

ТЕРМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕАЗ: «КЛЮЧЕВЫЕ СТАДИИ»

© 2021 г. В.А. Королева, С.С. Ольшанникова, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов

Воронежский государственный университет, 394018, Воронеж, Университетская пл., 1

E-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила в редакцию 30.11.2019 г.

После доработки 17.06.2020 г.

Принята к публикации 04.02.2021 г.

Изучены процессы термоинактивации фицина, бромелина и папаина в растворенном состоянии и иммобилизованных на матрицах среднемолекулярного (200 кДа) и высокомолекулярного (350 кДа) хитозанов. Показано, что нативный фицин инактивировался при 70°C после 10 мин нагревания, бромелин в растворе сохранял до 40% активности после 60 мин инкубации при 60 и 70°C, свободный папаин был устойчив при 70°C в течение всего времени экспозиции (60 мин). Для растворимых образцов фицина, бромелина и папаина характерна полная инактивация при 80 и 90°C после 10 мин инкубации. Иммобилизация фицина на матрицах обоих типов хитозанов увеличила его термостабильность (при 70°C каталитическая способность фермента составляла не менее 20%). Фицин, иммобилизованный на среднемолекулярном и высокомолекулярном хитозанах, полностью инактивировался при 80 и 90°C после 10 мин инкубации, тогда как сорбированные на матрице хитозана папаин и бромелин при названных условиях сохраняли более 10% каталитической способности от ее начального уровня.

Ключевые слова: фицин, бромелин, папаин, иммобилизация, термическая инактивация, хитозан.

DOI: 10.31857/S0006302921030029

Протеазы растительного происхождения используются в различных сферах производства. В пищевой промышленности эти ферменты выполняют роль смягчения мяса, в пивоварении их применяют для осветления напитков, используют в гидролизе глютена, для выделки кожи и других целей. Протеазы входят в состав различных детергентов, в медицине и ветеринарии на их основе изготавливают ранозаживляющие препараты [1–13].

Особый интерес представляют цистеиновые протеолитические ферменты, а именно фицин, бромелин и папаин, из-за их широкой субстратной специфичности и высокой активности в области повышенных температур. Общеизвестно, что высокие температуры предотвращают риск заражения нежелательной микрофлорой целевых продуктов и самих биокатализаторов, улучшают растворимость некоторых субстратов. Вместе с тем повышение температуры не только интенсифицирует процесс образования фермент-субстратного комплекса, но также может приводить к денатурации фермента и снижению его каталитической функции. Следовательно, необходимо получать препараты на основе природных биокатализаторов, которые будут подвержены термической инактивации при более высоких темпера-

турах по сравнению с теми, которые используют в промышленных реакторах [14].

Фицин (КФ 3.4.22.3) получают из высушенного латекса растений рода *Ficus* [15]. Известно, что фицин встречается в природе во множественных формах [16], разделяемых ионообменной хроматографией [17]. Оптимальный диапазон pH для фермента составляет от 5.0 до 8.0, а оптимальная температура – от 45 до 55°C [18].

Папаин (КФ 3.4.22.2) выделяют из латекса *Carica papaya* [19, 20]. Помимо своей протеазной активности папаин также проявляет амидазную, эстеразную, трансамидазную, трансэстеразную и тиолэстеразную активность [21, 22]. Оптимальный диапазон pH для проявления каталитической способности папаина варьирует в зависимости от природы субстрата в пределах 5.0–7.0. Этот фермент более термоустойчив по сравнению с другими протеазами [23].

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 активности бромелина 6.0–8.5 для большинства субстратов при температуре 50–60°C. Бромелин из плодов имеет более высокую протеолитическую активность по сравнению

с ферментом из стеблей и более широкую специфичность для пептидных связей [18, 24].

Несмотря на широкий спектр применения цистеиновых протеаз, растворимые ферменты существенным образом подвергаются воздействию экстремальных факторов (в том числе высоких температур и автолізу), приводящих к их инактивации посредством нарушения нативной конформации и агрегации.

Иммобилизация на нерастворимом носителе позволяет повысить термостабильность фермента: его молекулы закрепляются на матрице полимера, что затрудняет разворачивание его глобулы и препятствует тепловой денатурации, при этом также ограничиваются межмолекулярные контакты и предотвращается процесс автолиза протеолитических биокатализаторов [25].

Хитозан получают путем деацетилирования хитина. Он представляет собой неразветвленный полимер, образованный β -(1,4)-связанными глюкозаминовыми мономерами; гидроксильные и аминогруппы являются мишенями для химических модификаций, направленных на получение подходящих материалов для различных целей. Хитозан характеризуется высокой гидрофильностью, нетоксичностью, биосовместимостью и биоразлагаемостью, что позволяет применять его в фармацевтической технологии [26]. Молекулы хитозана содержат катионы, представленные аминогруппами, и анионы в виде гидроксильных групп; следовательно, хитозаны могут сорбировать ферменты, полисахариды и ионы металлов за счет электростатических взаимодействий [27–31].

Иммобилизация протеолитических ферментов на хитозане может быть выполнена методом простой адсорбции [32]. Есть несколько механизмов взаимодействия между белками и полисахаридами, основанные на электростатическом притяжении между противоположно заряженными группами в соответствующих условиях раствора [33] и/или за счет гидрофобных или ван-дер-ваальсовых взаимодействий как с последующим ковалентным присоединением к подложке, так и без него [34, 35].

Существует множество примеров использования иммобилизованных протеаз [36]. В частности, была проведена иммобилизация папаина на композитных гранулах, модифицированных волокнистым полимером хитозан/глина. Папаин обладает металлсвязывающими свойствами, благодаря присутствию сульфгидрильных групп в его активном центре, поэтому после иммобилизации фермент был использован для удаления ртути из ее водного раствора. [37]. Хитозан служил матрицей для иммобилизации бромелина и папаина. Полученные биокатализаторы были использованы в реакторе непрерывного действия для стабилизации белков белого вина [38]. Фицин был им-

мобилизован в полимерные нановолокна [39], на глиоксил-агарозе [40], что существенно повысило стабильность фермента.

Изучение процессов термической инактивации ферментов является одной из центральных проблем биофизики и позволяет выявить механизмы регулирования этими процессами. В связи с вышесказанным целью нашей работы было исследование «ключевых стадий» процессов термической инактивации свободных и иммобилизованных на матрице хитозана фицина, папаина и бромелина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были выбраны фицин, папаин и бромелин фирмы Sigma (США). В качестве носителя использовали кислоторастворимые хитозаны, синтезированные ЗАО «Биопрогресс» (Щелково Московской области), – среднемoleкулярный ($M_r = 200$ кДа, степень деацетилирования – 82.0%) и высокомолекулярный ($M_r = 350$ кДа, степень деацетилирования – 94.85%).

Иммобилизацию фицина, папаина и бромелина на матрице хитозана осуществляли адсорбционным методом. К 50 мг хитозана добавляли 1 мл буферного раствора фермента (в концентрации 1 мг/мл для фицина и папаина, 5 мг/мл для бромелина), инкубировали в течение 4 ч (со среднемoleкулярным хитозаном) и 5 ч (с высокомолекулярным хитозаном) с периодическим перемешиванием. Для иммобилизации фицина на матрицах среднемoleкулярного и высокомолекулярного хитозанов использовали 0.05 М глициновый буфер с pH 10.0 и 8.6 соответственно. Для сорбции папаина на матрицах среднемoleкулярного и высокомолекулярного хитозанов применяли 0.05 М глициновый буфер с pH 9.0; для иммобилизации бромелина на матрицах среднемoleкулярного и высокомолекулярного хитозанов – 0.05 М трис-глициновый буфер с pH 9.0 и 8.5 соответственно [41].

Количество белка в иммобилизованном препарате измеряли модифицированным методом Лоури [42]. Сущность модификации заключалась в том, что на первом этапе анализа осуществляли разрушение связей и взаимодействий между матрицей носителя и молекулой фермента. Для этого обрабатывали иммобилизованный препарат раствором K,Na-тарtrate, приготовленном на 1 М NaOH при 50°C в течение 10 мин.

В качестве субстрата для определения активности ферментов применяли азоказеин [43] и N-бензол-DL-аргинин-пара-нитроанилид [44]. Для активации ферментов в данном исследовании применяли раствор 1 mM L-цистеина [45].

Активность фермента выражали в абсолютных (ед/мг) и относительных (%) величинах.

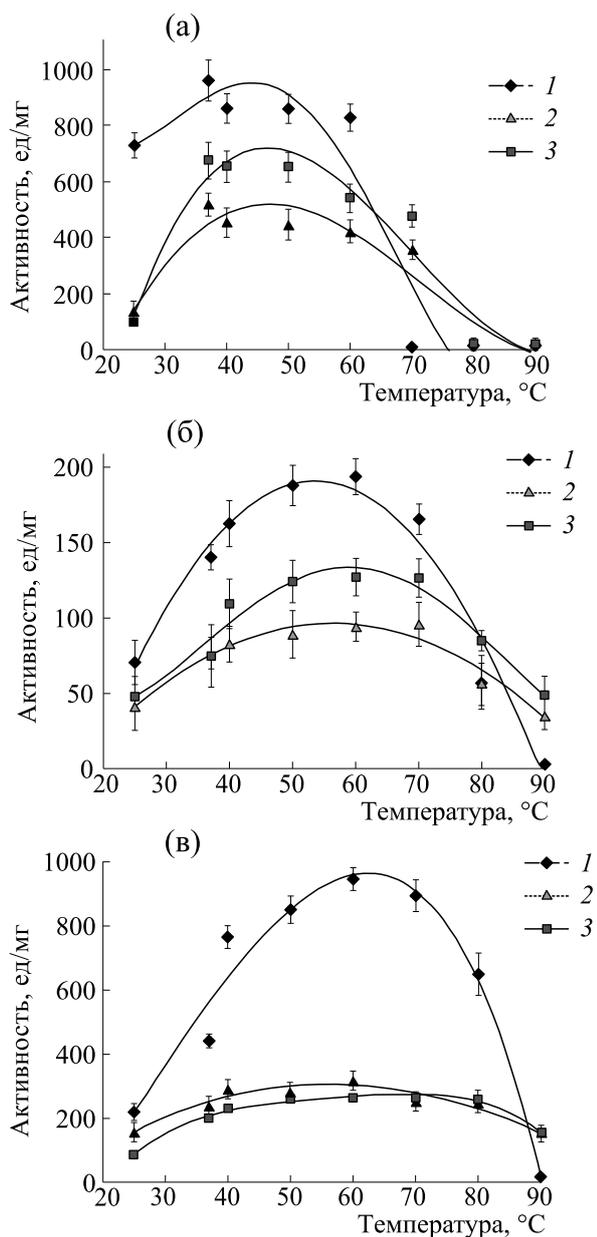


Рис. 1. Зависимости каталитической активности фицина (а), бромелина (б) и папаина (в) от температуры инкубации: 1 – нативный фермент, 2 – фермент, иммобилизованный на среднемoleкулярном хитозане, 3 – фермент, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане. Время инкубации 30 мин.

Определение каталитической активности протеаз при использовании азоказеина в качестве субстрата. К 200 мкл раствора свободного фермента в 50 мМ трис-НСl-буфере с рН 7.5, содержащему 1 мМ раствор цистеина (или к суспензии 50 мг иммобилизованного образца в 200 мкл 50 мМ трис-НСl-буфера с рН 7.5, содержащей 1 мМ раствор L-цистеина), добавляли 400 мкл 1% раствора азоказеина (в 50 мМ трис-НСl-буфере, рН 7.5) и инкубировали 30 мин при оптимальной для про-

явления каталитической активности фермента температуре – при 37°C для фицина, при 60°C для бромелина и папаина. После инкубации добавляли 800 мкл 5% раствора трихлоруксусной кислоты, инкубировали 5 мин при –4°C, а затем центрифугировали в течение 3 мин при 13000 об/мин для удаления негидролизованного азоказеина. К 1200 мкл супернатанта добавляли 240 мкл 3% раствора NaOH для нейтрализации кислоты, после чего измеряли оптическую плотность опытной пробы при длине волны 410 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см. Контрольная проба содержала 400 мкл азоказеина, 800 мкл трихлоруксусной кислоты; 50 мг образца и 200 мкл буфера вносили последними: после проведения всех перечисленных выше манипуляций, т.е. непосредственно перед измерением оптической плотности контрольных образцов.

Определение каталитической активности протеаз при использовании N-бензол-DL-аргинин-пара-нитроанилида в качестве субстрата. К 400 мкл раствора фермента в 50 мМ трис-НСl-буфере с рН 7.5 (или к суспензии 50 мг иммобилизованного образца в 400 мкл 50 мМ трис-НСl-буфера с рН 7.5) добавляли 400 мкл раствора N-бензол-DL-аргинин-пара-нитроанилида (1 мг/мл) и 400 мкл 1 мМ раствора L-цистеина в 50 мМ трис-НСl-буфере с рН 7.5. Инкубировали раствор 30 мин при 37°C для фицина, при 60°C – для бромелина и папаина. Далее останавливали реакцию 800 мкл 1 М HCl. Измеряли оптическую плотность образцов при длине волны 410 нм.

Процесс термической инактивации нативных и иммобилизованных цистеиновых протеиназ изучали при температурах 60, 70, 80 и 90°C в течение 10, 20, 30, 40, 50 и 60 мин с последующим измерением каталитической активности.

Все экспериментальные исследования осуществляли минимум в восьмикратной повторности. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ «Stadia 8.0 (Professional)». Статистическую значимость различий величин контрольных и опытных показателей определяли по *t*-критерию Стьюдента (при *p* < 0.05), поскольку все показатели характеризовались нормальным распределением.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение зависимости каталитической активности фицина, бромелина и папаина от температуры. Каталитическая активность свободного и иммобилизованного на матрицах хитозана фицина в зависимости от температуры представлена на рис. 1а. В ходе наших экспериментов было установлено, что для всех трех образцов диапазон рабочих температур находится между 37 и 60°C, однако при 70°C свободный фермент был полно-

стью термически инактивирован, в то время как сорбированный фермент на двух видах хитозана сохранял порядка 50% активности от нативного. По сообщениям других авторов фицин проявляет свои каталитические свойства в диапазоне от 40 до 60°C [46, 47]. В этом случае при 70°C происходит термоинактивация фицина [48].

Оптимальная температура для бромелина варьирует в пределах 55–60°C [3]. В нашей работе диапазон рабочих температур бромелина находится между 50 и 70°C, а для иммобилизованного на хитозане фермента – от 40 до 70°C (рис. 1б). Однако при 80°C свободный фермент был термически инактивирован на 76%, в то время как сорбированный на среднемoleкулярном хитозане фермент сохранял 69% активности от максимального значения, а иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане – 79%.

Для растворимого и сорбированного папаина характерна высокая активность при температурах соответственно 50 и 70°C (рис. 1в). Однако при 80°C свободный фермент был термически инактивирован на 32%, в то время как при иммобилизации на среднемoleкулярном хитозане сохранял порядка 80% активности от максимального значения. Препарат фермента и высокомолекулярного хитозана проявлял стабильную активность независимо от температуры инкубации в диапазоне температур 50–80°C. По данным других исследователей папаин высоко активен при температурах 50–75°C [37, 49, 50].

Исследование закономерностей процессов термической инактивации фицина, бромелина и папаина. В следующей серии экспериментов мы исследовали процесс термической инактивации нативных фицина, бромелина, папаина при температурах 60, 70, 80 и 90°C. Для этого растворы белков инкубировали в интервале времени 10–60 мин при различных температурах (60–90°C) с последующим определением каталитической активности. На рис. 2 показана динамика процессов инактивации ферментов.

Каталитическая способность фицина, прогреваемого при температуре 60°C, снижалась сразу после 10 мин инкубации, далее плавно уменьшалась и после 60 мин составляла 32%. При 70, 80 и 90°C фермент был полностью термически инактивирован после 10 мин нагревания (рис. 2а).

Для бромелина было характерно сохранение ферментативной активности на 56 и 34% при инкубации соответственно при 60 и 70°C в течение 60 мин. После 10 мин нагревания при 80 и 90°C фермент был полностью инактивирован (рис. 2б).

Для папаина мы наблюдали потерю более 60% каталитической способности от первоначального уровня после 10 мин инкубации при 60 и 70°C, при этом остаточная активность при увеличении

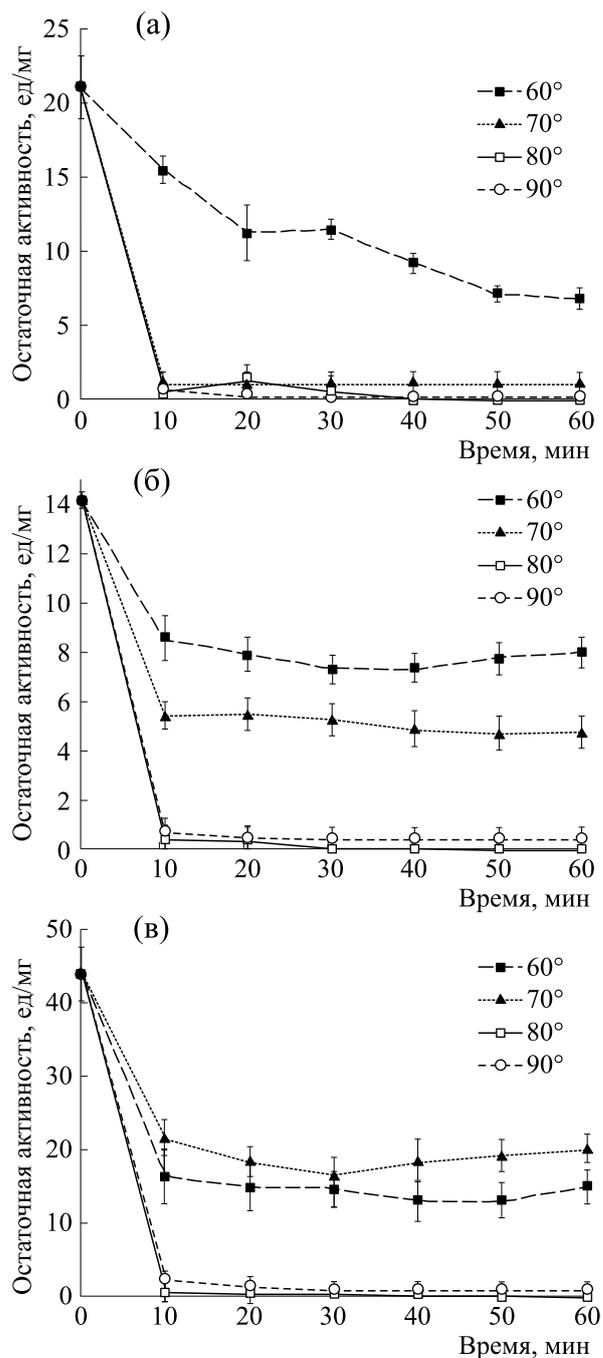


Рис. 2. Зависимости каталитической активности фицина (а), бромелина (б) и папаина (в) от времени термической инактивации.

времени нагревания практически не изменялась. После 10 мин при 80 и 90°C фермент утрачивал практически 100% своей ферментативной способности (рис. 2в).

Далее мы определили процент сохранения активности фицина, бромелина и папаина по сравнению с ферментами, не подвергнутыми нагрева-

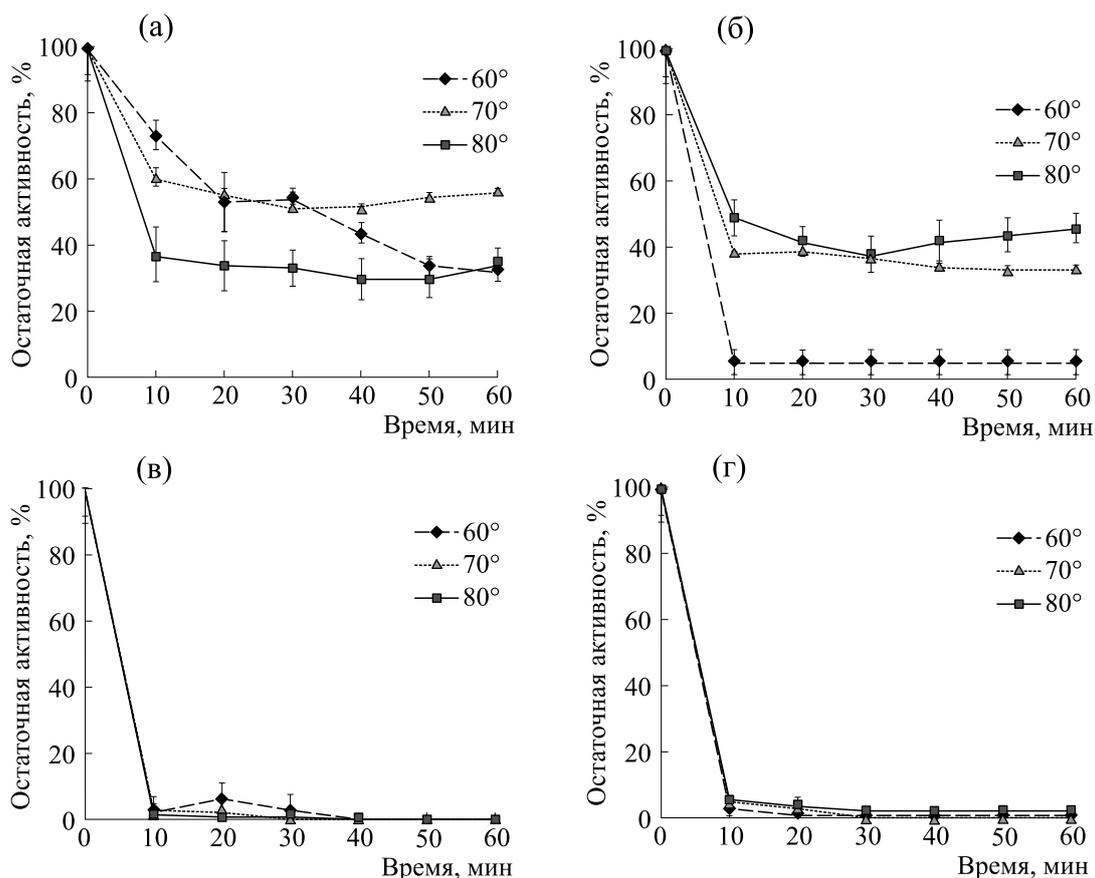


Рис. 3. Сохранение каталитической активности ферментов в различные промежутки времени в ходе инкубации при 60°C (а), 70°C (б), 80°C (в), 90°C (г): 1 – фицин, 2 – бромелин, 3 – папаин. За 100% принята максимальная ферментативная активность сорбированного образца, наблюдаемая без предварительной инкубации и при оптимальных условиях гидролиза.

нию, при инактивации в диапазоне температур 60–90°C (рис. 3).

Динамика потери каталитической способности в ходе инкубации при 60°C для всех исследуемых ферментов сходна: кривые инактивации совпадали по форме. Наибольший процент сохранения активности (порядка 60%) после 60 мин прогрева был характерен для бромелина.

Динамика потери ферментативной способности при 70°C для бромелина и папаина также сходна: кривые термической инактивации совпадали по форме и были близки по значениям. После часового прогрева бромелин сохранял более 30% первоначальной активности, папаин – 45%. Фицин инактивировался практически полностью уже после 10-минутной инкубации.

Для фицина, бромелина и папаина была характерна полная инактивация при 80 и 90°C после 10-минутной инкубации их растворов.

Из всего вышеизложенного можно сделать следующие выводы: 1) бромелин сохранял высокий процент активности в диапазоне температур

60 и 70°C (до 40%); 2) фицин быстро инактивировался в случае нагревания при 70°C; 3) папаин был достаточно устойчив при температуре 70°C; 4) фицин, бромелин и папаин полностью инактивировались при нагревании в условиях 80 и 90°C.

Следует отметить, что кривые термопревращения бромелина и папаина при 60–90°C, а также фицина при 70, 80 и 90°C имеют два отчетливо выраженных участка (две «ключевые стадии»): первый (время инкубирования менее 10 мин) отличается высокой скоростью снижения каталитической способности. Для второго (время инкубирования от 20 до 60 мин) характерна стабилизация остаточной активности фермента. Наличие излома и двухфазный характер кривой термоинактивации названных цистеиновых протеаз свидетельствуют, возможно, о последовательном развитии как минимум двух стадий сложного процесса термомодификации белка и о наличии в изучаемой системе двух форм фермента, характеризующихся различной устойчивостью к денатурирующему воздействию. Интересен тот факт, что излом на кривой инактивации фицина одина-

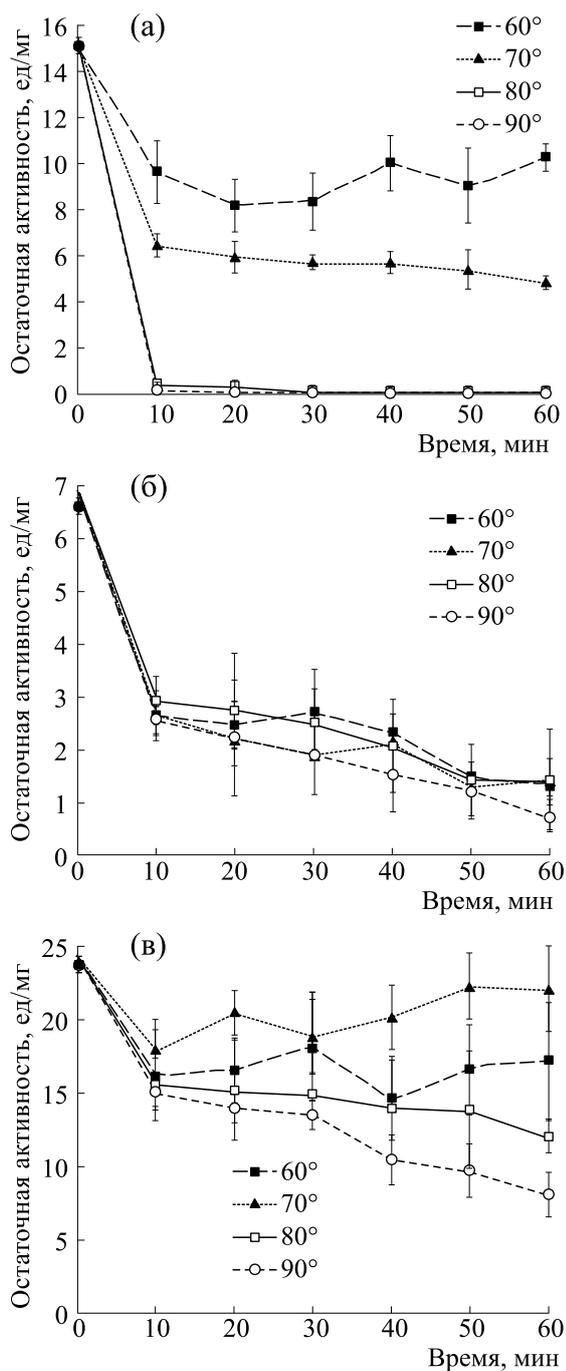


Рис. 4. Зависимости каталитической активности иммобилизованных на среднемoleкулярном хитозане фицина (а), бромелина (б) и папаина (в) от времени термической инактивации.

ков при 70, 80 и 90°C, а у бромелина и папаина он более выражен при 80 и 90°C по сравнению с 60 и 70°C.

Исследование закономерностей процессов термической инактивации фицина, бромелина и папаина, иммобилизованных на матрицах хитозанов.

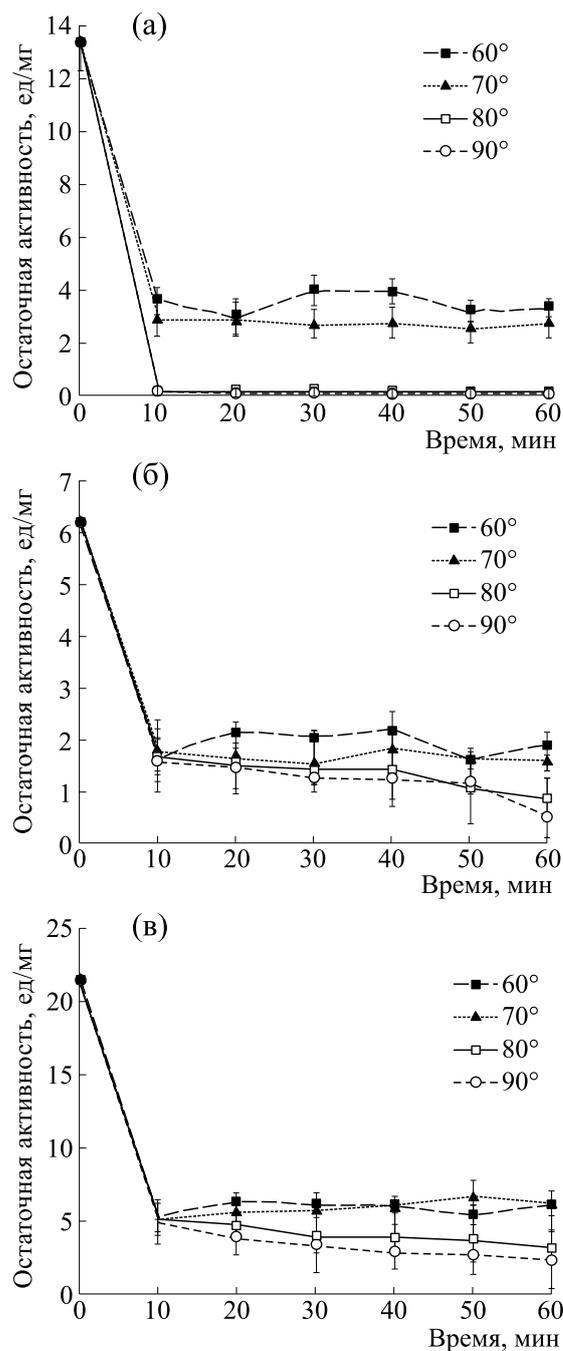


Рис. 5. Зависимости каталитической активности иммобилизованных на высокомолекулярном хитозане фицина (а), бромелина (б) и папаина (в) от времени термической инактивации.

Иммобилизация ферментов на нерастворимых носителях способствует повышению их термостабильности. Этот эффект обусловлен тем, что при присоединении молекул фермента к матрице подложки происходит стабилизация их каталитически активной конформации.

На рис. 4 и 5 изображены кривые термической инактивации протеаз, иммобилизованных на

матрицах среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов.

Иммобилизация фицина на среднемолекулярном хитозане увеличила его термостабильность по сравнению с нативным белком: после инкубации при 70°C каталитическая способность гетерогенного препарата сохранилась на 32% от первоначальной. Ферментативная активность при 60°C после 10 мин уменьшилась на 35% и далее практически не претерпевала изменений. Кривые инактивации фицина, сорбированного на матрице высокомолекулярного хитозана, по форме были одинаковы и близки по значениям после нагревания при 60 и 70°C, активность препарата составила более 20% от исходной как после 10 мин, так и после одночасовой инкубации. Фицин, иммобилизованный на среднемолекулярном и высокомолекулярном хитозанах, полностью терял свою активность после нагревания при 80 и 90°C (рис. 4а и 5а). Авторы работы [51] произвели иммобилизацию фицина на глиоксил-агарозе с сохранением 30% активности от нативного фермента, что значительно увеличило стабильность биокатализатора. Препарат продемонстрировал повышенную активность при pH 10 и при 80°C по сравнению со свободным ферментом. Другая группа исследователей получила ферментные препараты на основе иммобилизованных тиоловых протеаз, такие как папаин, фицин и бромелин, на пористых гранулах поливинилового спирта путем ковалентной фиксации. Стабильность в условиях щелочных значений pH среды и высоких температур, а также при хранении у иммобилизованных ферментов оказалась выше, чем у свободных. Например, остаточная активность иммобилизованного папаина после инкубации при 60°C в течение 60 мин практически не изменилась (осталась на уровне 95–99%), тогда как активность свободного папаина снизилась до 70% от исходного значения [52].

Кривые зависимости каталитической активности иммобилизованного на среднемолекулярном хитозане бромелина от времени термической инактивации при температурах 60 и 70°C до 40 мин инкубации практически совпадали по значениям: активность препарата снижалась до 50%. После 40 мин нагревания ферментных образцов при 60 и 70°C их активность падала до 26% в сравнении с интактным препаратом. После инкубации фермента в течение 1 ч при 80 и 90°C остаточная энзиматическая способность составляла 10 и 20% от исходной. Кривые зависимости активности бромелина, сорбированного на матрице высокомолекулярного хитозана, от времени термической инактивации совпадали по форме и значениям при 60, 70, 80 и 90°C. После 60-минутного прогревания образцы сохраняли не более 25% первоначальной каталитической способности (рис. 4б и 5б). Авторы работы [53] показали,

что адсорбция бромелина на спорах пробиотика *Bacillus sp.* повысила его термостабильность при 80°C по сравнению с растворимой формой: свободный бромелин потерял полностью свою активность, в то время как иммобилизованный фермент потерял только ~ 47% от своей первоначальной каталитической способности.

Кривые инактивации иммобилизованного на среднемолекулярном хитозане папаина при 60, 70, 80 и 90°C до 30 мин инкубации не различались по форме и значениям параметров: активность препарата снижалась до 70%. После 50 мин инкубации при 60°C фермент сохранял активность на уровне более 60%, а после 10 мин нагрева при 90°C плавно терял свою каталитическую способность, которая в конце эксперимента составляла 33% от исходной. Кривые инактивации папаина, сорбированного на матрице высокомолекулярного хитозана, по форме были одинаковы и близки по значениям параметров после нагревания при 60, 70, 80 и 90°C, активность препарата составляла не более 28% от исходной (рис. 4в и 5в). Напротив, при иммобилизации папаина на хлопчатобумажной ткани не было продемонстрировано значительного улучшения термостабильности фермента по сравнению с его растворимой формой [54]. Авторы работы [50] продемонстрировали заметное повышение термостабильности при 70°C папаина, иммобилизованного на магнитных композитных микросферах, что можно объяснить сниженным автолизом за счет фиксации фермента на подложке.

Анализируя не абсолютные значения активности иммобилизованных на хитозанах протеолитических ферментов, а степень ее сохранения по сравнению с нативными препаратами при инактивации в диапазоне температур 60–90°C (рис. 6 и 7), можно высказать следующие соображения. Динамика потери ферментативной способности при инкубации при 60°C фицина и папаина, иммобилизованных на среднемолекулярном хитозане, близка по форме: ферменты снижали свою активность уже после 10 мин нагревания. Бромелин, иммобилизованный на среднемолекулярном хитозане, сохранял 19% каталитической способности после 60 мин инкубации при 60°C, что приблизительно в три раза меньше, чем у других протеаз. Иммобилизованный на среднемолекулярном хитозане папаин оказался наиболее устойчивым при 70°C и сохранял 90% своей активности. Фицин, иммобилизованный на среднемолекулярном хитозане, полностью инактивировался при 80 и 90°C, тогда как папаин и бромелин сохраняли более 10% каталитической способности от ее начального уровня.

Кривые инактивации, полученные при нагревании при 60°C, были одинаковы по форме и значениям параметров (не более 37% активности во

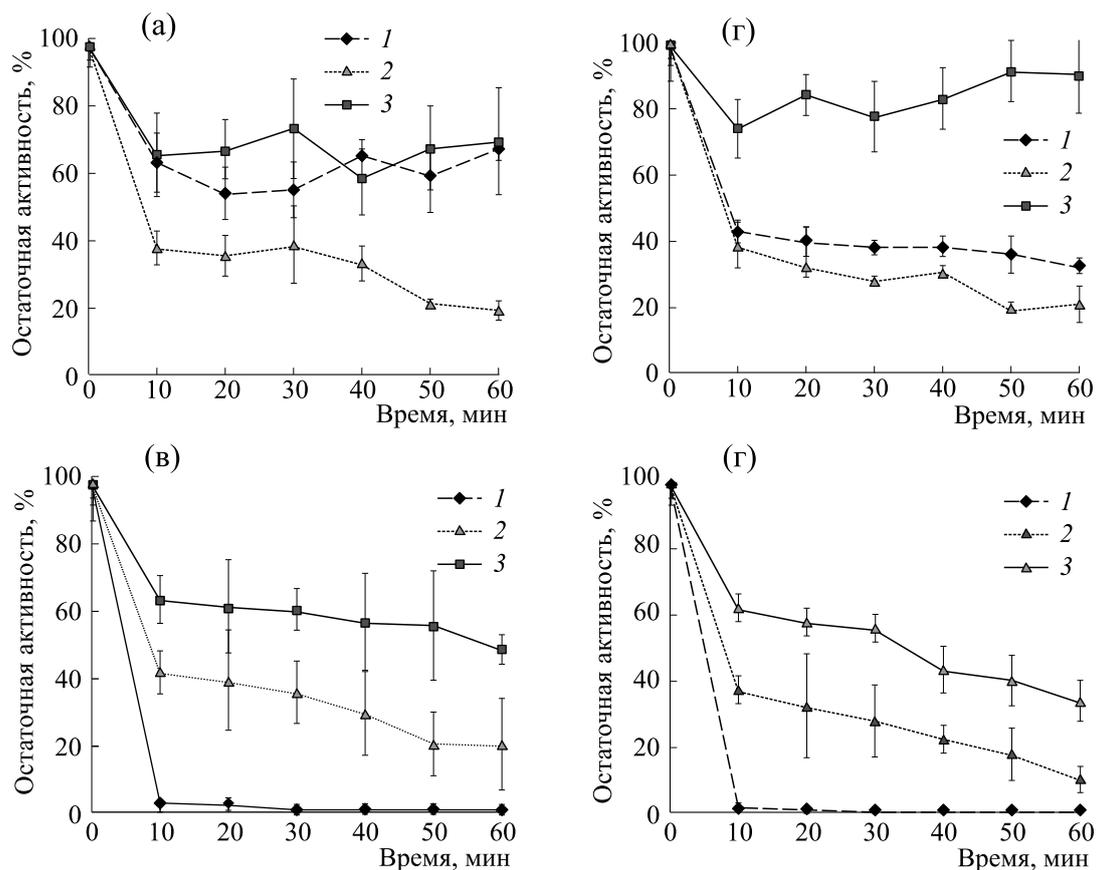


Рис. 6. Сохранение активности иммобилизованных на среднемoleкулярном хитозане ферментов в различные промежутки времени в ходе инкубации при 60°C (а), 70°C (б), 80°C (в), 90°C (г): 1 – фицин, 2 – бромелин, 3 – папаин. За 100% принята максимальная ферментативная активность сорбированного образца, наблюдаемая без предварительной инкубации и при оптимальных условиях гидролиза.

всем диапазоне времени) для фицина, бромелина и папаина. При 70°C мы наблюдали практически полное совпадение кривых инактивации для ферментов, иммобилизованных на высокомолекулярном хитозане, они теряли каталитическую способность гораздо быстрее, чем при температурах 60°C и ниже. Иммобилизованные на высокомолекулярном хитозане бромелин и папаин оказались более термостойкими по сравнению с иммобилизованным на том же носителе фицином, который полностью инактивировался после 10 мин инкубации при 80 и 90°C.

Следует отметить, что после иммобилизации на обоих типах хитозанов изменилась форма кривых термопревращения цистеиновых протеаз, по сравнению с результатами, полученными для растворимых ферментов: при сохранении двухфазного характера кривых инактивации излом на них при 80 и 90°C стал менее глубоким.

Форма кривых термической инактивации фицина, бромелина и папаина в растворе при температурах 60, 70, 80 и 90°C указывает на возмож-

ность участия процессов ассоциации в регуляции их каталитической активности. В связи с тем, что после иммобилизации двухфазный характер кривых термопревращения цистеиновых протеаз стал менее выраженным, можно сделать предположение, что сорбция на обоих типах хитозанов препятствует протеканию названных выше процессов, стабилизируя тем самым каталитически активную конформацию молекул ферментов при повышении температуры.

В настоящем исследовании было показано, что сорбция ферментов на хитозане способствовала повышению их термостабильности. Можно сделать вывод о том, что адсорбция на среднемoleкулярном (200 кДа) и высокомолекулярном (350 кДа) хитозане позволяет расширить спектр и возможности применения цистеиновых протеаз (фицин, папаин, бромелин) за счет протекторных свойств его матрицы.

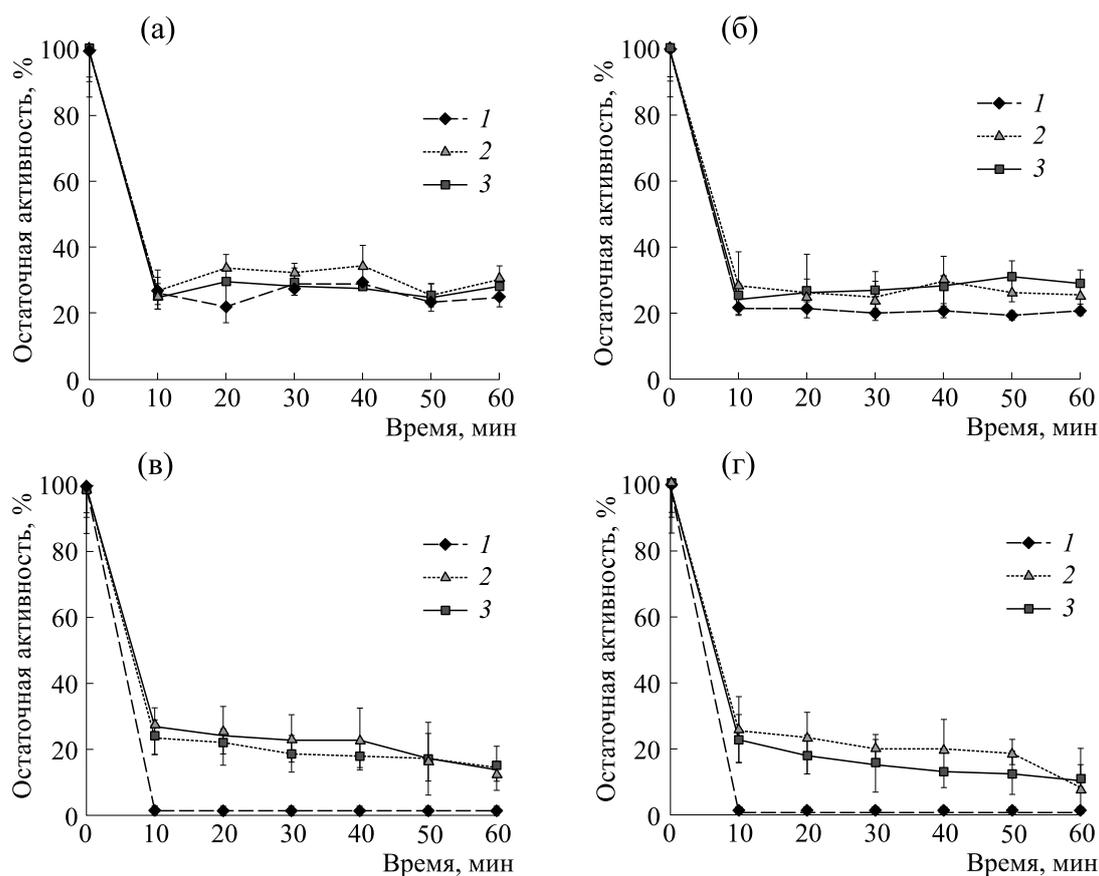


Рис. 7. Сохранение активности иммобилизованных на высокомолекулярном хитозане ферментов в различные промежутки времени в ходе инкубации при 60°C (а), 70°C (б), 80°C (в), 90°C (г): 1 – фицин, 2 – бромелин, 3 – папаин. За 100% принята максимальная ферментативная активность сорбированного образца, наблюдаемая без предварительной инкубации и при оптимальных условиях гидролиза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нативный фицин инактивировался после 10 мин нагревания при 70°C, иммобилизация фермента на матрице хитозана способствовала увеличению его термостабильности при той же температуре. Свободный бромелин терял каталитическую способность после инкубации при 80°C, сорбированная форма фермента проявляла свою активность при 80 и 90°C. Растворимый папаин был термически инактивирован при 80°C, иммобилизация фермента на хитозане частично предотвратила потерю его каталитической способности при 80 и 90°C.

Полученные результаты следует учитывать при разработке ферментных препаратов промышленного назначения на основе фицина, бромелина и папаина, так как иммобилизация цистеиновых протеаз на матрице хитозана частично защищает их молекулы от денатурирующего действия высоких температур, что позволит использовать подобные гетерогенные биокатализаторы в реакторах периодического и непрерывного действия.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Esmaeilpour, M. R. Ehsani, M. Aminlari, et al., *Comp. Clin. Pathol.* **25** (3), 599 (2016).
2. M. A. Shah, S. A. Mir, and M. A. Paray, *Dairy Sci. Technol.* **94**, 5 (2014).
3. Z. I. M. Arshad, A. Amid, F. Yusof, et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 7283 (2014).
4. M. Faccia, G. Picariello, A. Trani, et al., *Eur. Food Res. Technol.* **234**, 527 (2012).
5. Z. Pietrasik, J. L. Aalhus, L. L. Gibson, and P. J. Shand, *Meat Sci.* **84**, 512 (2010).

6. B. Gerelt, Y. Ikeuchi, and A. Suzuki, *Meat Sci.* **56**, 311 (2000).
7. S. Ketnawa and S. Rawdkuen, *Food Nutrition Sci.* **2**, 393 (2011).
8. I. Benucci, K. Liburdi, A. M. V. Garzillo, and M. Esti, *Food Chem.* **124**, 1349 (2011).
9. L. P. Hale, P. K. Greer, C. T. Trinh, and C. L. James, *Int. Immunopharmacol.* **5**, 783 (2005).
10. G. A. Sullivan and C. R. Calkins, *Meat Sci.* **85**, 730 (2010).
11. O. Diaz, M. Fernandez, G. D. Garcia de Fernando, et al., *Sci. Food Agric.* **71**, 13 (1996).
12. L. Feijoo-Siota and T. G. Villa, *Food Bioprocess. Technol.* **4**, 1066 (2011).
13. D. R. Baidamshina, E. Y. Trizna, F. S. Akhatova, et al., *Sci. Rep.* **7**, 46068 (2017).
14. В. Г. Артюхов, Т. А. Ковалёва, М. Г. Холявка и др., *Прикл. биохимия и микробиология* **46** (4), 422 (2010).
15. V. C. Sgarbieri, S. M. Gupte, D. E. Kramer, and J. R. Whitaker, *J. Biol. Chem.* **239**, 2170 (1964).
16. I. K. Jones and A. N. Glazer, *J. Biol. Chem.* **245**, 2765 (1970).
17. D. C. Williams and J. R. Whitaker, *Plant Physiol.* **44**, 1574 (1969).
18. J. Polaina and A. P. MacCabe, *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications* (Springer, N. Y., 2007).
19. J. Drenth, J. N. Jansonius, R. Koekoek, et al., *Nature* **218**, 929 (1968).
20. I. G. Kamphuis, K. H. Kalk, M. B. Swarte, and J. Drenth, *J. Mol. Biol.* **179** (2), 233 (1984).
21. C. F. Barbas and C. H. Wong, *J. Chem. Soc.* **1987**, 533 (1987).
22. R. B. Johnston, *J. Biol. Chem.* **221** (2), 1037 (1956).
23. *Enzymes in Food Technology*, Ed. by R. J. Whitehurst and M. Van Oort (Wiley-Blackwell, West Sussex, 2010).
24. A. D. Napper, S. P. Bennett, M. Borowski, et al., *Biochem. J.* **301** (Pt 3), 727 (1994).
25. C. Garcia-Galan, A. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, and R. C. Rodrigues, *Adv. Synth. Catal.* **353**, 2885 (2011).
26. A. Fini and I. Orienti, *Am. J. Drug Deliv.* **1** (1), 43 (2003).
27. M. Alatorre-Meda, P. Taboada, J. Sabin, et al., *Colloid Surf. A* **339**, 145 (2009).
28. B. Krajewska, P. Wydro, and A. Jańczyk, *Biomacromolecules* **12**, 4144 (2011).
29. B. Krajewska, P. Wydro, and A. Kyzioł, *Colloid Surf. A* **434**, 349 (2013).
30. B. Krajewska, A. Kyzioł, and P. Wydro, *Colloid Surf. A* **434**, 359 (2013).
31. A. Kiliç, M. Teke, S. Önal and A. Telefoncu, *Prep. Biochem. Biotechnol.* **36** (2), 153 (2006).
32. T. Jesionowski, J. Zdarta, and B. Krajewska, *Adsorption* **20**, 801 (2014).
33. B. Hua and Q. Huangb, *Chin. J. Polymer Sci.* **31** (9), 1190 (2013).
34. G. R. Castro, R. R. Kamdar, B. Panilaitis, and D. L. Kaplan, *J. Control Release* **109**, 149 (2005).
35. V. E. Bosio, G. A. Islan, Y. N. Martínez, et al., *Crit. Rev. Biotechnol.* **36** (3), 447 (2016).
36. O. L. Tavano, A. Berenguer-Murcia, F. Secundo, and R. Fernandez-Lafuente, *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety* **17** (2), 412, (2018).
37. A. Ü. Metin and E. Alver, *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **39**, 1137 (2016).
38. I. Benucci, C. Lombardelli, K. Liburdi, et al., *Food Sci. Technol.* **53** (2), 1130 (2016).
39. A. S. Rojas-Mercado, I. E. Moreno-Cortez, R. Lucio-Porto, and L. L. Pavon, *Int. J. Biol. Macromolecules* **118**, 2287 (2018).
40. E. Siar, R. Morellon-Sterling, M. N. Zidoune, and R. Fernandez-Lafuente, *Int. J. Biol. Macromolecules* **133**, 412 (2019).
41. М. Г. Холявка, В. Г. Артюхов и В. А. Королева, Патент на способ получения гетерогенного препарата различной дисперсности на основе бромелайна и хитозана, дата подачи заявки: 03.07.2017, дата публикации заявки: 10.01.2019, Бюл. № 1, опубликовано: 16.01.2019, Бюл. № 2.
42. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R.J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
43. A. R. Sabirova, N. L. Rudakova, N. P. Balaban, et al., *FEBS Lett.* **584** (21), 4419 (2010).
44. D. F. Erlanger, N. Kokowski, and W. Cohen, *Arch. Biochem. Biophys.* **95**, 271 (1961).
45. L. R. Singh, Th. P. Devi, and S. K. Devi, *Prepar. Biochem. Biotechnol.* **34** (1), 25 (2004).
46. D. Baeyens-Volant, A. Matagne, R. El Mahyaoui, et al., *Phytochemistry* **117**, 154 (2015).
47. S. Fadyoğlu, *Nahrung/Food* **45** (2), 143 (2001).
48. K. B. Devaraj, P. R. Kumar, and V. Prakash, *J. Agric. Food Chem.* **56**, 11417 (2008).
49. P. Alpay and D. Aktas Uygun, *Mol. Catalysis B* **111**, 56 (2015).
50. H. Lei, W. Wang, L.-L. Chen, et al., *Enzyme Microbial Technol.* **35** (1), 15 (2004).
51. E. Siar, H. Zaak, J. F. Kordecki, et al., *Process. Biochem.* **58**, 98 (2017).
52. T. Hayashi, S.-H. Hyon, W.-I. Cha, and Y. Ikada, *Polymer J.* **25** (5), 489 (1993).
53. T. N. Nwagu and C. J. Ugwuodo, *Int. J. Biol. Macromolecules* **127**, 406 (2019).
54. F.-Y. Li, Y.-J. Xing, and X. Ding, *Enzyme Microbial Technol.* **40** (7), 1692 (2007).

Thermal Inactivation of Cysteine Proteases: “Key Stages”**V.A. Koroleva, S.S. Olshannikova, M.G. Holyavka, and V.G. Artyukhov***Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia*

The processes of thermal inactivation of ficin, bromelain and papain in a dissolved state and immobilized on matrices of medium-molecular (200 kDa) and high-molecular (350 kDa) chitosans were studied. It was shown that native ficin was inactivated at 70°C after 10 min of heating, bromelain in solution retained up to 40% of its activity after 60 min of incubation at 60°C and 70°C, the enzymatic activity of free papain remained constant at 70°C over the whole period of exposure (60 min). Soluble samples of ficin, bromelain and papain are characterized by complete inactivation at 80°C and 90°C after 10 min of incubation. The ficin immobilization on matrices of both types of chitosans increased its thermal stability (at 70°C, the catalytic ability of the enzyme was at least 20%). Ficin, immobilized on medium and high molecular weight chitosans, was completely inactivated at 80°C and 90°C after 10 min of incubation, while papain and bromelain adsorbed on the chitosan matrix retained more than 10% of their catalytic ability from its initial level under these conditions.

Keywords: ficin, bromelain, papain, immobilization, thermal inactivation, chitosan