DOI: 10.17117/na.2016.09.02.140

<http://ucom.ru/doc/na.2016.09.02.140.pdf>

Поступила (Received): 24.09.2016

Макарова Е.Л., Петракова И.В. Использование высокомолекулярных веществ белковой природы для создания препаратов пролонгированного действия

Makarova E.L., Petrakova I.V.
The use of high molecular weight substances of
protein nature to create a long-acting drugs

Нами была проведена сорбционная иммобилизация глюкоамилазы на коллагене, выделенном ферментативным методом из соединительной ткани крупного рогатого скота. Для определения активности глюкоамилазы использовали глюкозооксидазный метод. Экспериментальные данные показали, что иммобилизованная глюкоамилаза более стабильна к воздействию внешних факторов (рН, Т). Комплекс глюкоамилаза-коллаген обладает достаточной прочностью и не разрушался при гидролизе крахмала в реакторе периодического действия при многократном перемешивании

Ключевые слова: глюкоамилаза, активность, коллаген

We carried out the sorption immobilization of glucoamylase on collagen, a dedicated enzymatic method of the connective tissue of cattle. To determine glucoamylase activity using the glucose oxidase method. The experimental data showed that the immobilized glucoamylase is more stable to external factors (pH, T). Glucoamylase-collagen complex has sufficient strength and is not destroyed by the hydrolysis of starch in the batch reactor at repeated stirring

Key words: glucoamylase, activation, collagen

Макарова Екатерина Леонидовна

Кандидат биологических наук, ассистент
Воронежский государственный медицинский
университет им. Н.Н. Бурденко
г. Воронеж, ул. Студенческая, 10

Makarova Ekaterina Leonidovna

Candidate of Biological Sciences, Assistant
Voronezh state medical university named N.N.
Burdenko
Voronezh, Studencheskaya st., 10

Петракова Ирина Владимировна

Биолог
Воронежская областная клиническая больница №1
г. Воронеж, Московский проспект, 151

Petrakova Irina Vladimirovna

Biologist
Voronezh regional clinical hospital №1
Voronezh, Moskovsky ave., 151

Развитие медицинской энзимологии способствовало более широкому применению ферментативных препаратов в качестве терапевтических средств, при проведении клинических анализов, а также для диагностики различных заболеваний.

В медицине иммобилизованные ферменты открыли путь к созданию лекарственных препаратов со сниженной токсичностью и аллергенностью. Иммобилизация биологически активных веществ способствует решению проблемы направленного транспорта лекарств в организме и пролонгированному действию препаратов по сравнению с лекарственными соединениями традиционных форм.

В настоящее время разрабатываются методики создания препаратов медицинского и фармацевтического назначения на поверхности биосовместимой матрицы – коллагена или желатина.

Активные функциональные группы в коллагене и сложная молекулярная структура, склонная к образованию фибрилл и волокон, способствует как химическому связыванию, так и адсорбции биологически активных и лекарственных (низко- и высокомолекулярных) веществ, что дало возможность создать коллагеновые материалы направленного действия.

Создание таких препаратов пролонгированного действия убирает необходимость многократного введения в организм.

В связи с вышеизложенным, нами была проведена сорбционная иммобилизация глюкоамилазы (α -1,4:1,6 глюкан-4,6-глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3) на коллагене, выделенном ферментативным методом из соединительной ткани крупного рогатого скота [1, С. 141].

Объектом исследования послужил фермент глюкоамилаза из *Aspergillus awamori*, препарат Г20Х производства Ладыжинского завода ферментных препаратов, подвергнутый специальным методам очистки.

Для определения активности глюкоамилазы использовали глюкозооксидазный метод. Принцип метода заключается в том, что глюкоза окисляется кислородом воздуха при каталитическом действии глюкозооксидазы с образованием перекиси водорода и глюконата. Возникшую перекись водорода определяли по реакции окислительного азосочетания с замещенным фенолом и 4-аминоантипирином, которая катализируется пероксидазой.

Расчет каталитической активности производили по формуле:

$$A = \frac{a}{b \cdot 180 \cdot t},$$

где а – количество глюкозы, образовавшейся в 1 мл гидролизата, мкг; b – количество фермента в 1 мл гидролизата, мг/мл; t – время гидролиза, мин; 180 – молекулярная масса глюкозы.

В качестве субстрата использовали растворимый картофельный крахмал фирмы Экрос.

Сорбционную иммобилизацию фермента проводили на коллагене, выделенном ферментативным методом из соединительной ткани крупного рогатого скота на кафедре технологии мяса и мясopодуlктов Воронежской государственной технологической академии [2, С. 33-34].

Для осуществления сорбционной иммобилизации 5 г коллагена оставляли на ночь при комнатной температуре в 25,6 мл ацетатного буфера (рН 4,5).

5 мл раствора фермента (10^{-5} моль/л) добавляли к суспензии носителя и перемешивали в колбе с помощью электрической мешалки в течение 1,5 часа при температуре 25°C. Центрифугировали при 3000 об/мин 5 мин, осадок промывали ацетатным буфером (pH 4,5), затем дистиллированной водой до отсутствия в промывных водах белка (контроль осуществляли на спектрофотометре СФ-26 при $\lambda=280$ нм). Содержание белка в иммобилизованном ферменте определяли модифицированным методом Лоури [8], а каталитическую активность – глюкозооксидазным методом, причем инкубацию иммобилизованного фермента с субстратом осуществляли при перемешивании с помощью магнитной мешалки в течение 30 минут. После 30 минут взаимодействия фермента с субстратом достигается максимальная активность, после чего активность фермента не изменяется, что связано, по-видимому, с насыщением фермента субстратом.

Адсорбционно иммобилизованная глюкоамилаза из *Aspergillus Awamori* сохраняет 67% от каталитической активности нативного энзима [3, С. 19-22].

Фермент способен связывать молекулу субстрата таким образом, что атакуемая ферментом связь находится не только расположенной в непосредственной близости от каталитической группы, но и правильно ориентированной по отношению к ней. В результате возникает индуцированное соответствие, благодаря которому облегчается достижение комплексом переходного состояния. В настоящее время доказано, что в активных центрах ферментов находятся специфические аминокислотные остатки, являющиеся донорами или акцепторами протонов.

Экспериментальные данные показали, что иммобилизованная глюкоамилаза более стабильна к воздействию внешних факторов (pH, T). По нашим данным, температурный оптимум для иммобилизованного фермента смещается в сторону более высоких значений с максимальной активностью при 55 °C, полная инактивация наступает при 95 °C.

Выявлено, что для иммобилизованной глюкоамилазы характерен более широкий диапазон значений концентраций водорода, при которых она проявляет высокую каталитическую активность.

Комплекс глюкоамилаза-коллаген обладает достаточной прочностью и не разрушался при гидролизе крахмала в реакторе периодического действия при многократном перемешивании (в количестве 15 раз), что, по-видимому, объясняется большим количеством связей в комплексе фермент-носитель.

В результате проведения экспериментов, на исследование сроков хранения иммобилизованного биологически активного препарата было выявлено, что данный препарат сохраняет свою активность, что позволяет рекомендовать его применение в течение года. Использование данной технологии может повысить эффективность биологически активных веществ.

Список используемых источников:

1. Ковалева Т.А., Макарова Е.Л. Разработка технологии получения фармацевтических препаратов с применением биodeградируемых полимеров // IV Съезд биофизиков России Материалы докладов. Ответственный редактор: А.Б. Рубин. 2012. С. 141.

2. Макарова Е.Л., Ковалева Т.А., Петракова И.В. Разработка биотехнологических способов переработки отходов с целью создания иммобилизованных препаратов // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии 2013. С. 33-34.
3. Ковалева Т.А., Макарова Е.Л., Сливкин А.И., Короткова Е.В. Адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы из *Aspergillus Awamori* на коллагене // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2011. Т. 9. № 11. С. 19-22.

© 2016, Макарова Е.Л., Петракова И.В.
Использование высокомолекулярных веществ
белковой природы для создания препаратов
продолжительного действия

© 2016, Makarova E.L., Petrakova I.V.
*The use of high molecular weight substances of
protein nature to create a long-acting drugs*