*БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 3, с. 400–412*

*УДК 577.325*

# ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРИПСИНА С ИОНООБМЕННЫМИ ВОЛОКНАМИ И ХИТОЗАНОМ

**© 2021 г. С. М. Панкова*, Ф. А. Сакибаев*, М. Г. Холявка*, #, Ю. М. Вышкворкина**, А. Н. Лукин*, В. Г. Артюхов***

**Воронежский государственный университет, Россия, 394018 Воронеж, Университетская площадь, 1*

***Московский физико-технический институт, Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9*

Поступила в редакцию 17.06.2020 г.
После доработки 28.06.2020 г.
Принята к публикации 29.06.2020 г.

Изучена локализация заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков в молекуле трипсина и определено процентное соотношение аминокислот разных типов на поверхности глобулы фермента. Показано, что заряженные и гидрофобные аминокислотные остатки распределены по поверхности белка неравномерно, образуя участки локального скопления. Выявлено, что перспективными носителями для иммобилизации трипсина выступают ионообменные волокна ВИОН КН-1, ВИОН АН-1 и хитозан, поскольку сорбция на них позволила сохранить, соответственно, 54, 58 и 65% каталитической активности нативного фермента в растворе, измеренной по скорости гидролиза бычьего сывороточного альбумина. Проанализированы ИК-спектры свободного (нативного) фермента и иммобилизованного на полимерных носителях. Установлено, что при адсорбции трипсина на волокнах ВИОН преобладали электростатические взаимодействия и водородные связи. Карбоксильные группы ВИОН КН-1 взаимодействовали с положительно заряженными участками молекулы, содержащими в своем составе His, Lys и Arg. Большое количество аминогрупп ВИОН АН-1 и хитозана создавали избыточный положительный заряд, благодаря которому происходило связывание с отрицательно заряженными остатками Asp и Glu. Однако при адсорбции трипсина на хитозане ключевыми стали гидрофобные взаимодействия, в которых принимали участие остатки Gly, Ala, Tyr, Val, Phe, Pro и Leu.

*Ключевые слова: трипсин, адсорбция, анионообменное волокно ВИОН АН-1, катионообменное волокно ВИОН КН-1, хитозан*

**DOI:** 10.31857/S0132342321030143

## ВВЕДЕНИЕ

Субстратная специфичность протеаз определяется как строением их активного центра, так и размером молекулы гидролизуемого субстрата, а также аминокислотами, участвующими в образовании расщепляемой пептидной связи в белке [1].

Трипсин (КФ 3.4.21.4) – фермент семейства сериновых протеиназ, обладающий эстеразной активностью, гидролизует пептидные связи, образованные карбоксильными группами остатков аргинина и лизина и играет важную роль в ряде биологических процессов, включая пищеварение, активацию зимогенов химотрипсина и других ферментов. Молекулярная масса трипсина, выделенного из разных источников, составляет 23–24 кДа [2–4], $K_m$ = 0.240–0.485 мМ [5]. Оптимум каталитической активности наблюдается при pH 8.0 и 37°C [6]. Изоэлектрическая точка трипсина (pI) составляет 10.1–10.5 [7].

Молекула трипсина быка состоит из 223 а.о., образующих одну полипептидную цепь, и содержит шесть дисульфидных связей. Каталитически значимые аминокислотные остатки находятся между двухцепочечными доменами β-баррелей, упакованными друг против друга. Активный центр трипсина состоит из серина, гистидина и аспарагина [8]. При гидролизе белка Ser195 действует как нуклеофил и продуцирует промежуточный ацил-фермент с субстратом, His57 вступает в реакцию как основание, Asp102 стабилизирует таутомерное равновесие His57 и обеспечивает компенсацию возникновения положительного заряда [9].

Трипсин обнаружен у всех позвоночных животных и человека. Трипсин и трипсиноподобные ферменты – популярные объекты исследований из-за их центральной роли в гидролизе белка в желудочно-кишечном тракте, а также в таких

Сокращения: БСА – бычий сывороточный альбумин.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (473) 220-85-86; эл. почта: holyavka@rambler.ru).

важных физиологических процессах, как свертывание крови, фибринолиз, апоптоз и иммунный ответ [10].

Трипсин – широко используемый протеолитический фермент, применяемый в медицине для ускоренного восстановления после хирургических и ортопедических травм в качестве противовоспалительного, противоотечного, фибринолитического, антиоксидантного и противоинфекционного средства. Трипсин способствует снятию признаков и симптомов воспаления, возникающих вследствие повреждения тканей, и облегчает процесс их восстановления [11].

В качестве альтернативы трипсину быка был предложен трипсин тихоокеанской трески (Pacific cod). Фермент рыб выступает антипатогенным агентом. В исследованиях *in vitro* трипсин атлантической трески (*Gadus morhua*) показал высокую эффективность против вируса простого герпеса 1-го типа (HSV-1) и респираторно-синцитиального вируса (RSV) – двух наиболее распространенных патогенных вирусов в инфекциях верхних дыхательных путей. Синергический эффект трипсина атлантической трески и антибиотиков используют для профилактики, ингибирования и удаления бактериальных биопленок у пациентов с рецидивирующими и нозокомиальными (внутрибольничными) инфекциями [12].

Несмотря на значительное число работ, посвященных получению биопрепаратов с протеолитической активностью, в клиническую практику из них введены единицы, т.к. использование свободных (водорастворимых) форм ферментов накладывает ряд ограничений: невозможность их повторного использования и быстрого выведения из области реакции, низкая резистентность к инактивирующим факторам [13]. Известен целый ряд заболеваний, связанных с отсутствием или изменением активности того или иного фермента из-за каких-либо генетических эффектов или тканевых нарушений [14, 15]. На протекание подобных расстройств организма можно влиять путем введения больному растворимого фермента, но при этом, с высокой долей вероятности, возникает аллергическая реакция, которая сама по себе может привести к летальному исходу. Кроме того, растворимый фермент зачастую неустойчив и быстро выводится из организма с помощью иммунной системы. Эти недостатки удается преодолевать путем иммобилизации фермента, препятствующей его взаимодействию с иммунной системой, а также стабилизирующей его пространственную структуру. Протеазы, иммобилизованные на волокнистых материалах, применяют для эффективного лечения ран, язв, ожогов, а их белковые ингибиторы – в заместительной терапии для лечения панкреатитов. Достаточно перспективными в области клинического применения считаются препараты иммобилизованных протеаз [16, 17].

Использование иммобилизованного трипсина позволяет в 2–3 раза сократить сроки дооперативного лечения, иммобилизованные формы трипсина входят в состав мазей для очищения раневых поверхностей. Препараты иммобилизованного трипсина применяют в виде аппликаций и дренажей в хирургии, в основном при гнойных раневых и ожоговых поражениях, сопровождающихся некрозом тканей. Их готовят в форме мазей на основе кремнегеля, в виде пленок на основе гидратцеллюлозной или нейлоновой мембран и в форме композиционных препаратов “пленка с носителем” [18–21].

Использование метода адсорбционной иммобилизации в наибольшей степени (по сравнению с другими методами иммобилизации) способствует сохранению нативной структуры молекул и высокого уровня их каталитической активности за счет отсутствия химической модификации фермента [22]. При этом обеспечивается большая конформационная подвижность по сравнению с ковалентной иммобилизацией за счет реализации слабых связей и взаимодействий. В ряде исследований показано увеличение (относительно нативного фермента) стабильности трипсина, иммобилизованного на гранулах цеолита [23], полиэтилентерефталатных волокнах [24], полиэтиленовых волокнах [25], полимерных мембранах [26], карбонатных микрочастицах [27], в геле арабиногалактана [28], на матрице пищевого кислоторастворимого среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозана [29, 30].

В настоящее время в исследовании механизмов адсорбции ферментов на твердых носителях путем моделирования используются методы молекулярного докинга и молекулярной динамики [31]. Эти модели могут быть экспериментально подтверждены методом ИК-спектроскопии [32, 33], который обладает высокой чувствительностью к химическому составу и пространственной ориентации молекул и выступает одним из классических методов определения их структуры. ИК-спектроскопия служит ценным инструментом для изучения структуры белка [34–37], молекулярных механизмов белковых реакций [38, 39], процессов сворачивания и разворачивания молекул белка [40, 41]. Анализ частот и интенсивностей полос поглощения и линий колебаний амидной группы, главным образом колебаний полос Амид I и Амид II, широко используется для установления конформационной структуры полипептидной цепи [42]. ИК-спектроскопия позволяет получать сведения о вторичной структуре белков (соотношении $\alpha$-спиралей, $\beta$-слоев и неупорядоченных структур) [43, 44].

**Таблица 1.** Абсолютное и относительное количество аминокислотных остатков на поверхности молекулы трипсина

| Характеристика остатков | Абсолютное количество | Относительное количество, % |
|---|---|---|
| Гидрофобные | 26 | 30.5 |
| Положительно заряженные (при pH 7.0) | 12 | 14.0 |
| Отрицательно заряженные (при pH 7.0) | 4 | 5.0 |
| Незаряженные (заряды скомпенсированы при pH 7.0) | 43 | 50.5 |

Целью настоящей работы стало изучение процессов взаимодействия трипсина с ионообменными волокнами и хитозаном с использованием методов компьютерного моделирования и ИК-спектроскопии.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На поверхности молекулы трипсина при проведении расчетов *in silico* с использованием программы Swiss-Pdb Viewer 4.1.0 нами обнаружено 85 а.о., доступных для растворителя не менее чем на 20%. Среди них преобладают полярные незаряженные (заряды скомпенсированы при pH 7.0) аминокислоты, такие как серин, треонин, цистеин, метионин, аспарагин, глутамин. Поскольку изоэлектрическая точка трипсина pI ~ 10, то при pH 7.0 суммарный заряд белковой молекулы положителен. Количество гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекулы превышает число заряженных (при pH 7.0) аминокислотных остатков. Сведения об абсолютном и относительном количестве аминокислотных остатков приведены в табл. 1. В табл. 2 представлен перечень заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекулы трипсина с доступностью для растворителя не менее 20%.

Анализ модели пространственной структуры трипсина показал, что аминокислотные остатки на поверхности молекулы распределены неравномерно. На поверхности глобулы обнаружено 12 положительно заряженных аминокислот, из которых часть распределена равномерно, а некоторые аминокислотные остатки сгруппированы в отдельные участки скопления положительного заряда. Первый участок образуют Lys87 и Lys109, второй – His57 и Lys60, третий – Lys222 и Lys224. Отрицательно заряженные аминокислотные остатки располагаются относительно равномерно по поверхности молекулы (рис. 1).

При адсорбционной иммобилизации белковые молекулы связываются с носителями, на поверхности которых имеются гидрофобные группы, за счет гидрофобных взаимодействий. Анализ модели пространственной структуры трипсина показал, что гидрофобные остатки аминокислот на поверхности молекулы распределены неравномерно и образуют скопления. На рис. 2 представлено расположение гидрофобных аминокислот на поверхности трипсина, где первое скопле-

**Таблица 2.** Перечень заряженных (при pH 7.0) и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекулы трипсина

| Положительно заряженные аминокислотные остатки | Отрицательно заряженные аминокислотные остатки | Гидрофобные аминокислотные остатки | |
|---|---|---|---|
| His57 | Glu77 | Gly18 | Ala111 |
| Lys60 | Asp153 | Gly19 | Leu114 |
| Lys87 | Asp165 | Ala24 | Ala132 |
| Lys109 | Glu186 | Gly38 | Gly133 |
| Arg177 | | Tyr39 | Gly148 |
| Lys145 | | Tyr59 | Tyr151 |
| Lys159 | | Gly62 | Pro173 |
| Lys169 | | Val75 | Gly174 |
| Lys188 | | Val76 | Leu185 |
| Lys222 | | Gly78 | Gly188 |
| Lys224 | | Phe82 | Gly203 |
| Lys239 | | Val90 | Gly219 |
| | | Pro92 | Ala243 |

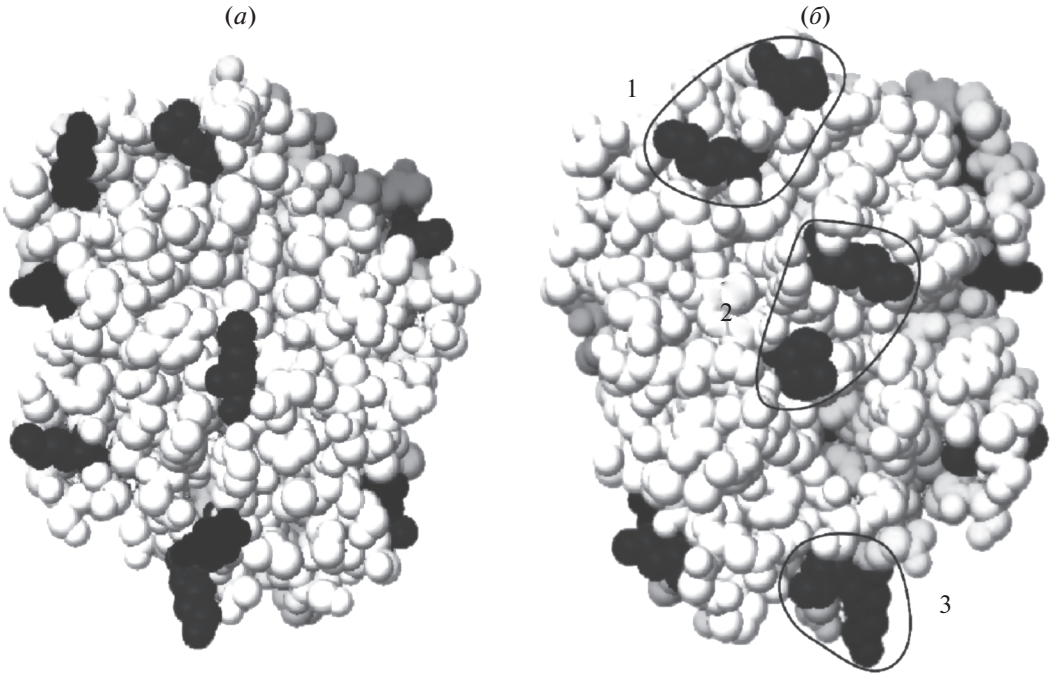


**Рис. 1.** Локальные скопления (1–3) заряженных (при pH 7.0) аминокислотных остатков на поверхности молекулы трипсина (черным цветом выделены остатки, заряженные отрицательно, серым – заряженные положительно): (*б*) – повернутая на 180° вокруг вертикальной оси форма (*а*).

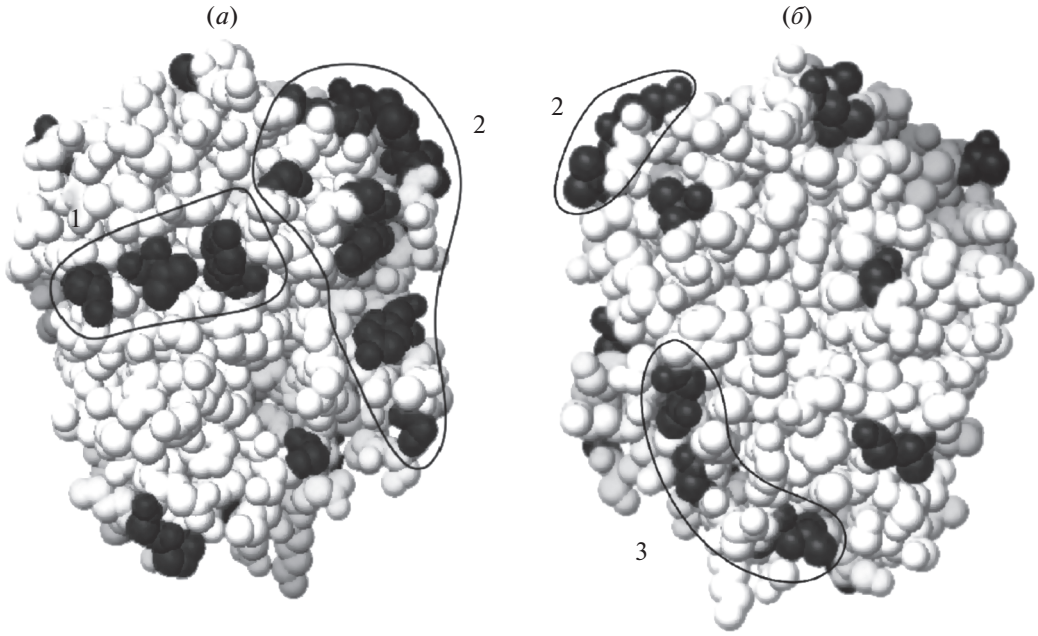


**Рис. 2.** Локальные скопления (1–3) гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекулы трипсина: (*б*) – повернутая на 180° вокруг вертикальной оси форма (*а*).

ние образовано Tyr59, Val90 и Pro92; второе – Gly62, Gly38, Tyr39, Val75, Val76, Phe82, Gly148 и Tyr151; третье – Gly19, Leu185 и Gly187.

Размеры молекулы трипсина составляют порядка 38 × 42 × 50 Å (рис. 3). Размеры были рассчитаны *in silico* на основе модели негидратированной молекулы трипсина, поскольку для расчета параметров гидратной оболочки необходимо ее отдельное моделирование с учетом определенных условий иммобилизации на конкретном носите-

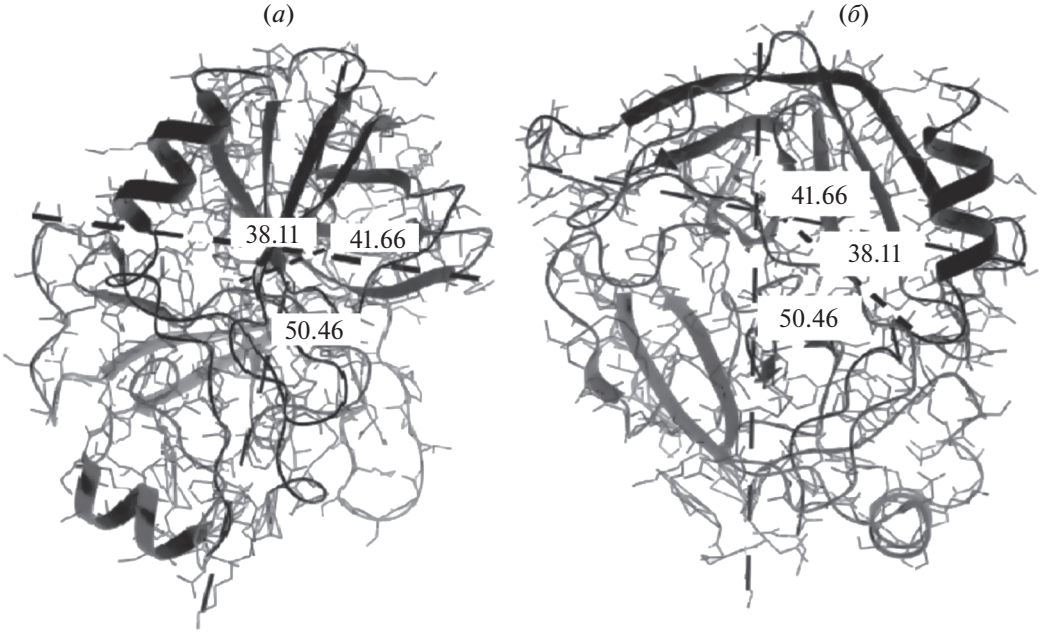


**Рис. 3.** Размер молекулы трипсина (Å), где (*б*) – повернутая на 180° вокруг вертикальной оси форма (*а*).

ле. Как правило, при гидратации размеры белковой молекулы увеличиваются вдвое [45], следовательно, минимальный размер пор носителя для адсорбционной иммобилизации фермента в его порах соответствует ~100 Å (10 нм).

В формировании S–S-мостиков трипсина с носителем может участвовать расположенный на поверхности молекулы Cys128, другие остатки цистеина находятся внутри глобулы.

В табл. 3 и 4 представлены рассчитанные *in silico* расстояния (Å) от активного центра фермента до потенциальных сайтов связывания трипсина с заряженными носителями. Аминокислота His57, входящая в активный центр фермента, гипотетически также может принимать участие в образовании связи с матрицей носителя при адсорбционной иммобилизации, т.к. находится на поверхности белковой молекулы. При этом комплекс трипсина с полимером – более устойчивый к воздействию физических или химических факторов по сравнению со свободной формой белка.

В табл. 5 представлены рассчитанные *in silico* значения расстояния (Å) от активного центра фермента до сайтов связывания трипсина с гидрофобными носителями. Следует отметить, что некоторые заряженные и гидрофобные аминокислоты, располагающиеся на поверхности и находящиеся в непосредственной близости от активного центра трипсина, взаимодействуют с носителем при иммобилизации фермента, препятствуя при этом доступу макромолекул гидролизуемого субстрата – бычьего сывороточного альбумина (БСА) – к активному центру адсорбированного на нерастворимом полимере (хитозане) трипсина.

Носители для иммобилизации должны обладать рядом свойств: нерастворимостью, высокой химической и биологической стойкостью, высокой механической прочностью, возможностью создания различных структур (мембран, пластин, гранул, трубочек). Ни один из используемых в настоящее время в качестве носителя материалов не отвечает полностью всем предъявляемым требо-

**Таблица 3.** Рассчитанные *in silico* расстояния (Å) от активного центра трипсина до сайтов связывания с отрицательно заряженными носителями

| Положительно заряженные аминокислоты | Активный центр | | |
|---|---|---|---|
| | His57 | Asp102 | Ser195 |
| His57 | 0 | 6.66 | 9.63 |
| Lys60 | 7.79 | 13.86 | 12.96 |
| Lys87 | 15.80 | 18.92 | 20.35 |
| Lys109 | 19.70 | 22.80 | 21.65 |
| Arg117 | 27.53 | 28.88 | 22.43 |
| Lys145 | 21.51 | 24.45 | 12.87 |
| Lys159 | 22.84 | 22.41 | 14.81 |
| Lys169 | 20.88 | 16.61 | 20.57 |
| Lys188 | 23.27 | 23.44 | 15.41 |
| Lys222 | 24.07 | 23.78 | 18.56 |
| Lys224 | 21.43 | 20.19 | 17.29 |
| Lys239 | 18.05 | 15.05 | 22.17 |

**Таблица 4.** Рассчитанные *in silico* расстояния (Å) от активного центра трипсина до сайтов связывания с положительно заряженными носителями

| Отрицательно заряженные аминокислоты | Активный центр | | |
|---|---|---|---|
| | His57 | Asp102 | Ser195 |
| Glu77 | 28.49 | 32.59 | 22.35 |
| Asp153 | 22.95 | 27.12 | 14.35 |
| Asp165 | 22.87 | 17.88 | 21.88 |
| Glu186 | 26.42 | 24.97 | 20.57 |

**Таблица 5.** Рассчитанные *in silico* расстояния (Å) от активного центра трипсина до сайтов связывания с гидрофобными носителями

| Гидрофобные аминокислоты | Активный центр | | |
|---|---|---|---|
| | His57 | Asp102 | Ser195 |
| Gly18 | 23.18 | 24.62 | 14.08 |
| Gly19 | 23.58 | 24.81 | 14.30 |
| Ala24 | 27.45 | 29.69 | 19.35 |
| Gly38 | 17.17 | 23.36 | 15.81 |
| Tyr39 | 17.30 | 23.44 | 14.55 |
| Tyr59 | 4.31 | 10.57 | 10.52 |
| Gly62 | 14.11 | 19.77 | 17.67 |
| Val75 | 25.88 | 30.65 | 19.35 |
| Val76 | 27.74 | 32.38 | 21.78 |
| Gly78 | 29.39 | 33.14 | 23.58 |
| Phe82 | 22.56 | 26.55 | 19.98 |
| Val90 | 8.60 | 10.07 | 16.60 |
| Pro92 | 11.05 | 8.74 | 19.59 |
| Ala111 | 23.85 | 26.05 | 24.49 |
| Leu114 | 26.64 | 28.03 | 24.33 |
| Ala132 | 24.47 | 19.80 | 22.01 |
| Gly133 | 25.28 | 21.28 | 21.56 |
| Gly148 | 23.45 | 26.77 | 16.64 |
| Tyr151 | 21.47 | 25.81 | 13.13 |
| Pro173 | 20.71 | 17.61 | 21.30 |
| Gly174 | 20.45 | 16.73 | 22.55 |
| Leu185 | 24.54 | 22.68 | 19.07 |
| Gly188 | 23.27 | 23.44 | 15.41 |
| Gly203 | 23.96 | 21.52 | 19.88 |
| Gly219 | 16.53 | 17.79 | 12.59 |
| Ala243 | 20.88 | 19.33 | 25.45 |

ваниям. Тем не менее существует широкий набор носителей, используемых для иммобилизации определенных ферментов в конкретных условиях [46, 47]. Для трипсина перспективными носителями для иммобилизации стали ионообменные волокна ВИОН КН-1, ВИОН АН-1 и хитозан. Каталитическая активность иммобилизованного трипсина в реакции гидролиза БСА составляет, соответственно, 3.4 ± 0.3, 3.7 ± 0.3 и 4.2 ± 0.4 ед./мг иммобилизованного белка, количество белка в образцах равно 7.4 ± 0.4, 8.4 ± 0.8 и 12.4 ± 1.2 мг/г носителя. На рис. 4 показаны процент адсорбированного белка и процент сохранения каталитической активности трипсина после иммобилизации на данных полимерах. При сравнительном анализе каталитической активности иммобилизованного фермента нами установлено, что наиболее эффективной становится иммобилизация трипсина на матрице хитозана, позволяющая сохранить (65 ± 6)% активности (скорости гидролиза БСА) нативного фермента в растворе. Количество адсорбированного трипсина при этом составило 12.4 ± 1.2 мг/г носителя, т.е. адсорбировалось (62 ± 6)% от общего количества белка (20 мг на 1 г носителя).

Выделяют две основные причины снижения активности при иммобилизации: уменьшение конформационной подвижности фермента и диффузионные ограничения для высокомолекулярного субстрата [48]. Диффузионные ограничения можно подразделить на два типа: внешний и внутренний диффузионный барьеры. Первый возникает вследствие существования тонкого неперемешиваемого слоя растворителя, окружающего полимерную частицу, так называемого слоя Нернста. Растворенные вещества диффундируют в этот слой благодаря сочетанию пассивной молекулярной диффузии и конвекции. Для снижения эффектов внешнего диффузионного барьера мы перемешивали суспензии образцов при проведении реакции гидролиза БСА. Внутренние диффузионные барьеры – это ограничения свободной диффузии внутри полимерной матрицы, налагаемые самой матрицей. Внутренний диффузионный барьер более выражен, если фермент иммобилизован путем включения его в полимерную матрицу, а не в результате его прикрепления к поверхности этой матрицы. При этом в большинстве случаев можно пренебречь либо внешним, либо внутренним барьером, т.к. обычно только один из них лимитирует общую скорость диффузии [49]. В наших экспериментах была осуществлена адсорбция трипсина на полимерных носителях, количество фермента (в данном случае равное 12 мг/г, или 1.2 мас. %) не создает ограничений массопереносу субстрата к иммобилизованному ферменту. Ранее нами было показано, что поведение адсорбированного на волокнах ВИОН трипсина подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен [50]. Если бы имели место значительные диффузионные ограничения, то построение графика в обратных координатах Лайнуивера–Бэрка привело бы к получению кривых

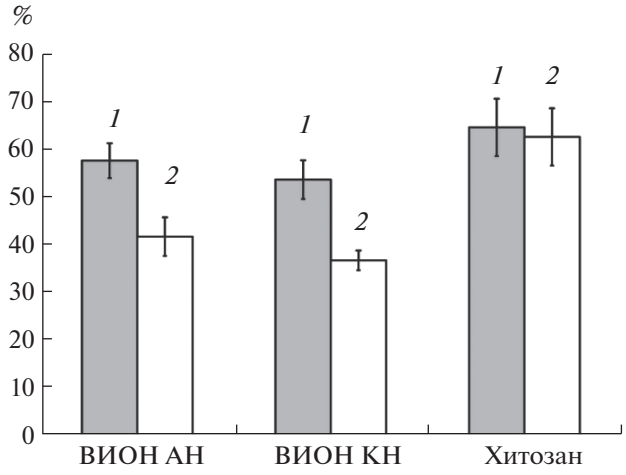


**Рис. 4.** Каталитическая активность (*1*) и содержание адсорбированного белка (*2*) в образцах трипсина, иммобилизованного на полимерных носителях. За 100% принимали скорость гидролиза бычьего сывороточного альбумина свободным трипсином (*1*) и максимально возможное количество адсорбированного трипсина – 20 мг на 1 г носителя (*2*).

сигмоидной формы [49], чего в наших экспериментах не наблюдалось. Таким образом, потерю ~40% активности трипсина после его иммобилизации на волокнах ВИОН и хитозане мы объясняем следующим образом: водородные связи, электростатические и гидрофобные взаимодействия фермента с носителем изменили структуру белковой глобулы, но при этом не блокировали активный центр фермента полностью.

Для исследования структурных изменений в молекуле трипсина и изучения механизма адсорбции фермента на матрицах хитозана и ионообменных волокон ВИОН КН-1, ВИОН АН-1 мы использовали метод ИК-спектроскопии. Элементарные звенья ионообменных волокон ВИОН АН-1, ВИОН КН-1 и хитозана представлены на рис. 5.

Колебательные полосы поглощения в белках обычно вызваны переходами, которые относятся к определенным химическим связям. Наиболее информативными выступают колебательные переходы в пептидном скелете молекулы. В первую очередь это полосы, связанные с растяжением NH-связи ≈3300 см$^{-1}$, растяжением связи C=O – 1660–1632 см$^{-1}$ (полоса Амид I), деформацией NH-связи – 1550–1520 см$^{-1}$ (полоса Амид II).

При анализе ИК-спектра молекулы свободного трипсина (рис. 6–8) выявлено следующее: 1) полоса поглощения в области 3272–3078 см$^{-1}$ – результат валентных колебаний OH- и NH-групп; 2) область поглощения 3078–2875 см$^{-1}$ отвечает за валентные колебания связи C–H и характеризуется наличием пиков 2964, 2934 и 2875 см$^{-1}$, относящихся к асимметричным и симметричным колебаниям метильной группы; 3) пик 1632 см$^{-1}$ – результат асимметричных деформационных колебаний $NH_3^+$; 4) пик 1533 см$^{-1}$ связан с симметричными де-

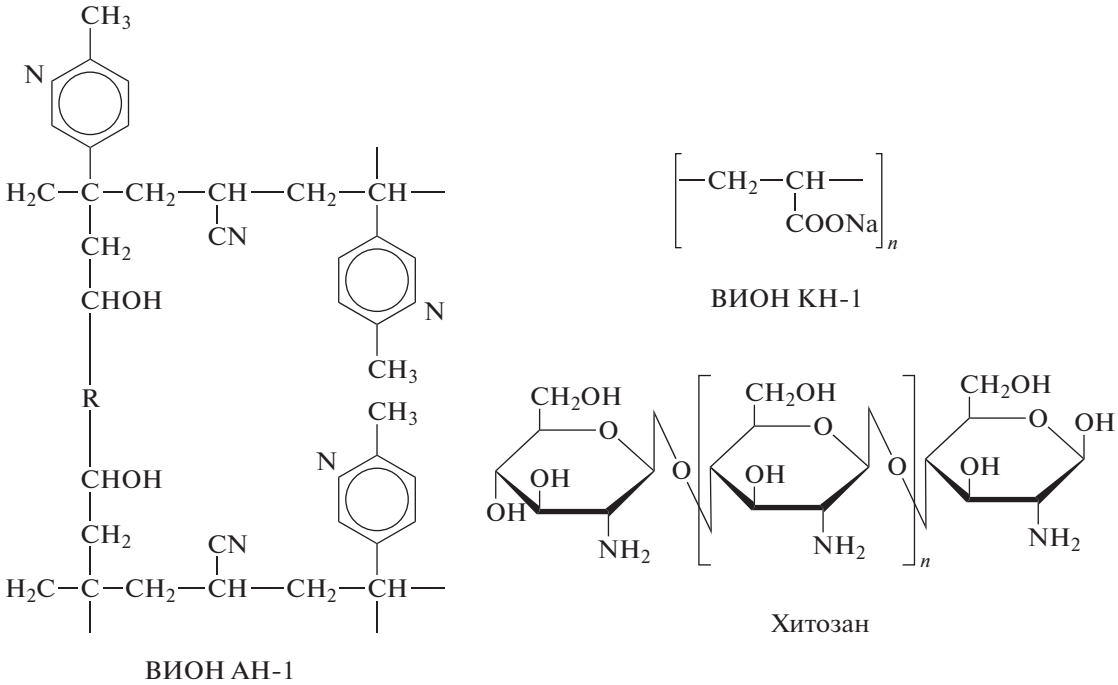


**Рис. 5.** Элементарные звенья ионообменных волокон ВИОН АН-1, ВИОН КН-1 и хитозана.

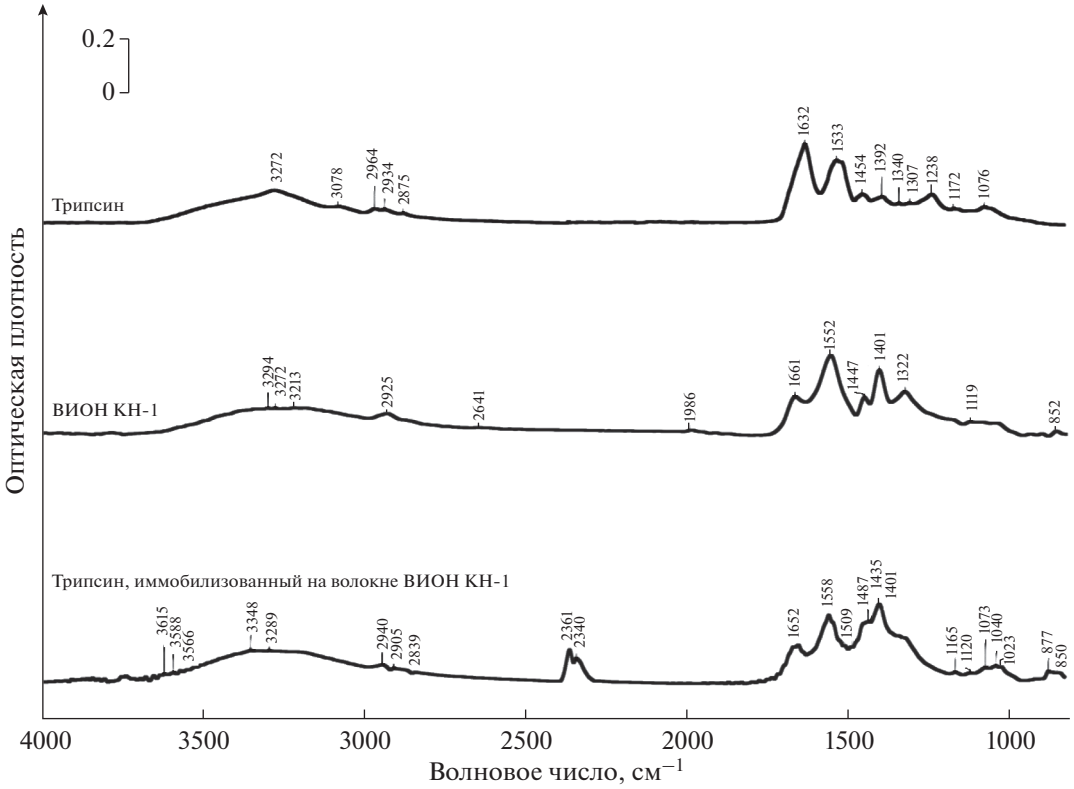


**Рис. 6.** ИК-спектры трипсина, ВИОН КН-1 и иммобилизованного на матрице ионообменного волокна фермента.

формационными колебаниями $NH_3^+$; 5) пик 1454 см$^{-1}$ обусловлен деформационными колебаниями связей C–H; 6) полоса поглощения в области 1238–1076 см$^{-1}$ низкой интенсивности и соответствует валентным колебаниям связи C–C (рис. 6–8) [51, 52].

Ионообменные волокна ВИОН КН-1 и ВИОН АН-1 представляют собой нерастворимые высокомолекулярные соединения с жестко фиксированными функциональными группами и подвижными противоионами, способными к реакциям ионного обмена.

В качестве функциональных групп волокна ВИОН КН-1 выступают карбоксильные группировки. В ИК-спектре катионита зарегистрированы пики 2925, 1447, 1401 см$^{-1}$, отвечающие за колебания метильно-метиленовых групп; пик 1119 см$^{-1}$, соответствующий деформационным колебаниям OH-группы; полоса поглощения в области 1661 см$^{-1}$, обусловленная валентными колебаниями связи C=O. После иммобилизации трипсина на волокне ВИОН КН-1 в ИК-спектре появляются новые полосы поглощения в области 1165–1023 см$^{-1}$, связанные с колебаниями C–O–H и –COOH, возникает пик 1509 см$^{-1}$ и установлено смещение пика 1447 см$^{-1}$, ответственного за деформационные колебания групп >CH– и –$CH_2$–, в сторону более высоких значений волновых чисел (1487 см$^{-1}$). Зарегистрировано смещение пика, соответствующего поглощению ионизированных асимметричных колебаний COO-группы, от 1552 к 1558 см$^{-1}$. Появляются пики CH-групп ненасыщенных и ароматических соединений (2839–2340 см$^{-1}$) и полоса поглощения в области 3615–3348 см$^{-1}$, соответствующая свободной OH-группе в парах вещества и указывающая на взаимодействие OH-группы по типу водородной связи OH···O. Таким образом, можно предположить что, водородные связи принимают участие в связывании молекулы фермента с матрицей носителя (рис. 6).

В ИК-спектре волокна ВИОН АН-1 (рис. 7) присутствуют максимумы поглощения, обусловленные валентными и деформационными колебаниями групп, входящих в состав элементарного звена. Пиримидиновые кольца имеют поглощение при 1569 и 1032 см$^{-1}$, метильно-метиленовые группы – при 2924 и 1370 см$^{-1}$, группа C–N имеет абсорбционную полосу при 2242 см$^{-1}$ [51]. После адсорбционной иммобилизации трипсина на ионообменном волокне ВИОН АН-1 в ИК-спектре образца зарегистрировано появление пиков 1650 и 1604 см$^{-1}$, отвечающих за наличие β-структур и за β-повороты в молекуле фермента; таким образом, происходят изменения в полосе Амид I,

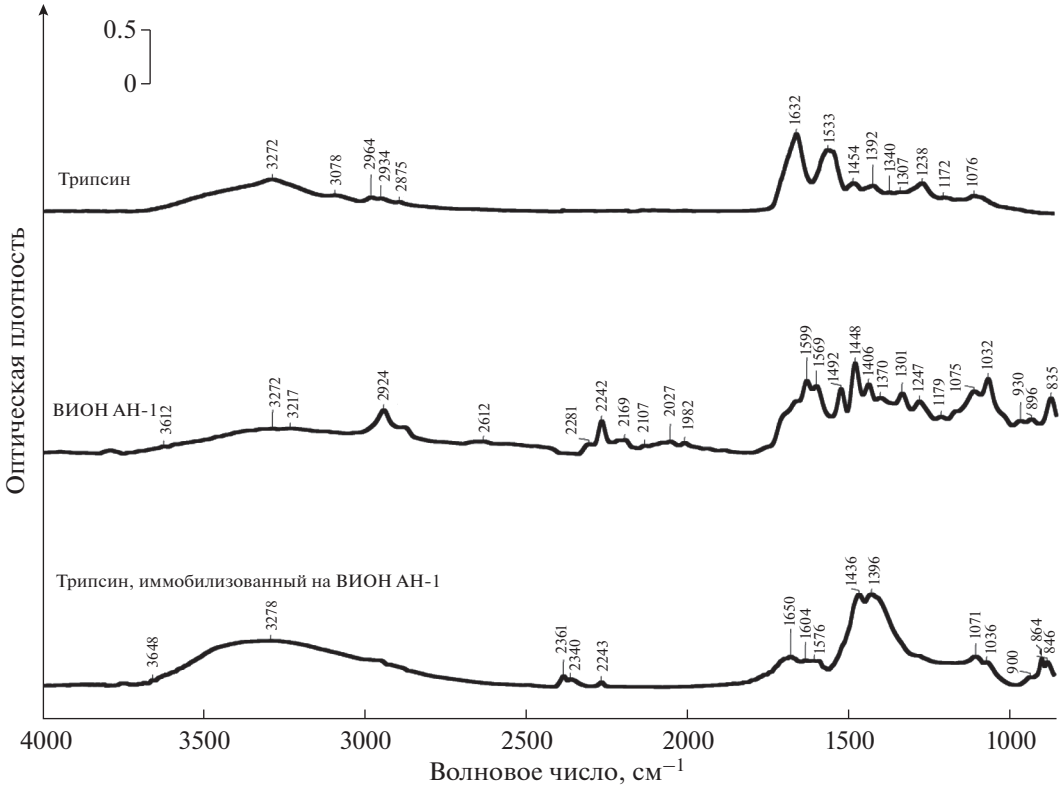


**Рис. 7.** ИК-спектры трипсина, ВИОН АН-1 и иммобилизованного на матрице ионообменного волокна фермента.

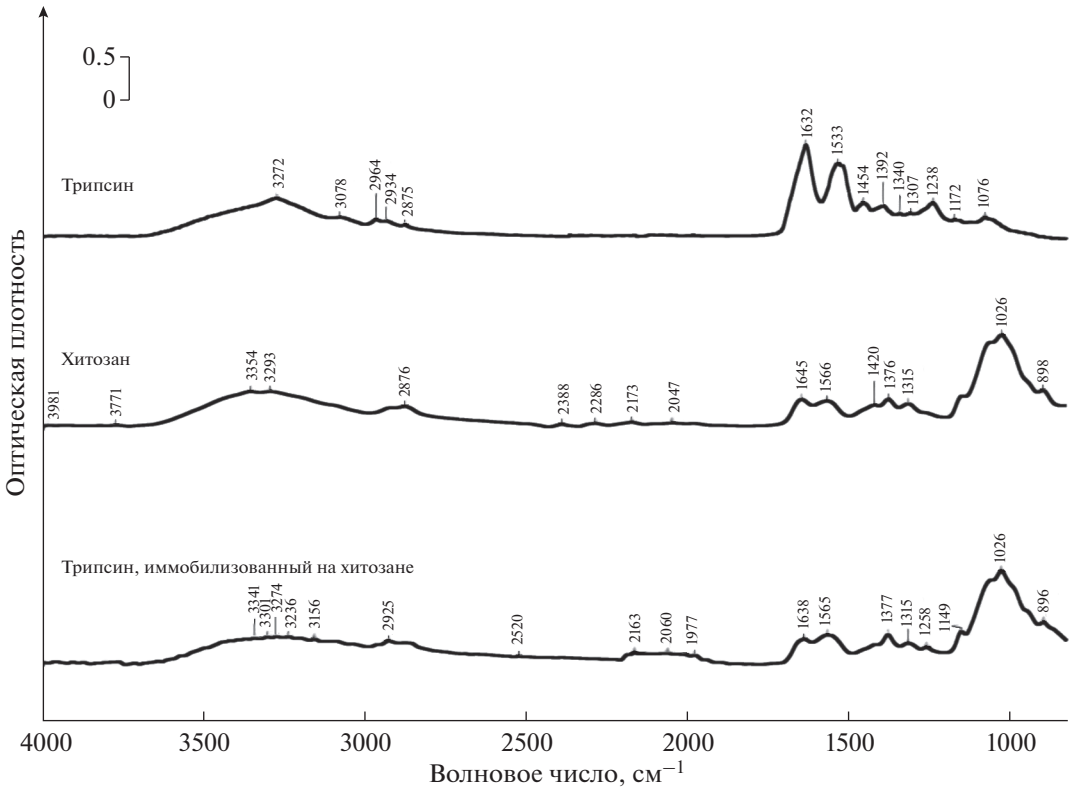


**Рис. 8.** ИК-спектры трипсина, хитозана и иммобилизованного на матрице полимера фермента.

что говорит о появлении связей и взаимодействий между волокном ВИОН АН-1 и молекулой трипсина. Установлено возникновение пиков в области колебаний СН-групп ненасыщенных и ароматических соединений (2361–2340 см$^{-1}$); исчезновение полосы поглощения 2169–1982 см$^{-1}$, связанной с колебаниями группы –СОО$^-$; смещение пиков 1576–1569 см$^{-1}$ (колебания пиримидиновых колец) в сторону более высоких энергий; смещение пиков 1406–1396 см$^{-1}$ (колебания метильно-метиленовых групп) в сторону более низких значений волновых чисел, что обусловлено перестройками в глобуле белка, а также изменением структуры ионообменного волокна (рис. 7) [51, 52].

В ИК-спектре хитозана (рис. 8) присутствуют пики поглощения 1566 см$^{-1}$ (отвечает за вибрацию $NH_2$-группы) и 1645 см$^{-1}$ (обусловлен поглощением карбонила). Спектр хитозана характеризуется типичными полосами поглощения 3354 и 2876 см$^{-1}$, которые отвечают за колебания групп –ОН и –$CH_3$. После иммобилизации трипсина на матрице хитозана увеличивается интенсивность полосы 3341–3156 см$^{-1}$, ответственной за растяжение связи N–H и вибрацию $NH_2$-групп, исчезает полоса поглощения 2388–2286 см$^{-1}$, обусловленная колебаниями ионизированных аминогрупп. В ИК-спектрах иммобилизованного трипсина зарегистрированы полосы поглощения в области 1977 и 1638 см$^{-1}$, указывающие на наличие карбоксильной и альдегидной групп. Это свидетельствует о том, что функциональные группы хитозана –ОН и –$NH_2$ приняли участие в образовании водородных связей и электростатических взаимодействий между молекулой трипсина и матрицей носителя. Кроме того, было образовано большое количество гидрофобных взаимодействий между молекулами трипсина и хитозана, что подтверждается следующим: максимум пика на ИК-спектре хитозана 2876 см$^{-1}$, обусловленного асимметричными и симметричными колебаниями –СН- и –$CH_2$-групп, после иммобилизации трипсина сдвигается до значения 2925 см$^{-1}$; происходит смещение максимума, обусловленного пульсационными колебаниями пиранозного цикла хитозана, от 898 до 896 см$^{-1}$ (рис. 8) [52].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Объект исследования и носители для его иммобилизации.** В качестве объекта исследования был выбран трипсин быка (MP Biomedicals, США), субстратом для гидролиза служил бычий сывороточный альбумин (БСА, 66.4 кДа; Sigma-Aldrich, США), носителями для иммобилизации – хитозан высокомолекулярный (350 кДа; ЗАО “Биопрогресс”, Россия), ионообменные волокна ВИОН КН-1 (катионит) и ВИОН АН-1 (анионит) (ООО “ЛИРСОТ”, Россия).

**Подготовка ионообменных волокон к иммобилизации.** Подготовку осуществляли следующим методом. При кондиционировании их помещали в дистиллированную воду, после набухания обрабатывали растворами HCl переменной концентрации (0.5, 1.0, 1.5, 1.0, 0.5 М) для удаления ионов железа. Обработку образцов проводили в статических условиях. После отмывки дистиллированной водой осуществляли попеременную 4-кратную обработку 1 М растворами NaOH и HCl с промежуточной промывкой дистиллированной водой [52].

**Иммобилизация трипсина.** Иммобилизацию трипсина проводили путем адсорбции при комнатной температуре: 1 г носителя заливали 10 мл 0.1 М боратного буфера (pH 9.0) в случае ВИОН КН-1, 0.1 М карбонатного буфера (pH 10.0) в случае ВИОН АН-1 и 0.1 М фосфатного буфера (pH 6.5) в случае хитозана (эти буферы оптимальны для иммобилизации трипсина на данных носителях согласно работам [29, 50]) и выдерживали в течение 1 ч. К суспензии носителя добавляли 5 мл раствора трипсина (в концентрации 4 мг/мл) и перемешивали в колбе с помощью электрической мешалки в течение 2 ч при температуре 25°C. Полученную смесь центрифугировали в течение 5 мин при 1500 *g*, осадок промывали буфером, используемым для иммобилизации трипсина, до отсутствия белка в промывочных водах, контроль за содержанием белка осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия) при 280 нм [53, 54]. Таким образом, максимально возможное количество адсорбированного трипсина составляло 20 мг на 1 г носителя, это значение принимали за 100% на рис. 4.

**Определение количества белка.** Определение количества белка в образцах осуществляли модифицированным методом Лоури. Сущность модификации заключалась в том, что на первом этапе анализа осуществляли разрушение связей между матрицей носителя и молекулой фермента. Для этого иммобилизованный трипсин обрабатывали раствором K,Na-тартрата (в концентрации 20 мг/мл или 0.7 М), приготовленном на 1 М NaOH, при 50°C в течение 10 мин [55]. Ранее было показано, что трипсин в данных условиях десорбируется полностью. Отсутствие процессов разрушения трипсина контролировали путем регистрации и анализа его спектра поглощения на спектрофотометре UV-2550PC (Shimadzu, Япония).

**Определение протеолитической активности трипсина.** Для определения протеолитической активности трипсина в качестве субстрата использовали БСА (66.4 кДа) в концентрации 100 мкМ, растворенный в 0.1 М фосфатном буфере (pH 6.5), гидролиз субстрата осуществляли в течение 30 мин при 37°C. Далее пробирки центрифуги-

ровали в течение 10 мин при 11700 *g* для удаления иммобилизованного трипсина. О протеолитической активности образцов судили по разности концентрации альбумина в растворе до начала реакции гидролиза и в надосадочной жидкости после протекания реакции. За единицу активности свободного и иммобилизованного трипсина принимали количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкМ БСА за 1 мин. Для определения каталитической активности образцов мы также применяли метод Лоури, но с другой модификацией – без добавления в реакционную среду сульфата меди [56]. Ранее в процессе сравнения ряда методик определения количества белка в растворе мы установили, что наименьший вклад в окрашивание реакционной среды матрица хитозана вносит при использовании модифицированного метода Лоури (без добавления сульфата меди). Кроме того, данный метод незначительно "реагирует" на отдельные аминокислоты, в частности изолейцин, а его применение позволяет минимизировать вклад в ход реакции молекул самого хитозана, а также процессов связывания БСА с матрицей хитозана и реакции автолиза трипсина [57].

**ИК-спектроскопия.** Регистрацию ИК-спектров анализируемых образцов выполняли в Центре коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета с помощью ИК-Фурье-спектрометра Vertex-70 (Bruker, Германия). Спектры регистрировали с неориентированных порошковых образцов.

**Выявление аминокислотных остатков на поверхности трипсина.** Выявление аминокислотных остатков на поверхности трипсина (PDB ID: 5T3H) с доступностью для растворителя не менее 20% проводили с использованием программы Swiss-Pdb Viewer 4.1.0. Программа рассчитывает доступную для растворителя площадь поверхности следующим образом: вода выступает как сфера с радиусом 1.4 Å, программа симулирует перемещение этой сферы по поверхности молекулы, записывая значение проконтактировавшей площади конкретной аминокислоты. Данная площадь считается доступной для растворителя. В нашем случае осуществлялся отбор аминокислот, для которых такая площадь составляет не менее 20% от площади поверхности аминокислоты [58–60].

Локализацию гидрофобных и заряженных аминокислотных остатков визуализировали с помощью программы Maestro 10.3.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При иммобилизации трипсина согласно результатам, полученным *in silico*, отрицательно заряженные носители, в том числе ВИОН КН-1, взаимодействуют с остатками His, Arg и Lys, образующими участки локального скопления на поверхности молекулы фермента. Содержание адсорбированного белка в иммобилизованных на ВИОН КН-1 образцах составляет (37 ± 2)%, а их каталитическая активность сохраняется на (54 ± 4)% по отношению к активности свободного трипсина.

В качестве положительно заряженных носителей трипсина выступают волокна ВИОН АН-1 и хитозан. В ходе абсорбции фермента происходит их взаимодействие с остатками Glu и Asp. Содержание адсорбированного белка в иммобилизованном на ВИОН АН-1 трипсине составляет (42 ± 4)%, а его каталитическая активность – (58 ± 4)%.

Согласно нашим расчетным данным, в процессе гидрофобного взаимодействия с матрицей хитозана принимают участие скопления Gly, Ala, Tyr, Val, Phe, Pro и Leu на поверхности молекулы трипсина. Содержание адсорбированного белка в образцах иммобилизованного на матрице хитозана трипсина составляет (62 ± 6)%, а их каталитическая активность – (65 ± 6)%, что выше, чем эти же характеристики у волокон ВИОН.

В совокупности расчетные данные *in silico* и результаты ИК-спектроскопии свидетельствуют о том, что при адсорбции трипсина на волокнах ВИОН преобладают электростатические взаимодействия и водородные связи. При адсорбции трипсина на хитозане активно образуются гидрофобные взаимодействия, а функциональные группы хитозана –OH и $-NH_2$ принимают участие в образовании водородных связей и электростатических взаимодействий между молекулой фермента и носителем.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке промышленных катализаторов и медицинских препаратов на основе иммобилизованного трипсина.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Экспериментальные исследования были проведены с использованием научно-технической базы Центра коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

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

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания проведенных кем-либо из авторов данной статьи экспериментов с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. *Мосолов В.В.* // Протеолитические ферменты. Наука, Москва, 1971. 404 с.
2. *Ladisch M.R., Kohlmann K.L.J.* // Biotechnol. Prog. 1992. V. 8. P. 469–478. https://doi.org/10.1021/bp00018a001
3. *Pereira H.J., Salgado M.C., Oliveira E.B.* // J. Chromotogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2009. V. 22. P. 2039–2044. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.05.036
4. *Wu P.* // J. Biol. Chem. 2010. V. 391. P. 283–293. https://doi.org/10.1515/bc.2010.030
5. *Torbica A.M.* // J. Agric. Food Chem. 2010. V. 58. P. 7980–7985. https://doi.org/10.1021/jf100830m
6. *Noguchi H.* // J. Cell Transplant. 2009. V. 18. P. 541–547. https://doi.org/10.1177/096368970901805-609
7. *Walsh K.A.* // Meth. Enzymol. 1970. V. 19. P. 41–63. https://doi.org/10.1016/0076-6879(70)19006-9
8. *Perera E., Rodríguez-Viera L., Perdomo-Morales R., Montero-Alejo V., Moyano F.J., Martínez-Rodríguez G., Mancera J.M.* // J. Comp. Physiol. B. 2015. V. 185. P. 17–35. https://doi.org/10.1007/s00360-014-0851-y
9. *Muhlia-Almazan A., Sanchez-Paz A., García-Carreno F.L.* // J. Comp. Physiol. B. 2008. V. 178. P. 655–672. https://doi.org/10.1007/s00360-008-0263-y
10. *Суханова С.М., Петручук Е.М., Генералов А.А.* // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2018. Т. 18. С. 106–113.
11. *Jesus-de la Cruz K., Alvarez-Gonzalez C.A., Pena E., Morales-Contreras J.A., Avila-Fernandez A.* // J. Biotech. 2018. V. 8. P. 186. https://doi.org/10.1007/s13205-018-1208-0
12. *Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А.* // Основы биотехнологии. Академия, Москва, 2003. 208 с.
13. *Попов С.С., Пашков А.Н., Попова Т.Н., Золоедов В.И., Семенихина А.В., Рахманова Т.И.* // Биомед. химия. 2008. Т. 54. С. 114–121.
14. *Lysogorskaya E.N., Roslyakova T.V., Belyaeva A.V., Bacheva A.V., Lozinskij V.I., Filippova I.Yu.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2008. Т. 44. P. 241–246. https://doi.org/10.1134/S0003683808030022
15. *Iskusnykh I.Y., Popova T.N., Agarkov A.A., Rjevskiy S.G., Pinheiro De Carvalho M.A.A.* // J. Toxicol. 2013. Article ID 870628. https://doi.org/10.1155/2013/870628
16. *Mateo C., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M.* // J. Enzyme Microb. Technol. 2007. V. 40. P. 1451–1463. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018
17. *Valuev I.L., Vanchugova L.V., Valuev L.I.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. P. 35–38. https://doi.org/10.31857/S0555109920010158
18. *Макарьин В.Е., Турсунов Б.С.* // Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств и полимерных имплантатов. Москва, 1992. С. 115–116.
19. *Бледнов А.В.* // Новости хирургии. 2006. Т. 14. № 1. P. 9–19.
20. *Верниковский В.В., Степанова Э.Ф.* // Вестник новых медицинских технологий. 2006. Т. XIII. № 4. С. 130–131.
21. *Kovalenko G.A.* // Pharmaceutical Chemistry Journal. 1998. V. 32. No 4. P. 213–216. https://doi.org/10.1007/BF02465836
22. *Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Сазыкина С.М.* // Радиац. биол. радиоэкол. 2017. Т. 57. С. 66–70. https://doi.org/10.7868/S0869803117010064
23. *Goradia D.* // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2005. V. 32. P. 231–239. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.12.007
24. *Díaz J.F., Balkus K.J.* // J. Mol. Catal. B: Enzym. 1996. V. 2. No 2–3. P. 115–126. https://doi.org/10.1016/S1381-1177(96)00017-3
25. *Kulik E.A., Kato K., Ivanchenko M.I., Ikada Y.* // Biomaterials. 1993. V. 14. P. 76–769. https://doi.org/10.1016/0142-9612(93)90041-Y
26. *Xu F., Wang W.H., Tan Y.J., Bruening M.L.* // Anal. Chem. 2010. V. 82. P. 10045–10051. https://doi.org/10.1021/ac101857j
27. *Бородина Т.Н., Румш Л.Д., Кунижев С.М., Сухоруков Г.Б., Ворожцов Г.Н., Фельдман Б.М., Марквичева Е.А.* // Биомед. химия. 2007. Т. 53. С. 557–565.
28. *Тандыгов Ш.З.* // В книге: Инновационные химические технологии и биотехнологии материалов и продуктов. II Международная конференция Российского химического общества им. Д.И. Менделеева: тезисы докладов. 2010. С. 348–349.
29. *Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г.* // Биофарм. журн. 2015. № 2. С. 13–16.
30. *Сливкин А.И., Беленова А.С., Холявка М.Г., Богачев М.И., Логвинова Е.Е.* // Сорбционные и хроматографические процессы. 2013. Т. 13. Вып. 1. С. 53–59.
31. *Хельтье Х.-Д., Зиппль В., Роньян Д., Фолькерс Г.* // Молекулярное моделирование: теория и практика / Пер. с англ. 2-е изд. М.: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2013. 319 с.
32. *Holyavka M.G., Koroleva V.A., Makin S.M., Olshannikova S.S., Kondratyev M.S., Samchenko A.A., Artyukhov V.G.* // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2017. Т. 3. С. 86–90.
33. *Holyavka M.G., Kondratyev M.S., Terentyev V.V., Samchenko A.A., Kabanov A.V., Komarov V.M., Artyukhov V.G.* // Biophysics. 2017. V. 62. P. 5–11. https://doi.org/10.1134/S0006350917010109
34. *Arrondo J.L.R., Muga A., Castresana J., Goñi F.M.* // Prog. Biophys. Mol. Biol. 1993. V. 59. P. 23–56. https://doi.org/10.1016/0079-6107(93)90006-6
35. *Siebert F.* // Methods Enzymol. 1995. V. 246. P. 501–526.
36. *Jackson M., Mantsch H.H.* // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 1995. V. 30. P. 95–120. https://doi.org/10.3109/10409239509085140
37. *Goormaghtigh E., Cabiaux V., Ruysschaert J.-M.* // Subcell Biochemistry. 1994. V. 23. P. 329–362.
38. *Fabian H., Mäntele W.* Infrared spectroscopy of proteins // Handbook of Vibrational Spectroscopy / Eds. Chalmers J.M., Griffiths P.R. John Wiley & Sons, Chichester, 2002. P. 3399–3426.
39. *Barth A.* IR spectroscopy // Protein Structures: Methods in Protein Structure and Stability Analysis / Eds. Uversky V.N., Permyakov E.A., Nova Science Publishers, 2006. P. 69–152.

40. *Arrondo J.L.R., Goñi F.M.* // Prog. Biophys. Mol. Biol. 1999. V. 72. P. 367–405. https://doi.org/10.1016/s0079-6107(99)00007-3
41. *Kauffmann E., Darnton N.C., Austin R.H., Batt C., Gerwert K.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 6646–6649. https://doi.org/10.1073/pnas.101122898
42. *Тен Г.Н., Герасименко А.Ю., Щербакова Н.Е., Баранов В.И.* // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2019. Т. 19. № 1. С. 43–57.
43. *Файзуллин Д.А., Коннова Т.А., Эртле Т., Зуев Ю.Ф.* // Биоорг. химия. 2013. Т. 39. С. 411–417. [*Faizullin D.A., Konnova T.A., Zuev Y.F., Haertle T.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2013. V. 39. P. 366–372.] https://doi.org/10.7868/S0132342313040076
44. *Valiullina Y.A., Ermakova E.A., Faizullin D.A., Zuev Y.F., Mirgorodskaya A.B.* // J. Struct. Chem. 2014. V. 55. P. 1556–1564. https://doi.org/10.1134/S0022476614080253
45. *Сердюк И., Заккаи Н., Заккаи Дж.* // Методы в молекулярной биофизике: структура, функция, динамика: в 2 т. М.: КДУ, 2009. Т. 1. 568 с.
46. *Горбунов Н.В.* // Журн. физ. химии. 1978. Т. 52 С. 1259–1262.
47. *Полянский Н.Г.* // Методы исследования ионитов. Москва, Химия, 1976. С. 208.
48. *Холявка М.Г., Артюхов В.Г.* // Иммобилизованные биологические системы: биофизические аспекты и практическое применение (учебное пособие). Воронежский государственный университет. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2017. 261 с.
49. *Тривен М.Д.* // Иммобилизованные ферменты: Ввод. курс и применение в биотехнологии / Пер. с англ. Майзеля Е.Б. Москва, Мир, 1983. С. 213.
50. *Holyavka M.G., Artyuhov V.G., Sazykina S.M., Nakvasina M.A.* // Pharm. Chem. J. 2017. V. 51. P. 702–706. https://doi.org/10.1007/s11094-017-1678-0
51. *Углянская В.А.* // Инфракрасная спектроскопия ионообменных материалов. Воронеж, Воронежский государственный университет, 1989. С. 208.
52. *Смит А.* // Прикладная ИК-спектроскопия: основы, техника, аналитическое применение (пер. с англ.). Москва, Мир, 1982. С. 327.
53. *Холявка М.Г., Каюмов А.Р., Логинова О.О., Байдамшина Д.Р., Тризна Е.Ю., Сазыкина С.М., Беленова А.С., Артюхов В.Г., Сливкин А.И* // Биофарм. журнал. 2017. Т. 9 С. 31–37.
54. *Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Беленова А.С.* // Фундамент. исследования. 2013. № 11–3. С. 484–487.
55. *Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Bityutskaya L.A., Grechkina M.V.* // Appl. Biochem. Microbial. 2010. V. 46. P. 422–427.
56. *Folin O., Ciocalteau V.* // J. Biol. Chem. 1929. V. 73. P. 627–650.
57. *Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Беленова А.С.* // Вестник ВГУ. Сер. Химия. Биология. Фармация. 2013. № 2. С. 116–119.
58. *Can T., Chen C.I., Wang Y.F.* // J. Mol. Graphics Modell. 2006. V. 25. P. 442–454. https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2006.02.012
59. *Richards F.M.* // Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 1977. V. 6. P. 151–176. https://doi.org/10.1146/annurev.bb.06.060177.001055
60. *Guex N., Peitsch M.C.* // Electrophoresis. 1997. V. 18. P. 2714–2723.

# Study on the Processes of Interactions between Trypsin and Ion Exchange Fibers and Chitosan

**S. M. Pankova*, F. A. Sakibaev*, M. G. Holyavka*,#, Y. M. Vyshkvorkina**, A. N. Lukin*, and V. G. Artyukhov***

*#Phone: +7 (473) 220-85-86; e-mail: holyavka@rambler.ru*

**Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia*

***Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskij per. 9, Moscow region, Dolgoprudny, 141701 Russia*

The localization of charged and hydrophobic amino acid residues in the trypsin molecule was studied. The percentage ratio of different types of amino acids on the surface of the enzyme globule was determined. It was found that charged and hydrophobic amino acid residues were distributed non-uniformly on the surface of the protein, forming sections of a local cluster. It was revealed that ion-exchange fibers VION KN-1, VION AN-1 and chitosan were the promising carriers for immobilization of trypsin, since adsorption on them ensured the preservation 54, 58 and 65% of the catalytic activity (rate of bovine serum albumin hydrolysis) of the native enzyme (in solution), respectively. The IR spectra of the soluble and immobilized on polymeric supports enzymes were analyzed. It was established, that during trypsin adsorption on VION fibers, electrostatic interactions and hydrogen bonds predominated. The carboxyl groups of VION KN-1 interacted with positively charged sections of the molecule containing His, Lys and Arg. A large number of amino groups of VION AN-1 and chitosan created an excess positive charge, due to which, possibly, binding to negatively charged Asp and Glu. However, hydrophobic interactions were key in the adsorption of trypsin on chitosan; Gly, Ala, Tyr, Val, Phe, Pro, Leu participated in their formation.

*Keywords: trypsin, adsorption, anion-exchange fiber VION AN-1, cation-exchange fiber VION KN-1, chitosan*