

УДК 577.114.4 / 577.152.311

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗ В ПРИСУТСТВИИ СИНТЕТИЧЕСКИХ И ПРИРОДНЫХ ПОЛИМЕРОВ

А.А. Савина, Л.С. Гарнашевич, И.С. Зайцев, М.С. Царькова, С.Ю. Зайцев*

(ФГБОУ ВО МГАВМиБ – Московская ветеринарная академия имени К.И. Скрябина:
e-mail: s.y.zaitsev@mail.ru)

Как синтетические, так и природные полимеры могут с успехом использоваться в качестве носителей для иммобилизации ферментов, в том числе липаз из разных источников. Это направление имеет фундаментальное и прикладное значение, поскольку иммобилизованные липазы широко применяются в разнообразных биотехнологических процессах. Данная работа посвящена изучению влияния синтетических и природных полимеров (полистирола, полилизина и хитозана) на каталитические свойства липаз из панкреатической железы свиньи (LPP), грибов *Candida cylindracea* (LCC) и проростков пшеницы (LWG) при гидролизе во всех опытах триацетина в качестве субстрата. Установлено, что латекс на основе полистирола (даже без модификации поверхности) сильно влияет на активность липаз разного происхождения. Причем в присутствии крупных частиц размером порядка 1 мкм (независимо от их концентрации в области 1–10%) активность всех трех липаз (LPP, LCC, LWG) существенно увеличивается по сравнению с неиммобилизованным ферментом. Полистирольный латекс с карбоксилированной поверхностью оказывает иное влияние на каталитические свойства этих же липаз. Обнаружена зависимость активности липазы LPP от концентрации хитозана (при их соотношении от 100:1 до 1:1), а также от параметров среды (рН и температуры). Измерение каталитической активности липазы с полилизином показало, что при их соотношениях 10:1 и 5:1 (избыток LPP) происходит повышение активности фермента относительно свободной формы на 17 и 9%, соответственно. Это обусловлено взаимодействием положительно заряженного полилизина с ферментом, имеющим избыточный отрицательный заряд. Полученные результаты могут быть использованы в биотехнологии.

Ключевые слова: липазы, полистирольные микрочастицы, хитозан, полилизин, каталитическая активность.

Липолитические ферменты привлекают большое внимание благодаря своему биотехнологическому потенциалу [1]. Спектр применения липаз необычайно широк, их используют в пищевой, кормовой, кожевенной, бумажной и косметической промышленности, в медицине и фармацевтике, при производстве детергентов и других синтетических веществ [2]. В последнее время рассматриваются возможности применения липаз в топливной промышленности для получения биодизеля [3]. Однако наиболее часто эти ферменты используются в пищевой промышленности для получения масложировой продукции [4].

Во всем мире активно изучают липазы из разных источников (растений, животных, микроорганизмов). В промышленности в основном используют липазы, полученные из микроорганизмов (грибы, бактерии, дрожжи). К ним отно-

сится липаза из дрожжей *Candida cylindracea*, использованная нами в настоящей работе. Главное преимущество этих липаз заключается в простоте и удобстве их производства в промышленных масштабах. Липазы микроорганизмов легче подвергаются модификации за счет создания новых штаммов; некоторые из этих ферментов имеют широкий температурный и рН-диапазон действия по сравнению с липазами из животных и растительных источников [5].

Носитель (матрица для иммобилизации) существенно упрощает манипуляции с биокатализатором и контроль за процессом реакции, одновременно повышая стабильность фермента как в условиях хранения, так и в условиях эксплуатации. Характеристики матрицы имеют первостепенное значение при определении эффективности иммобилизованной ферментной системы [6]. Несмотря на то, что нет универсального

носителя, подходящего для всех ферментов, следует учитывать основные характеристики материала носителя, такие как высокое сродство к белку, наличие реакционноспособной функциональной группы, механическая стабильность, жесткость, возможность регенерации, нетоксичность и способность к биоразложению [7].

В настоящее время для иммобилизации и стабилизации ферментов наиболее предпочтительны в качестве носителей наноструктурированные формы, такие как наночастицы, нановолокна, нанотрубки и нанокомпозиты [8]. Это превосходные материалы (несмотря на их высокую стоимость в настоящее время) для поддержки и иммобилизации ферментов, поскольку по ключевым аспектам они имеют сбалансированные характеристики, которые определяют эффективность биокатализаторов, например большую площадь поверхности и высокие механические свойства, позволяющие иммобилизовать достаточное количество фермента при минимальном ограничении диффузии [9].

Интерес к полиэлектролитам как к носителям ферментов обусловлен тем, что в отличие от неионогенных матриц они обладают широким набором свойств. Физико-химические свойства полиэлектролитов зависят от таких параметров внешней среды как pH, температура, ионная сила и концентрация металлов. Варьируя эти параметры, можно целенаправленно изменять условия, в которых будут находиться ферменты. Иммобилизация ферментов на синтетических полиэлектролитах открывает богатые возможности для регулирования свойств получаемых иммобилизованных ферментов. В фундаментальном аспекте изучение свойств иммобилизованных на полиэлектролитах ферментов необходимо прежде всего для понимания катализа *in vivo* [10].

Данная работа посвящена изучению влияния синтетических и природных полимеров (полистирола с разной поверхностью, полилизина, хитозана) на каталитические свойства липаз из панкреатической железы свиньи (LPP), грибов *Candida cylindracea* (LCC) и проростков пшеницы (LWG) при гидролизе триацетина.

Экспериментальная часть

Материалы

Объектом исследования служили липазы разного происхождения: из поджелудочной железы свиньи (LPP, «Sigma»; ММ = 50 000), из проростков пшеницы (LWG, «Fluka»; ММ = 42 000), из дрожжей *Candida cylindracea* (LCC,

«Fluka»; ММ \approx 67 000). В качестве субстрата был использован триацетилглицерол, коммерческое название «триацетин» («Sigma»; 99%; $C_9H_{14}O_6$, ММ = 218,21, чистота не менее 99%). В качестве носителя использовали полистирольный латекс с частицами разного диаметра (200, 520 и 1000 нм); полистирольный латекс с карбоксилированной поверхностью частиц (ООО «Диафарм», диаметр частиц 3,8 мкм, содержание сухого вещества 10%, концентрация карбоксильных групп 4,2 мкг-экв/г). Использовали биополимеры катионной природы: хитозан (Chi, SD 93,2 \pm 2,8%, ММ = 50 000); ϵ -поли-L-лизин гидробромид (4,1 мг/мл, ММ > 70 000). В качестве титранта был использован 0,01 н NaOH.

Каталитическая активность ферментов была исследована методом потенциометрического титрования на автоматическом титраторе «PHM-290 pH-stat-controller» («Radiometer», Дания). Перед работой электрод был откалиброван на стандартных буферных растворах с pH-стандартами 4,00; 7,00 и 9,18.

Методы

Приготовление раствора липазы. Навеску липазы (LPP – 26,5 мг, LCC – 35,5 мг, LWG – 22,2 мг) растворяли в 5 мл 0,05 М раствора NaCl и CaCl₂. Такой выбор обусловлен влиянием этих солей на липолитические свойства фермента. Затем перемешивали раствор с помощью магнитной мешалки в течение 30 мин, после чего раствор отфильтровывали с использованием бумажного фильтра (фильтр «обеззоленный» с размером пор 5–8 мкм). В результате получали прозрачные бесцветные растворы LCC и LPP и слабо опалесцирующий желтоватый раствор LWG.

Приготовление субстрата. Рабочий раствор субстрата готовили непосредственно перед проведением опыта, чтобы исключить спонтанный гидролиз. Рабочий раствор содержит ионы Na⁺, которые подавляют ингибирование фермента, вызываемое зарядами на границе раздела, и акцепторы жирных кислот (чаще ионы Ca²⁺), так как обычно свободные карбоновые кислоты ингибируют липазы.

Иммобилизация липаз. Иммобилизацию липаз на полистирольный латекс проводили методом физической адсорбции. Процесс иммобилизации происходил следующим образом. К раствору липазы добавляли полистирольные частицы в разных соотношениях – 1:10 (10 мкл латекса на 100 мкл липазы, 1% латекса в растворе), 1:20 (5 мкл латекса на 100 мкл липазы, 0,5%

латекса в растворе), 1:40 (2,5 мкл латекса на 100 мкл липазы, 0,25% латекса в растворе), 1:100 (1 мкл латекса на 100 мкл липазы, 0,1% латекса в растворе) или водный раствор хитозана, полилизина, полиаспарагиновой кислоты. Полученные комплексы инкубировали в течение 1 ч при $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ и $\text{pH } 6,1$. Комплексообразование между латексом и ферментом было проверено с помощью центрифугирования (1000 об/мин, 3 мин) и исследования остаточной активности в ресуспендированном осадке.

Измерение активности липаз. Измерение активности проводили при постоянном перемешивании на магнитной мешалке титратора. Для поддержания постоянной температуры использовали перистальтический насос, подающий воду необходимой температуры в термостатируемую кювету. Стандартные условия эксперимента: $\text{pH } 7$, $T = 40\text{ }^\circ\text{C}$.

Для обработки данных использовали программу управления титрометром «Stat Talk», которая отображает кривую активности фермента во времени (единица измерения активности фермента ммоль/мин·мл).

Контрольное измерение раствора липазы проводили ежедневно. Все исследуемые растворы в течение дня хранили при $+4\text{ }^\circ\text{C}$.

Результаты и их обсуждение

К одной из самых простых и надежных для нашего исследования систем фермент – полимер относится система липаза – полистирольный латекс, подходящая для оценки влияния гидрофобной поверхности на каталитическую активность липаз (табл. 1).

Добавление к раствору липазы полистирольных частиц разных размеров (от 200 до 1000 нм) существенно влияет на каталитическую активность ферментов (табл. 1). Так, в случае панкреатической свиной липазы увеличение размеров частиц

до 1000 нм приводит к незначительному повышению активности (на 5% относительно свободой липазы). Напротив, полистирольные наночастицы с меньшим диаметром (200 и 520 нм) снижают активность LPP на 24 и 22% соответственно (табл. 1). Аналогичные тенденции можно наблюдать и для липазы LCC: латекс с частицами диаметром 200 и 520 нм снижает активность липазы на 11 и 12% соответственно, тогда как микронные частицы увеличивают активность на 4% (табл. 1).

Противоположную картину можно наблюдать в случае использования растительной липазы LWG, каталитическая активность которой увеличивается во всех случаях. Впервые показано значительное увеличение активности LWG (на 26 и 33%) в случае присутствия микросфер с диаметром 520 и 1000 нм соответственно, тогда как активность LWG на микросферах размером 200 нм сопоставима с контролем (в пределах ошибки измерений) (табл. 1).

После тестирования гидрофобного латекса была исследована зависимость активности фермента от наночастиц с карбоксилированной поверхностью, повышающих гидрофильность (табл. 2).

Наночастицы с гидрофильной поверхностью были значительно большего диаметра и несли отрицательный заряд на поверхности. Вероятно, из-за таких параметров носителя, как размер поверхности и заряда, панкреатическая свиная липаза в присутствии карбоксилированного латекса во всех случаях незначительно теряет свою активность (табл. 2). Снижение активности LPP происходит прямо пропорционально концентрации латекса в растворе липазы. Так, при соотношении LPP:PS-COOH = 100:1 активность фермента уменьшается на 6%, при соотношении 40:1 – на 8%, при соотношениях 20:1 и 10:1 – на 13% (табл. 2).

Таблица 1

Влияние полистирольного латекса (PS) с разным размером частиц (200, 520 и 1000 нм) на каталитическую активность (A, %) липаз LPP, LCC, LWG относительно индивидуальных ферментов

Липаза	A, %		
	PS (200 нм)	PS (520 нм)	PS (1000 нм)
LPP	76±2,5	78±2,5	105±2,5
LCC	89±2,5	88±2,5	104±2,5
LWG	101±2,5	126±2,5	132±2,5

Т а б л и ц а 2

Влияние концентрации модифицированного полистирольного латекса (PS-COOH) на каталитическую активность (А, %) липаз LPP, LCC, LWG относительно индивидуальных ферментов

Липаза	А, %			
	PS-COOH (100:1)	PS-COOH (40:1)	PS-COOH (20:1)	PS-COOH (10:1)
LPP	94±2,5	92±2,5	87±2,5	87±2,5
LCC	146±2,5	123±2,5	107±2,5	105±2,5
LWG	108±2,5	151±2,5	142±2,5	133±2,5

Т а б л и ц а 3

Остаточная активность LPP с полистирольными микросферами при длительном хранении по отношению к активности свободной липазы в первый день

Образец	LPP		LPP : PS (200 нм)		LPP : PS (520 нм)		LPP : PS (1000 нм)	
	1	8	1	8	1	8	1	8
А, %	80±2	31±2	64±2	12±2	86±2	13±2	66±2	12±2

Т а б л и ц а 4

Каталитическая активность комплексов (А, %) по отношению к активности свободной липазы

Образец	LPP-Chi (100:1)	LPP-Chi (50:1)	LPP-Chi (25:1)	LPP-Chi (10:1)	LPP-Chi (5:1)	LPP-Chi (2:1)	LPP-Chi (1:1)
А, %	98±2,5	97±2,5	93±2,5	73±2,5	53±2,5	46±2,5	79±2,5
Образец	LPP-PL 100:1	LPP-PL (50:1)	LPP-PL (25:1)	LPP-PL (10:1)	LPP-PL (5:1)	LPP-PL (2:1)	LPP-PL (1:1)
А, %	64±2,5	65±2,5	64±2,5	117±2,5	109±2,5	–	92±2,5

Однако липазы из грибов и проростков пшеницы отреагировали на присутствие PS-COOH увеличением активности. В случае с LCC максимальное повышение активности происходит при соотношении 100:1, а для LWG при соотношении 40:1 и достигают 146 и 151% соответственно. Для LCC наблюдается линейная зависимость уменьшения активности с увеличением количества латекса, однако все значения активности находятся выше значений контроля (т.е. свободной липазы).

Предполагалось, что присутствие латекса в образцах липазы может повлиять на стабиль-

ность фермента при хранении, поэтому некоторые образцы в виде суспензии хранились до двух месяцев при +4 °С (табл. 3).

Хранение раствора панкреатической свиной липазы с «разноразмерным» латексом негативно сказалось на каталитических свойствах фермента уже через 1 неделю, а через 8 недель негативный эффект существенно усилился (табл. 3). Индивидуальный фермент через неделю сохраняет до 80% своей активности, а в комплексе с частицами размером 1000 и 200 нм остаточная активность составляет 64–66%. Латекс с частицами диаметром 520 нм в первую неделю не

оказывает подавляющего воздействия на активность (86%). Однако через 8 недель все смеси с латексом сохраняют лишь 12–13% активности, в то время как свободная липаза – 30% (табл. 3).

Гораздо лучшие результаты получены для комплексов LPP : PS-COOH. Добавление отрицательно заряженных частиц стабилизировало работу панкреатической липазы через 1 неделю до 14%, через 1 месяц на 23%, хотя через 2 месяца разница в активности не превышала ошибку эксперимента.

Комплексы LCC : PS-COOH не помогают сохранить активность (92% у свободной липазы, 84% для комплексов). Для комплексов LWG : PS-COOH также наблюдается снижение активности в зависимости от соотношения на 30–40% в первую неделю и еще на 30% через месяц.

Для контроля в качестве полианионного гибкоцепного полимера была выбрана полиаспарагиновая (PAsp) кислота. Было сформировано несколько образцов с разным соотношением компонентов LPP-PAsp (1:10, 1:1, 10:1), однако существенного влияния на каталитические свойства панкреатической липазы не наблюдалось. Для всех концентраций полианиона обнаружено только небольшое повышение активности от 103 до 106%, что представляет собой достаточно позитивный эффект.

В качестве поликатионных биополимеров были выбраны гибкоцепной полилизин и жесткоцепной хитозан. Эти полимеры отличаются по химической природе, включая соответственно полипептид и полисахарид. Однако у обоих биополимеров знак заряда определяется первичными аминогруппами. Оба биополимера использовали для формиро-

вания комплексов с варьируемым молярным соотношением панкреатической липазы и полимера (табл. 4).

С увеличением содержания хитозана в смеси с ферментом (табл. 4) активность LPP линейно падает. Ее величина уменьшается от незначительной (на уровне ошибки измерения) в комплексе LPP-Chi при соотношении компонентов 100:1 до 54% при соотношении 2:1. Однако эквимолярное соотношение компонентов приводит к менее значительному уменьшению активности липазы (всего на 21%), что может быть обусловлено как соотношением зарядов компонентов, так и жесткостью полимерной цепи хитозана.

В последующих экспериментах нами был выбран гибкоцепной положительно заряженный биополимер – полилизин. Полилизин в небольших количествах (при соотношении 100:1, 50:1 и 25:1) снижает активность фермента на 35–36% (табл. 4). Дальнейшее увеличение содержания пептида в смеси (соотношение 10:1 и 5:1) увеличивает активность LPP относительно активности свободного фермента на 17 и 9% соответственно (табл. 4). Однако эквимолярное соотношение компонентов (липазы и полилизина) в системе приводит к снижению активности фермента на 8% (табл. 4).

Таким образом, смеси липазы LPP с одинаковыми соотношением хитозана или полилизина ведут себя противоположным образом, что подтверждает высказанные нами предположения о различиях во взаимодействии этих компонентов в указанных комплексах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-03-00717).

Конфликта интересов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eremeev N.L., Zaitsev S.Y. // *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. 2016. Vol. 13. N 1. С. 78.
2. Sheldon R.A. // *Biochemical Society Transactions* 2007. Vol. 35. N 6. P. 1583.
3. Безбородов А.М. Загустина Н.А. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2014. Т. 30. № 4. С. 347.
4. Aravindan R., Anbumathi P., Viruthagiri T. // *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2009. Vol. 52. N 1. P. 207.
5. Thakur S. // *International Journal of Scientific & Engineering Research*. 2012. Vol. 3. P. 1.
6. Savina A.A., Salahuddin A., Zaitsev S.Yu. // *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. 2015. N 12. С. 63.
7. Ansari S.A., Husain Q. // *Biotechnol Adv.* 2012. Vol. 30. N 3. P. 512.
8. Gan Z., Zhang T., Liu Y., Wu D. // *PLoS One*. 2012. Vol. 7. N 10. P. e47154.
9. Motevalizadeh S.F., Khoobi M., Shabanian M., Asadgol Z. // *Materials Chemistry and Physics*. 2013. Vol. 143. P. 76.
10. Gorecka E., Jastrzebska M. // *Biotechnol Food Sci*. 2011. Vol. 75. P. 65.

Поступила в редакцию 10.01.2019

Получена после доработки 12.02.2019

Принята к публикации 14.02.2019

CHANGES IN THE ACTIVITY OF LIPAZ IN THE PRESENCE OF SYNTHETIC AND NATURAL POLYMERS

A.A. Savina, L.S. Garnashevich, I.S. Zaitsev, M.S. Tsarkova, S.Yu. Zaitsev*

(*ФГБОУ ВО МГАВМиБ – Moscow Veterinary Academy named after K.I. Skryabin:*
e-mail: s.y.zaitsev@mail.ru)

Both synthetic and natural polymers are promising carriers for immobilizing enzymes, including lipases from various sources. This direction is both of fundamental and applied importance, since immobilized lipases are widely used in various biotechnological processes. This work is devoted to study the effect of synthetic and natural polymers (polystyrene with different surfaces, polylysine, chitosan) on the catalytic properties of lipases from the hog pancreatic gland (LPP), *Candida Celydracea* (LCC) fungi and wheat germ (LWG) during the hydrolysis of triacetin (as a substrate in all experiences). It was established that latex based on polystyrene (even without surface modification) significantly affects the activity of lipases of different origin, especially in the presence of large particles of about 1 micron in size (regardless of their concentration in the range of 1–10%), the activity of all three lipases (LPP, LCC, LWG) is significantly increased relative to the non-immobilized enzyme. Polystyrene latex with a carboxylated surface showed another effect on the catalytic properties of these same lipases. The dependence of the activity of lipase LPP on the concentration of chitosan (at their ratios from 100:1 to 1:1), as well as on the parameters of the medium (pH, temperature), was found. Measurement of the catalytic activity of lipase with polylysine showed that, at their ratios of 10:1 and 5:1 (excess LPP), there was an increase in the activity of the enzyme as compared to its free form by 17 and 9%, respectively. This is due to the interaction of a positively charged polylysine with an enzyme (having an excess negative charge). The results obtained are promising for use in biotechnology.

Key words: lipases, polystyrene microparticles, chitosan, polylysine, catalytic activity.

Сведения об авторах: *Савина Анастасия Анатольевна* – зав. учебной лабораторией кафедры химии имени профессоров С.И. Афонского, А.Г. Малахова, ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, аспирант (kirablackfire@mail.ru); *Гарнашевич Лилия Сергеевна* – зав. учебной лабораторией кафедры химии имени профессоров С.И. Афонского, А.Г. Малахова, ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, магистр (garnalily@gmail.com); *Зайцев Илья Сергеевич* – зав. учебной лабораторией кафедры химии имени профессоров С.И. Афонского, А.Г. Малахова, ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, канд. хим. наук (chemil@inbox.ru); *Царькова Марина Сергеевна* – профессор кафедры химии имени профессоров С.И. Афонского, А.Г. Малахова, ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА им. К.И. Скрябина, докт. хим. наук, marina.tsarkova@gmail.com; *Зайцев Сергей Юрьевич* – зав. кафедрой химии имени профессоров С.И. Афонского, А.Г. Малахова, ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА им. К.И. Скрябина, докт. биол. наук, докт. хим. наук, профессор (szaitsev@mail.ru).