.

Наночастицы Fe_3O_4 получали с использованием методики Массарта [12] путем взаимодействия

0,25 М растворов хлоридов железа (II) и (III) в соотношении 1:2 при комнатной температуре с добавлением 30 % (m/m) раствора NH₄OH. Образующийся осадок подвергали нагреванию до 80 °С в течение 30 мин при постоянном перемешивании и несколько раз промывали водой и этанолом, после чего наночастицы Fe₃O₄ отделяли от супернатанта с помощью магнитного сепаратора. Завершающей стадией получения наночастиц являлось их высушивание под вакуумом при температуре выше 70 °С [15]. Схематически реакцию образования Fe₃O₄ можно представить следующим образом:



Модификацию поверхности наночастиц осуществляли, инкубируя частицы с мочевиной и диметилформамидом при температуре 300 °С. Мочевина использовалась для аминирования поверхности. По окончании реакции наночастицы Fe₃O₄, модифицированные аминогруппами, промывали несколько раз дистиллированной водой до полного удаления примесей и сушили при 25 °С. Промытые наночастицы уравнивали 0,1 М фосфатным буфером (pH 7,4), добавляли 25 %-ный глутаровый альдегид и активно перемешивали при комнатной температуре в течение двух часов. По окончании инкубации наночастицы промывали несколько раз дистиллированной водой.

Процесс иммобилизации химотрипсина проводили, добавляя фермент в среду с модифицированными наночастицами, предварительно суспендированными в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4). Для удаления не связанного ковалентно иммобилизованного препарата 3 раза промывали дистиллированной водой, 1 %-ным водным раствором хлористого натрия и 1 %-ным спиртовым раствором хлористого натрия. Иммобилизованный препарат химотрипсина высушивали при 4 °С и хранили в виде суспензии в 0,1 М фосфатном буфере при 4 °С.

Количество иммобилизованного фермента оценивалось по разности концентраций белка в реакционной смеси до и после инкубирования химотрипсина с наночастицами Fe₃O₄. Содержание белка определяли методом Дюма, основанным на измерении теплопроводности молекулярного азота, образующегося после сжигания анализируемого образца при температуре около 1000 °С в атмосфере кислорода и последующего восстановления всех образующихся оксидов азота при помощи восстанавливающего агента (меди), с использованием анализатора белкового азота RAPID N Cube (Elementar, Германия).

Протеолитическая активность нативного и иммобилизованного фермента оценивалась в соответствии с модифицированной методикой Ансона (ГОСТ 20264.2-88 «Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности»), основанной на определении скорости ферментативной реакции гидролиза казеината натрия исследуемым ферментным препаратом до пептидов и аминокислот с последующим их

определением по колориметрической реакции с реактивом Фолина.

Результаты измерений обрабатывали с применением методов математической статистики.

В ходе эксперимента показано, что инкубация химотрипсина с наночастицами Fe₃O₄, модифицированными аминогруппами, в присутствии глутарового альдегида в течение шести часов приводит к переходу 88 % изучаемого фермента в твердую фазу (рис. 1). Для создания оптимальных условий (pH, температура, состав буферного раствора для иммобилизации и т.д.) выбрали такие параметры, чтобы в процессе иммобилизации значение протеолитической активности достигало максимальной величины.



Рис. 1. Зависимость массовой концентрации белка в контактном растворе от продолжительности иммобилизации

Важными характеристиками ферментов, определяющими их каталитическую активность, являются оптимальные диапазоны температур и pH. В связи с этим одной из задач настоящего исследования являлось изучение влияния иммобилизации химотрипсина на оптимальные условия функционирования фермента. Показано, что нативный и иммобилизованный фермент проявляет максимальную каталитическую активность при pH 8,0 (рис. 2), однако диапазон оптимальных значений pH при использовании иммобилизованного энзима значительно шире, чем для нативного химотрипсина. Оптимальная температура действия нативного и иммобилизованного химотрипсина различна. Оптимум температуры смещен на 5 °С для гетерогенного катализатора по сравнению с нативным химотрипсином (рис. 3).

На основании данных, полученных при исследовании стабильности суспензии иммобилизованного ферментного препарата в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4) при хранении в сухом, защищенном от света месте при температуре (4±2) °С (рис. 4), можно сделать вывод о снижении каталитической активности как для нативного, так и для иммобилизованного химотрипсина в процессе хранения. Полная инактивация отмечена для нативного химотрипсина по истечении 20 суток

хранения. В отличие от нативного фермента химотрипсин, закрепленный на наночастицах, модифицированных аминокислотами, сохраняет 20 % каталитической активности после 25 суток хранения. Следовательно, иммобилизация химотрипсина на наночастицах Fe_3O_4 приводит к стабилизации фермента.

Таким образом, ковалентное связывание химотрипсина с поверхностно-модифицированными наночастицами позволяет получать высокоактивные и стабильные иммобилизованные препараты для использования в различных областях биотехнологии. Кроме того, варьирование условий иммобилизации позволяет направленно регулировать свойства ферментных препаратов в зависимости от конкретных биотехнологических задач.

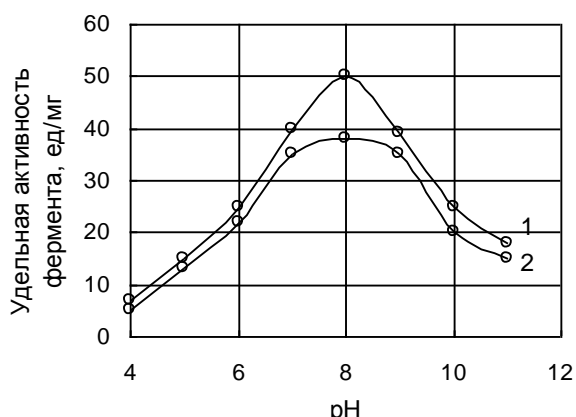


Рис. 2. Зависимость удельной активности химотрипсина от величины pH реакции: 1 – нативный фермент; 2 – иммобилизованный фермент

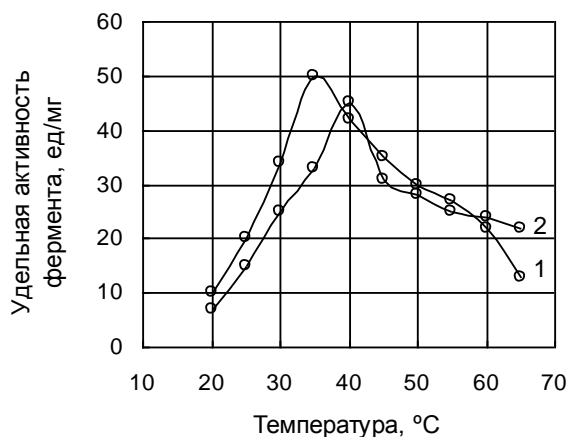


Рис. 3. Зависимость удельной активности химотрипсина от температуры реакции: 1 – нативный фермент; 2 – иммобилизованный фермент

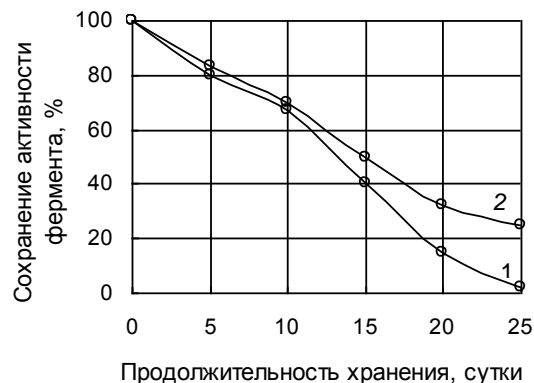


Рис. 4. Зависимость каталитической активности химотрипсина от продолжительности хранения: 1 – нативный фермент; 2 – иммобилизованный фермент

Список литературы

1. Волова, Т.Г. Биотехнология / Т.Г. Волова. – Новосибирск: Издательство СО РАН, 1999. – 252 с.
2. Хиггинс, И. Биотехнология / под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. – М.: Мир, 1988. – 479 с.
3. Эггинс, Б. Химические и биологические сенсоры / Б. Эггинс // Техносфера. – 2005. – № 3. – С. 25–31.
4. Грачева, И.М. Технология ферментных препаратов / И.М. Грачева. – М.: Агропромиздат, 1985. – 502 с.
5. Антипова, Л.В. Применение ферментов в переработке вторичного молочного сырья / Л.В. Антипова. – М.: АгроНИИТЭИММП, 1992. – 234 с.
6. Андреева, И.Н. Иммобилизация ферментов и других биологически активных веществ: учеб. пособие / И.Н. Андреева, А.В. Пантюхин, Б.Б. Сысуев. – Пятигорск: Пятигорская государственная фармацевтическая академия, 2001. – 340 с.
7. Березин, И.В. Биотехнология: учеб. пособие для вузов. Кн. 7: Иммобилизованные ферменты / И.В. Березин. – М.: Высшая школа, 1987. – 159 с.
8. Березин, И.В. Инженерная энзимология / И.В. Березин, А.А. Клесов, В.К. Швядос. – М., 1987. – 187 с.
9. Диксон, М. Ферменты. Т. 1, 2 / М. Диксон, Э. Уэбб. – М.: Мир, 1982.
10. Berry, C. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine / C. Berry, A. Curtis // J. Phys. D. Appl. Phys. – 2003. – P. 36.
11. Gu, H. Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection / H. Gu, K. Xu, C. Xu // J. of the American Chemical Society Chem. Commun. – 2006. – P. 941–949.
12. Massart, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media / R. Massart // IEEE Trans. Magn. – 1985. – P. 1247–1248.

ГОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности»,
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей,
47.
Тел./факс: (3842) 73-40-40

SUMMARY

L.S. Soldatova, O.O. Babich

Increase of catalytic activity and stability of chymotrypsin due to covalent immobilization on magnetic nano-particles Fe₃O₄

Modern chemical ways of enzyme modification allowing to increase catalytic activity and stability have been studied. The advantages of using magnetic nano-particles for obtaining stable immobilized ferment preparations are presented. It has been established that immobilization of chymotrypsin on nano-particles Fe₃O₄, modified by amino groups, leads to transition of 88 % of enzyme into solid phase. The change of optimum ranges of temperatures and pH and the increase of stability for immobilized chymotrypsin in comparison with free one has been shown.

Catalytic activity, magnetic nanoparticles, chymotrypsin, glutaraldehyde method, immobilization.