

УДК 577.325

## Оптимизация методики иммобилизации фицина с использованием глутарового альдегида

© 2020 С.С. ОЛЬШАННИКОВА<sup>1</sup>, М.Г. ХОЛЯВКА<sup>1\*</sup>, В.Г. АРТЮХОВ<sup>1</sup><sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, 394018

\*e-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила 03.04.2020 г.  
После доработки 03.06.2020 г.  
Принята в печать 12.09.2020 г.

Осуществлена ковалентная иммобилизация фицина на матрице кислоторастворимых среднемолекулярного (200 кДа) и высокомолекулярного (350 кДа) хитозанов. Проведены иммобилизация молекул фермента в белковой пленке и его сополимеризация с глутаровым альдегидом. Оптимальное соотношение содержания белка, общей и удельной активности иммобилизованного фермента выявлено при использовании 15%-ного глутарового альдегида для иммобилизации на матрице среднемолекулярного хитозана и 10%-ного глутарового альдегида для высокомолекулярного хитозана. Полученные биокатализаторы перспективны для применения в промышленности.

*Ключевые слова:* фицин, хитозан, глутаровый альдегид, ковалентная иммобилизация.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-5-81-88

В настоящее время иммобилизованные ферменты приобретают все большую актуальность. Преимущество иммобилизованных препаратов перед растворимыми заключается в их большей стабильности, возможности регенерации и отделения иммобилизованного фермента от продукта реакции [1, 2]. Современные тенденции при разработке композиционных материалов в качестве основы для иммобилизации состоят в придании им ряда новых свойств, таких как: способность подвергаться разложению в естественных условиях среды, низкий уровень неспецифических взаимодействий с примесями и биологически активными веществами, механическая устойчивость, наличие функциональных групп, пригодных для селективной химической модификации, экологическая чистота процессов синтеза [3–5].

Химические методы иммобилизации ферментов в настоящее время являются доминирующим способом получения гетерогенных биокатализаторов. Выделяют два основных подхода к химической иммобилизации ферментов: 1) иммобилизация на полимерном носителе (с использованием сшивающего агента или без него); 2) поперечная сшивка молекул белка без использования носителя [6]. При первом способе иммобилизации в процессе химической реакции создаются ковалентные связи между белком и носителем,

обеспечивающие прочную и необратимую связь фермента с носителем и в ряде случаев стабилизацию молекулы энзима [7, 8]. Использование бифункциональных сшивающих агентов различной длины отдаляет фермент от носителя, предотвращая тем самым нарушение его пространственной структуры [9, 10].

Иммобилизация методом поперечных сшивок (второй способ химической иммобилизации) заключается в химическом связывании молекул фермента между собой путем образования поперечных сшивок. Такая матрица может содержать только молекулы целевого фермента, однако, с экономической точки зрения обычно целесообразнее получать сополимеры фермента с инертным белком, например, с альбумином [11].

Одним из часто используемых сшивающих агентов является глутаровый альдегид, содержащий две альдегидные группы на обоих концах цепи. Эти группы при нейтральных значениях pH реагируют со свободными аминогруппами белка и носителя с образованием оснований Шиффа [12]. В образовании оснований Шиффа при взаимодействии альдегидных групп глутарового альдегида с белками в реакции участвуют  $\alpha$ -аминогруппы N-концевых аминокислот и  $\epsilon$ -аминогруппы лизиновых остатков. Образующаяся альдиминная связь оказывается сопряженной

с двойной этиленовой связью (в молекуле глутарового альдегида), что приводит к стабилизации продуктов сшивки. Альдиминная связь медленно переходит в более стабильную кетоаминную связь, благодаря чему процесс модификации аминокислотных групп белков глутаровым альдегидом практически необратим. В результате реакции образуются олигомеры, т.к. все функциональные группы при поликонденсации реагируют независимо [13]. Образование олигомеров белков в присутствии глутарового альдегида вызвано как внутримолекулярными химическими мостиками между функциональными группами одной молекулы белка, так и межмолекулярными ковалентными связями между функциональными группами, принадлежащими разным белковым макромолекулам. Конечный баланс связей зависит от количества доступных реакционно-способных (непротонированных) аминокислотных групп белка, их расположения на поверхности белковой глобулы, а также от величины общего заряда диполярного белкового макроиона в условиях сшивки. В результате образования межмолекулярных связей увеличивается молекулярная масса белкового олигомера, при этом образуются разветвленные макромолекулы, полидисперсные по размеру [14].

Хитозан, являющийся продуктом деацетилирования хитина, имеет свободные аминокислотные группы и может использоваться для ковалентной иммобилизации ферментов с помощью таких бифункциональных реагентов, как диальдегиды, диизоцианаты [15, 16]. Употребление хитозана в качестве носителя дает положительные результаты, так как полученные препараты иммобилизованных ферментов сохраняя каталитическую активность обладают высокой устойчивостью к микробному воздействию, и в ряде случаев наблюдается существенное повышение термостабильности белков [17, 18].

Фицин (КФ 3.4.22.3) — протеолитический фермент, выделенный из плодов, стеблей и листьев тропических растений рода *Ficus*. Фицин принадлежит к группе сульфгидрильных протеиназ [19]. Молекула фермента состоит из одной полипептидной цепи с N-концевым остатком лейцина. Интересная особенность аминокислотного состава — присутствие только одного остатка гистидина. Всего в молекуле фицина содержится восемь остатков цистеина, два из которых находятся в активном ферменте в форме цистеина, а остальные образуют три дисульфидные связи.

Благодаря своим свойствам фицин получил широкое применение в фармацевтической, кожевенной и особенно пищевой промышленности [20]. Эта растительная протеаза, используется

в тендеризации мяса [21], для изготовления сыра из ультрафильтрованного бычьего молока [22], в пивоваренной промышленности [23, 24]. Папаин, фицин и бромелаин считаются безопасными для человека и имеют статус GRAS (Generally Regarded As Safe) федерального агентства США (CFR 1999, 2009) [25].

Рядом ученых уже предпринимались попытки иммобилизации фицина на различных носителях. В частности, он был иммобилизован на аминированной агарозе [28], на глиоксил-агарозе без предварительной обработки [26, 27], а также с предварительным аминированием карбоксильных групп этилендиамином в присутствии карбодимида [29]. Подобная обработка существенно повлияла как на активность фермента, так и на его стабильность. Фицин был включен в электроформованные полимерные нановолокна на основе поливинилового спирта [30], инкапсулирован в мезопористые металлоорганические структуры [31].

Иммобилизация может быть достигнута для многих ферментов в широком диапазоне условий, которые следует выбирать в соответствии с конкретными задачами. Эти условия часто определяются методом проб и ошибок, потому что успешность иммобилизации критически зависит от тонкого баланса таких факторов, как природа фермента [32–34], концентрация фермента [35], носителя и/или сшивающего агента [36], значение pH среды [37], ионная сила раствора [38], температура [39] и время реакции [40].

Концентрации фермента и глутарового альдегида должны быть тщательно подобраны для получения нерастворимых в воде производных фермента посредством ковалентного связывания; низкие концентрации фермента и альдегида имеют тенденцию вызывать внутримолекулярные сшивки, повышая вероятность того, что функциональные группы глутарового альдегида будут реагировать с одной и той же молекулой фермента [36]. Таким образом, следует тщательно выбирать условия, чтобы способствовать межмолекулярному сшиванию белковых глобул вместо нежелательных внутримолекулярных связей [41, 42]. В исследованиях Broun G.B. [33] показано, что количество используемого сшивающего агента влияет на степень или силу связывания. Так низкие концентрации глутарового альдегида не способны образовывать достаточное количество сшивок, чтобы вызвать осаждение фермента. При более высоких концентрациях степень связывания была достаточной для образования плотной нерастворимой структуры, частично за счет исключения молекул воды [33]. Ферментативная активность трипсина была обратно пропорциональна концентрации

используемого глутарового альдегида, потому что многоточечное связывание могло привести к изменению структуры фермента (в том числе конформации активного центра) [43]. Кроме того, следует также учитывать мольное соотношение фермента и глутарового альдегида [44]. Сшивание молекул трипсина глутаровым альдегидом может быть достигнуто в широком диапазоне мольных соотношений компонентов в 50 мМ натрий-фосфатном буфере при pH 6,8, но время, необходимое для начала осаждения агрегата, составляет от 0,5 до 120 мин для соотношений фермент: глутаровый альдегид от 1:500 до 1:25 соответственно [45].

Учитывая вышеизложенное, целью нашей работы была оптимизация методики ковалентной иммобилизации молекул фицина на матрице хитозана с использованием глутарового альдегида.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования был выбран фицин (Sigma, США), субстратом при определении ферментативной активности служил азоказеин (Sigma), носителями для иммобилизации — кислоторастворимые среднемолекулярный (200 кДа) и высокомолекулярный (350 кДа) хитозаны (ЗАО «Биопрогресс», Россия).

### Ковалентная иммобилизация фицина на матрице хитозана

К 100 мг носителя добавляли 8 мл раствора фицина с концентрацией 1 мг/мл в 0,05 М глициновом буфере pH 10,0 при иммобилизации на среднемолекулярном и pH 8,6 при иммобилизации на высокомолекулярном хитозане и 10 мл глутарового альдегида с концентрациями: 1%, 2,5%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%. Смесь инкубировали с периодическим перемешиванием в течение 1 ч при температуре 4 °С. Суспензию центрифугировали при 1500 г в течение 10 мин. Образовавшийся осадок промывали 0,05 М трис-НСl буфером pH 7,5 до отсутствия в промывных водах белка (контроль осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 при  $\lambda = 280$  нм).

Соотношение фицин/носитель и концентрация фицина были выбраны, согласно циклу работ Siar E.H. et. al. [26–29], а щелочные значения pH среды (8,6, 10,0) для иммобилизации фицина — после анализа статей [28, 46].

### Сополимеризация фицина с глутаровым альдегидом

**1. Получение сополимера фицин–глутаровый альдегид:** 5 мг фицина растворяли в 5 мл 0,05 М глицинового буфера pH 10,0, затем добавляли 5 мл глутарового альдегида

с концентрацией 2 или 10% и оставляли в чашке Петри до высыхания при температуре 4 °С.

**2. Получение сополимера фицин–БСА–глутаровый альдегид:** 20 мг фицина добавляли к 5 мл раствора бычьего сывороточного альбумина (с концентрацией 300 мг/5 мл 0,02 М фосфатного буфера pH 8,6), затем приливали 15 мл 2,5%-ного глутарового альдегида и осторожно перемешивали. Полученный раствор помещали на горизонтальную пластинку и оставляли при 4 °С до высыхания. После окончания инкубации образовавшийся осадок (или пленку) промывали 0,05 М трис-НСl буфером pH 7,5 до отсутствия в промывных водах белка (контроль осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 при  $\lambda = 280$  нм).

### Определение протеолитической активности фицина

Определение протеолитической активности фицина проводили с использованием в качестве субстрата азоказеина (Sigma) [47]. К 50 мг образца иммобилизованного фермента добавляли 200 мкл 0,05 М трис-НСl буфера pH 7,5, 800 мкл раствора азоказеина (0,5% в 0,05 М трис-НСl буфере, pH 7,5) и инкубировали 2 ч при 37 °С. Далее добавляли 800 мкл 5%-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ), инкубировали 10 мин при 4 °С, затем центрифугировали в течение 3 мин при 11 700 g для удаления негидролизованного азоказеина. К 1200 мкл супернатанта добавляли 240 мкл 3%-ного NaOH для нейтрализации ТХУ, после чего измеряли оптическую плотность опытной пробы при 410 нм в 10 мм кювете. Контрольная проба содержала 800 мкл азоказеина, 800 мкл ТХУ, 50 мг образца и 200 мкл буфера (иммобилизованный фермент в контрольную пробу вносили последним, остальные операции для нее делали аналогично опытным пробам).

Единицей каталитической активности служило количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкМоль субстрата за 1 мин. Удельную протеолитическую активность рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{D}{1000 \times 120 \times 200 \times C}$$

где

*A* — протеолитическая активность препарата, мкМоль/мин на 1 мг белка,

*D* — оптическая плотность раствора при 410 нм,

*C* — концентрация белка в пробе, мг/мл, измеренная по методу Лоури,

120 — время инкубации в минутах,

200 — объем пробы,

1000 — коэффициент для пересчета в мкМоль.

**Характеристики биокатализаторов на основе фицина, иммобилизованного с использованием глутарового альдегида****Characteristics of ficin-based biocatalysts immobilized using glutaraldehyde**

Концентрация глутарового альдегида, %	Содержание белка, мг/г носителя	Общая каталитическая активность, ед/мл раствора	Удельная каталитическая активность, ед/мг белка
<b>Фицин, иммобилизованный на среднемoleкулярном хитозане</b>			
1	8,8 ± 1,5	81,4 ± 4,4	184,2 ± 9,9
2,5	13,2 ± 1,3	39,1 ± 6,5	58,9 ± 9,8
5	18,2 ± 2,3	112,2 ± 10,6	169,1 ± 15,9
10	23,9 ± 3,2	147,0 ± 11,0	221,6 ± 16,6
15	27,8 ± 2,2	154,5 ± 10,7	232,9 ± 16,1
20	33,1 ± 1,6	34,2 ± 2,1	51,5 ± 3,1
25	76,5 ± 12,0	16,7 ± 0,8	21,9 ± 2,3
<b>Фицин, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане</b>			
1	9,6 ± 0,6	61,5 ± 8,1	139,2 ± 18,4
2,5	10,0 ± 0,5	106,1 ± 8,2	160,0 ± 12,3
5	15,6 ± 1,7	95,1 ± 4,5	143,4 ± 6,7
10	23,8 ± 2,4	160,7 ± 4,9	242,2 ± 7,5
15	18,1 ± 2,3	64,5 ± 5,1	97,2 ± 7,6
20	28,9 ± 1,6	80,7 ± 7,0	121,7 ± 10,6
25	18,9 ± 11,9	29,6 ± 3,4	76,1 ± 8,9
<b>Фицин, иммобилизованный методом сополимеризации фермента*</b>			
2	165,9 ± 9,2	66,2 ± 10,2	25,6 ± 3,9
10	16,3 ± 7,1	48,5 ± 4,8	111,7 ± 11,1
<b>Фицин, иммобилизованный в белковой пленке</b>			
2,5	2,4 ± 0,8	55,2 ± 14,0	463,1 ± 117,6

\* Указано содержание белка в мг/г полимера

\*The protein content is indicated in mg/g polymer

Содержание белка в иммобилизованных препаратах фицина определяли модифицированным методом Лоури [48]. 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<sub>2</sub>Na-тартрата, приготовленном на 1 М NaOH, при 37 °С в течение 10 мин. Далее определение проводили как обычно.

Все экспериментальные исследования осуществляли минимум в 8-кратной повторности. Статистическая обработка полученных результатов проводилась традиционным способом при уровне значимости 5% с использованием t-критерия Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Рассмотрев работы других авторов и базируясь на результатах собственных исследований, мы убедились в том, что иммобилизация фицина

может приводить к значительной потере активности ферментного препарата, однако, подбирая соответствующий носитель и метод образования связи между взаимодействующими компонентами, можно значительно уменьшить неблагоприятное влияние матрицы на структурно-функциональные свойства энзима и тем самым повысить удельную активность иммобилизованного биокатализатора.

Наиболее высокое содержание белка (в мг/г носителя) в гетерогенных препаратах наблюдалось при иммобилизации фицина с помощью ковалентного связывания на матрице среднемoleкулярного и высокомолекулярного хитозанов при использовании 25%-ного глутарового альдегида и при сополимеризации фермента с 2%-ным глутаровым альдегидом. Однако общая активность иммобилизованного фицина (в ед./мл раствора) была выше при его связывании с матрицей среднемoleкулярного хитозана с применением 10% и 15%-ного глутарового альдегида. При создании гетерогенных препаратов на основе высокомолекулярного хитозана наибольшая общая активность отмечена при

**Процент сохранения каталитической активности фицина после иммобилизации на различных носителях**  
**Remaining catalytic activity of ficin after immobilization on various supports**

Образец	Процент сохранения активности после иммобилизации, %	Источник сведений
фицин, иммобилизованный ковалентным методом на среднемoleкулярном хитозане с использованием глутарового альдегида	24	наши данные, полученные при иммобилизации в оптимальных условиях
фицин, иммобилизованный ковалентным методом на высокомолекулярном хитозане с использованием глутарового альдегида	25	
фицин, иммобилизованный методом сополимеризации фермента	~ 3	
фицин, иммобилизованный в белковой пленке	48	
включение фицина в электроформованные полимерные нановолокна на основе поливинилового спирта	92	[30]
фицин, иммобилизованный на глиоксил-агарозе без предварительной обработки	30	[49]
фицин, иммобилизованный на глиоксил-агарозе с аминированием	60	[26]
фицин, иммобилизованный на агарозных шариках, активированных глутаровым альдегидом	80	[28]
композит, состоящий из фицина и металлоорганической структуры цинк-2-метилимидазола	90	[50]

использовании 10%-ного глутарового альдегида (табл. 1). Вероятно, более высокое содержание глутарового альдегида нарушает структуру фермента за счет большего количества точек связывания.

Наибольшую удельную активность показали препараты фицина, иммобилизованного на матрице среднемoleкулярного хитозана при использовании 10% и 15%-ного глутарового альдегида. При получении биокатализаторов на основе высокомолекулярного хитозана наибольшая удельная активность фермента наблюдалась при использовании глутарового альдегида с 10%-ной концентрацией.

Высокие значения удельной активности показал и препарат, иммобилизованный в белковой пленке с 2,5%-ным глутаровым альдегидом (табл. 1), однако, в этом образце было наименьшее содержание фицина —  $2,4 \pm 0,8$  мг/г препарата. Добавление инертного, богатого остатками лизина белка (например, бычьего сывороточного альбумина) помогает решить проблему обширной модификации молекул фермента если доступно только небольшое его количество.

Удельная активность используемого нами препарата свободного фицина составила  $962 \pm 23$  ед/мг белка, это значение было принято за 100% при расчете процента сохранения активности фермента после иммобилизации (табл. 2).

По проценту сохранения каталитической активности фицина после иммобилизации, наш препарат уступает некоторым аналогам [26, 28,

30, 50], однако, для промышленного внедрения биокатализатора этот критерий далеко не единственный. Для реализации крупнотоннажного производства способ иммобилизации должен быть по возможности простым, а носитель недорогим. Сочетание относительно дешевых компонентов и несложных операций, не требующих специального оборудования, позволит сделать доступным предлагаемую нами методику для отечественных лабораторий. Хитозаны различной молекулярной массы и степени деацетилирования уже несколько лет производятся компанией «Биопрогресс». В связи с этим предлагаемые нами препараты на основе иммобилизованного фицина и носителей отечественного производства внесут свой вклад в проблему импортозамещения биокатализаторов на российском рынке.

Помимо указанных трудностей, существует еще одна — микробное загрязнение, которое может быть причиной порчи продукта и закупорки реактора, если речь идет о реакторе с неподвижным слоем. Кроме того, фермент сам по себе является белком, что делает катализатор подверженным микробной атаке. Хитозан обладает антибактериальным и противогрибковым действием [51, 52], его активно применяют в качестве консерванта для стабилизации фармацевтических и косметических средств [53, 54], по этой причине иммобилизация фицина на его матрице может решить проблему микробного загрязнения биокатализатора.

Предложены методики ковалентной иммобилизации фицина на хитозане с использованием различных концентраций глутарового альдегида. Наиболее высокое содержание белка ( $165,9 \pm 9,2$  мг/г полимера) было получено при сополимеризации фицина с 2%-ным глутаровым альдегидом. Общая активность фермента была максимальной при его иммобилизации на матрице среднемолекулярного хитозана с 15%-ным глутаровым альдегидом ( $154,5 \pm 10,70$  ед./мл раствора) и высокомолекулярного хитозана с 10%-ным глутаровым альдегидом ( $160,7 \pm 4,9$  ед./мл раствора), а наибольшая удельная активность фицина ( $463,1 \pm 117,6$  ед./мг белка) — при его иммобилизации в белковой пленке с 2,5%-ным глутаровым альдегидом. При этом оптимальное соотношение содержания белка, общей активности и удельной активности выявлено при ковалентной иммобилизации фицина на матрице среднемолекулярного хитозана с 15%-ным глутаровым альдегидом и высокомолекулярного хитозана с 10%-ным глутаровым альдегидом. Полученные биокатализаторы перспективны для применения в кожевенной и пищевой промышленности, и могут внести свой вклад в проблему импортозамещения ферментных препаратов на российском рынке.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — докторов наук МД-1982.2020.4. Соглашение 075-15-2020-325.

## ЛИТЕРАТУРА

- Efremenko E.N., Stepanov N.A., Nikolskaya A.B., et al. Biocatalysts based on immobilized cells of microorganisms in the production of bioethanol and biobutanol. *Catalysis in Industry*, 2011, 3(1), 41–46. doi:10.1134/s207005041101003x
- Kourkoutasa Y., Bekatorou A., Banatb I.M., et al. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol.*, 2004, 21(4), 377–397. doi:10.1016/j.fm.2003.10.005
- Холявка М.Г., Артюхов В.Г. Иммобилизованные биологические системы: биофизические аспекты и практическое применение: учебное пособие. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2017, 261
- Осипова Т.А., Тишков В.И., Варфоломеев С.Д. Краткая история создания и развития научного направления «Иммобилизованные ферменты» в России. *Вестник Моск. ун-та. Серия 2: Химия*, 2014, 55 (2), 59–70.
- Холявка М.Г., Наквасина М.А., Артюхов В.Г. Практикум по биотехнологии: иммобилизованные биологические объекты в системе лабораторных работ. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2017, 161
- Тривен М.Д. Иммобилизованные ферменты. М.: Мир, 1983, 213
- Cherednikova T.V., Muronetz V.I., Nagradova N.K. Study of subunit interactions in immobilized d-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta — Enzymol.*, 1980, 613 (2), 292–308. doi: 10.1016/0005-2744(80)90084-4
- Ashmarina L.I., Muronetz V.I., Nagradova N.K. Immobilized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase forms a complex with phosphoglycerate kinase. *Biochem. Int.*, 1984, 9 (4) 511–521.
- Efremenko E., Peregudov A., Kildeeva N., Perminov P., Varfolomeyev S. New enzymatic immobilized biocatalysts for detoxify cation of organophosphorus compounds. *Biocatal. Biotransform.*, 2005, 23(2), 103–108. doi:10.1080/10242420500132474
- Холявка М.Г., Беленова А.С., Макарова Е.Л., Ковалева Т.А., Артюхов В.Г. Иммобилизация гидролаз как один из путей регулирования и стабилизации их активности. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013, 7, 29–36.
- Юрин В.М., Дитченко Т.И. Иммобилизованные клетки и ферменты: учебно-методический комплекс по учебной дисциплине. Минск: БГУ, 2014, 138
- Наквасина М.А. Основы молекулярной и клеточной биологии: учебное пособие. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2015, 158
- Monsan P., Puzo G., Mazarguil H. Etude du mecanisme d'etalissement des liaisons glutaraldehyde proteins. *Biochimie*, 1975, 57(11–12), 1281–1292.
- Платэ Н.А., Васильев А.Е. Физиологически активные полимеры. М., Химия, 1986, 296
- Варламов В.П., Немцев С.В., Тихонов В.Е. Хитин и хитозан: природа, получение и применение. Щелково: Российское хитиновое общество, 2010, 292
- Crini G., Badot P. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. *Prog. Polym. Sci.*, 2008, 33, 399–447. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.11.001
- Скрябин К.Г. Вихорева Г.А., Варламов В.П. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. Москва: Наука, 2002, 360
- Гамзададе А.И. Производные хитина/хитозана контролируемой структуры в качестве потенциально новых биоматериалов: дис д. хим. наук, Москва, 2005, 363
- Мосолов В.В. Протеолитические ферменты. М.: Наука, 1971, 404
- Кретович В.Л. Введение в энзимологию. М.: Наука, 1986, 336

21. Marostica M.R., Pastore, G.M. Some nutritional, technological and environmental advances in the use of enzymes in meat products. *Enzyme Res.*, 2010, Article ID 480923, 1–8. doi: 10.4061/2010/480923
22. Low Y.H., Agboola S., Zhao J., Lim M.Y. Clotting and proteolytic properties of plant coagulants in regular and ultrafiltered bovine skim milk. *Int. Dairy J.*, 2006, 16, 335–343. doi: 10.1016/j.idairyj.2005.03.013
23. Priest F.G., Stewart G.G. *Handbook of Brewing* (2nd ed.). New York: CRC, 2006.
24. Jones B.L. Endoproteases of barley and malt. *J. Cereal Sci.*, 2005, 42(2), 139–156. doi: 10.1016/j.jcs.2005.03.007
25. Naveena B.M., Mendiratta S.K., Anjaneyulu A.S.R. Tenderization of buffalo meat using plant proteases from *Cucumis trigonus Roxb* (Kachri) and *Zingiber officinale roscoe* (Ginger rhizome). *Meat Science*, 2004, 68(3), 363–369. doi: 10.1016/j.meatsci.2004.04.004
26. Siar E.H., Morellon-Sterling R., Zidoune M.N., Fernandez-Lafuente R. Use of glyoxyl-agarose immobilized ficin extract in milk coagulation: Unexpected importance of the ficin loading on the biocatalysts. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, 144, 419–426. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.140
27. Siar E.H., Pena S.A., Barbosa O., Zidoune M.N., Fernandez-Lafuente R. Solid phase chemical modification of agarose glyoxyl-ficin: Improving activity and stability properties by amination and modification with glutaraldehyde. *Process Biochem.*, 2018, 73, 109–116. doi: 10.1016/j.procbio.2018.07.013
28. Siar E.H., Arana-Pena S., Barbosa O., Zidoune M.N., Fernandez-Lafuente R. Immobilization/stabilization of ficin extract on glutaraldehyde-activated agarose beads. Variables that control the final stability and activity in protein hydrolyses. *Catalysts*, 2018, 8, 149. doi: 10.3390/catal8040149
29. Siar E., Morellon-Sterling R., Zidoune M.N., Fernandez-Lafuente R. Amination of ficin extract to improve its immobilization on glyoxyl-agarose: Improved stability and activity versus casein. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, 133, 412–419. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.123
30. Rojas-Mercado A.S., Moreno-Cortez I.E., Lucio-Porto R., Pavon L.L. Encapsulation and immobilization of ficin extract in electrospun polymeric nanofibers. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, 118 (B), 2287–2295. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.07.113
31. Zheng W., Liu J., Yi D., Pan Y., Long Y., Zheng H. Ficin encapsulated in mesoporous metal-organic frameworks with enhanced peroxidase-like activity and colorimetric detection of glucose. *Spectrochim. Acta, Part A*, 2020, 233, 1–26. doi: 10.1016/j.saa.2020.118195
32. Avrameas S., Ternynck T. The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbents. *Immunochem.*, 1969, 6, 53–66. doi: 10.1016/0019-2791(69)90178-5
33. Broun G.B. Chemically aggregated enzymes, In K. Mosbach (Ed.), *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press, 1976, 263–280.
34. Kennedy J.F., Cabral J.M.S. Immobilized enzymes, In W.H. Scouten (Ed.), *Solid Phase Biochemistry: Analytical and Synthetic Aspects*. New York: John Wiley & Sons, 1983, 253–391.
35. Zaborsky O.R. *Immobilized Enzymes*. Cleveland: CRC Press, 1973.
36. Jansen E.F., Tomimatsu Y., Olson A.C. Cross-linking of  $\alpha$ -chymotrypsin and other proteins by reaction with glutaraldehyde. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1971, 144, 394–400.
37. Tomimatsu Y., Jansen E.F., Gaffield W., Olson A.C. Physical chemical observations on the  $\alpha$ -chymotrypsin glutaraldehyde system during formation of an insoluble derivative. *J. Colloid Interface Sci.*, 1971, 36, 51–64. doi:10.1016/0021-9797(71)90239-6
38. Ottesen M., Svensson B. Modification of papain by treatment with glutaraldehyde under reducing and non-reducing conditions. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg.*, 1971, 38, 171–185.
39. Jansen E.F., Olson A.C. Properties and enzymatic activities of papain insolubilized with glutaraldehyde. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1969, 129, 221–227.
40. Bano B., Saleemuddin M. Studies on chemically aggregated trypsin using glutaraldehyde. *Ind. J. Biochem. Biophys.*, 1980, 17, 12–17.
41. Gupta M.N. Cross-linking techniques: application to enzyme and protein stabilization and bioconjugate preparation, In M.E. Himmel and G. Georgiou (Eds.), *Biocatalyst Design for Stability and Specificity*. Washington DC: ACS Publications, 1993, 307–324. <https://pubs.acs.org/doi/book/10.1021/bk-1993-0516>
42. Gruen L.C., McTigue P.T. Hydration equilibria of aliphatic aldehydes in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O. *J. Chem. Soc.*, 1963, 5217–5223. doi: 10.1039/JR9630005217
43. Chui W.K., Wan L.S. Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres. *J. Microencapsulation*, 1997, 14, 51–61. doi: 10.3109/02652049709056467
44. Okuda K., Urabe I., Yamada Y., Okada H. Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds. *J. Ferment. Bioeng.*, 1991, 71, 100–105.
45. Migneault I., Dartiguenave C., Bertrand M.J., Waldron K.C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 2004, 37, 790–802. doi:10.2144/04375RV01
46. Rodrigues R.C., Barbosa O., Ortiz C., Berenguer-Murcia A., Torres R., Fernandez-Lafuente R. Amination of enzymes to improve biocatalyst performance: coupling genetic modification and physicochemical tools. *RSC Adv.*, 2014, 4, 38350–38374, doi: 10.1039/c4ra04625k

47. Sabirova A.R., Rudakova N.L., Balaban N.P., Ilyinskaya O.N., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Rudenskaya G.N., Sharipova M.R. A novel secreted metzincin metalloproteinase from *Bacillus intermedius*. *FEBS Lett.*, 2010, 584 (21), 4419–4425. doi: 10.1016/j.febslet.2010.09.049
48. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Faar A.L., Randall R.J. Protein measurement with folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265–275.
49. Siar E.H., Zaak H., Kornecki J.F., Zidoune M.N., Barbosa O., Fernandez-Lafuente R. Stabilization of ficin extract by immobilization on glyoxyl agarose. Preliminary characterization of the biocatalyst performance in hydrolysis of proteins. *Process Biochem.*, 2017, 58, 98–104. doi:10.1016/j.procbio.2017.04.009
50. Pan Y., Pang Y., Shi Y., Zheng W., Long Y., Huang Y., Zheng H. One-pot synthesis of a composite consisting of the enzyme ficin and a zinc(II)-2-methylimidazole metal organic framework with enhanced peroxidase activity for colorimetric detection for glucose. *Microchim. Acta*, 2019, 186 (4), 1–8. doi: 10.1007/s00604-019-3331-y
51. Gerasimenko D.V., Avdienko I.D., Bannikova G.E., Zueva O.Yu., Varlamov V.P. Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2004, 40 (3), 253–257. doi: 10.1023/B:ABIM.0000025947.84650.b4
52. Kulikov S.N., Bayazitova L.T., Tyupkina O.F., Zelenikhin P.V., Salnikova M.M., Bezrodnykh E.A., Tikhonov V.E. Evaluation of a method for the determination of antibacterial activity of chitosan. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2016, 52 (5), 502–507. doi: 10.1134/S0003683816050100
53. Леба Ж.-Л., Линк А., Стессель П., Вире Ж.-Л. Способ стабилизации косметических препаратов. Патент RU 2028138, МПК А61К 7/00, опубл. 09.02.1995
54. Новик Л.В. Основа для косметических средств. Патент RU 2136265, МПК А61К 7/00, А61К 7/48, А61К 9/06, опубл. 10.09.1999

## Optimization of a Method for Ficin Immobilization Using Glutaraldehyde

S.S. OLSHANNIKOVA<sup>1</sup>, M.G. HOLYAVKA<sup>1\*</sup> and V.G. ARTYUKHOV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Voronezh State University, Voronezh, 394018, Russia

e-mail: holyavka@rambler.ru

Received April 3, 2020

Revised June 3, 2020

Accepted September 12, 2020

**Abstract**—Ficin was covalently immobilized on an acid-soluble matrix of medium (200 kDa) and high molecular weight (350 kDa) chitosans. The enzyme molecules were immobilized in a protein film and copolymerized with glutaraldehyde. The optimal ratio of protein content, total activity and specific activity was observed as a result of ficin covalent immobilization on a matrix of medium-molecular chitosan with 15% glutaraldehyde and high-molecular chitosan with 10% glutaraldehyde. The obtained biocatalysts are promising for industrial applications.

**Key words:** ficin, chitosan, glutaraldehyde, covalent immobilization.

**Funding**—This work was financially supported by a grant from the President of the Russian Federation for state support to young Russian scientists—doctors of sciences MD-1982.2020.4. Agreement 075-15-2020-325).

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-5-81-88