

ПОИСКИ ПУТЕЙ ПОВЫШЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИНКАПСУЛИРОВАННОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА

© 2019 г. М.Г. Фомкина, Г.М. Минкабирова, А.М. Монтрель, С.Ж. Ибадуллаева*

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пуцино Московской области, Институтская ул., 3*

**Кызылординский государственный университет им. Коркыт Ата,
Кызылорда, ул. Айтеке Би, 29а, Республика Казахстан*

E-mail: mfomkina@mail.ru

Поступила в редакцию 09.08.18 г.

После доработки 03.10.18 г.

Принята к публикации 10.10.18 г.

Рассмотрен предложенный ранее способ инкапсулирования ферментов методом поочередной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов на составные сферолиты (CaCO_3 –белок) с последующим растворением кальций-карбонатной компоненты. Проведен подбор условий инкапсулирования фермента пероксидазы хрена данным методом с целью получения инкапсулированной пероксидазы, имеющей каталитическую активность, сравнимую с активностью свободного фермента. Исследованы этапы методики изготовления полиэлектролитных микрокапсул с исследуемым ферментом. Отработан метод получения составных сферолитов заданного размера в диапазоне 2–10 мкм. Показано, что каталитическая активность пероксидазы хрена, помещенной в микрокапсулы с положительно заряженной внутренней поверхностью оболочки (внутренний слой оболочки из поликатиона полиаллиламин гидрохлорида), достоверно выше, чем активность инкапсулированной пероксидазы хрена при отрицательно заряженной внутренней поверхности оболочки микрокапсул (полианион полистиролсульфонат натрия). Установлено, что использование этиленгликольтетрауксусной кислоты для удаления CaCO_3 в микрокапсулах с пероксидазой хрена гораздо меньше повреждает фермент, чем использование этилендиаминтетрауксусной кислоты. Показано, что каталитическая активность пероксидазы хрена, помещенной в микрокапсулы со структурой оболочки «полиаллиламин гидрохлорид/полистиролсульфонат натрия/полиаллиламин гидрохлорид» (с положительно заряженной внутренней поверхностью оболочки) составляет 60–70% от активности свободного фермента (при удалении кальций-карбонатной компоненты составных сферолитов с помощью этиленгликольтетрауксусной кислоты).

Ключевые слова: инкапсулирование, микрокапсулы, пероксидаза хрена, полиэлектролиты, каталитическая активность, биосенсоры.

DOI: 10.1134/S0006302919010058

Создание высокочувствительных сенсоров, способных быстро и надежно регистрировать присутствие биологически активных соединений в объектах аналитического контроля, является одним из приоритетных направлений развития современной аналитической химии. Использование ферментов в качестве биораспознающего компонента биосенсора позволяет достичь уникальной селективности и чувствительности определения биологически активных соединений. Низкая устойчивость ферментов

при хранении и их высокая стоимость, являющиеся недостатками ферментного анализа для широкого применения, могут быть компенсированы путем иммобилизации ферментов на нерастворимых носителях. При этом особое значение приобретает способ введения иммобилизованного фермента в состав биосенсора, поскольку активность ферментов, как правило, существенно снижается при иммобилизации.

В 2007–2008 гг. был разработан (на примере уреазы) метод иммобилизации ферментов в тонкопленочный микроячейный полимерный материал, состоящий из противоположно заряженных полиэлектролитов, физически адсорбированных на твердой подложке. Между слоями полиэлектролитов находятся микрокапсулы из

Сокращения: ПААГ – полиаллиламин гидрохлорид, ПСС – полистиролсульфонат натрия, ЭГТА – этиленгликольтетрауксусная кислота, ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота.

этих же полиэлектролитов, содержащие функционально-активные молекулы фермента [4,5]. Данное биосенсорное покрытие представляет интерес как материал для создания мультиферментных систем, поскольку технология изготовления микрокапсул не накладывает никакого ограничения на тип инкапсулированных соединений. Способ иммобилизации ферментов с применением полимерных технологий в качестве промежуточного этапа предполагает включение ферментов в полиэлектролитные микрокапсулы. Метод инкапсулирования ферментов путем поочередного наслаивания противоположно заряженных полиэлектролитов на составные сферолиты (layer-by-layer) с последующим растворением кальций-карбонатной компоненты солями этилендиаминтетрауксусной кислоты был предложен в работах [1–3]. Каталитическая активность ферментов, подвергшихся процедуре инкапсулирования, снижается довольно значительно по сравнению с активностью свежеприготовленного свободного фермента [3,5,6]. Поэтому в настоящей работе ставилась задача получения инкапсулированного фермента с каталитической активностью, сравнимой с активностью свободного фермента. Задача решалась путем последовательного рассмотрения этапов изучаемого метода с целью выявления ключевых моментов, влияющих на свойства инкапсулированных ферментов. Были поставлены эксперименты по подбору условий изготовления полиэлектролитных микрокапсул с ферментом пероксидазой хрена в зависимости от размеров микрокапсул (2–10 мкм), от способа растворения кальций-карбонатных сферолитов и от знака заряда внутренней поверхности полиэлектролитной оболочки, контактирующей с ферментом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и оборудование. В работе использовали лиофилизованную пероксидазу из корней хрена с молекулярной массой 40 кДа («Био-Фарм», Россия), 30%-й раствор пероксида водорода, бензидин (4,4'-диаминодифенил, $C_{12}H_{12}N_2$) (Sigma, США), MES, Tris (оба – Sigma-Aldrich, США), ацетат натрия (классификации ч.д.а.); $CaCl_2$, Na_2CO_3 и $NaCl$ классификации х.ч. или ч.д.а.; этиленгликольтетрауксусную (ЭГТА) и этилендиаминтетрауксусную (ЭДТА) кислоты (обе – Sigma-Aldrich, США). Также были использованы полиэлектролиты: полиаллиламин гидрохлорид (ПААГ) и полистиролсульфонат натрия (ПСС) (оба – Aldrich, США) с молекулярной массой 60–70 кДа. Все растворы готовили на деионизованной воде,

полученной с помощью установки Agium 611-UF (Sartorius, Германия).

В работе использовали следующее оборудование: анализатор частиц Submicron Particle Size Analyzer №5 (Beckman Coulter Inc., США), спектрофотометр DU 520 UV/Vis (Beckman, США), световой микроскоп Eclipse E200 (Nikon, Япония), четырехканальный потенциометроамперометрический аналого-цифровой усилитель «Рекорд-4USB» с подключением к компьютеру (разработка Института биофизики клетки РАН), pH-метр Ф 690, pH/Temp/mV/ISE Meter (Beckman, США), встряхиватель Sky Line (ELMI, Латвия), ультразвуковую ванну (Millipore, США).

Технология изготовления полиэлектролитных микрокапсул и методы исследования. *Получение составных микросферолитов $CaCO_3$ -белок.* В качестве коровых микрочастиц использовали составные микросферолиты $CaCO_3$ -белок. Составные микросферолиты получали реакцией ионного обмена при смешивании растворов хлористого кальция и карбоната натрия в присутствии белка (фермента) методом биоминерализации [2,3]. Условия проведения процесса изготовления микрочастиц (концентрация реагентов, температура, гидродинамические характеристики) в существенной степени определяли размер и морфологию образующихся сферолитов.

Основная методика получения составных сферолитов сводилась к следующему: к 0,33 М раствору $CaCl_2$, содержащему до 1 мг/мл белка и интенсивно перемешиваемому на магнитной мешалке с образованием небольшой воронки, быстро добавляли равный объем 0,33 М раствора Na_2CO_3 . Перемешивание продолжалось в течение 30 с, после чего образовавшуюся суспензию выдерживали 15 мин при комнатной температуре до полного просветления надосадочной жидкости. Процесс «созревания» микросферолитов контролировали с помощью бинокулярного микроскопа. Затем надосадочную жидкость удаляли, осадок тщательно трижды отмывали от ионов Na^+ и Cl^- деионизованной водой и сушили при комнатной температуре. При соблюдении данной методики получались сферические микросферолиты диаметром 3–5 мкм.

Получение полиэлектролитных капсул, загруженных ферментом. По стандартной методике получения полиэлектролитных пленок [7] из чередующихся слоев противоположно заряженных полиэлектролитов ПААГ и ПСС создавали многослойную «одежду» на сферических частицах. К навеске ($m = 100$ мг) составных микросферолитов добавляли 1,5 мл раствора ПААГ

(1 мг/мл) в 0,5 М NaCl. Суспензию перемешивали в течение 15 мин на качалке, затем излишки полимера отделяли от частиц центрифугированием при 700 об/мин в течение 20–30 с. Полученные частицы трехкратно промывали деионизированной водой от остатков ПААГ центрифугированием. Затем такую же процедуру проводили, используя раствор ПСС (концентрация 1 мг/мл) в 0,5 М NaCl. При агрегации частиц в процессе адсорбции полиэлектролитов, суспензию микрочастиц обрабатывали ультразвуком в течение 1–3 с (пробирки с суспензией помещали в ультразвуковую ванну, 35 Гц). Процедура формирования микросферолитов проводилась при комнатной температуре. В результате были получены карбонатные микрочастицы, содержащие в себе фермент и покрытые сверху многослойными полимерными оболочками – ПААГ/(ПСС/ПААГ)_n или ПСС/(ПААГ/ПСС)_n, где $n = 1-2$.

Полученные полиэлектролитные капсулы помещали в диализные мешки, освобождали от кальций-карбонатных ядер с помощью солей ЭДТА или ЭГТА разной молярности и оставляли в растворе на 2–18 ч (в зависимости от задачи эксперимента) при перемешивании на магнитной мешалке и без перемешивания. Затем полиэлектролитные капсулы с ферментом отмывали от растворов, помещали в деионизованную воду или раствор 0,1 М NaCl и хранили в холодильнике при 4°C.

Определение активности и каталитических характеристик инкапсулированного фермента. Активность пероксидазной реакции характеризовали по изменению начальной скорости реакции. Кинетику реакции регистрировали по изменению оптического поглощения при длине волны 590 нм, соответствующей окислению бензидина с появлением синего окрашивания. Начальные стационарные скорости реакции определяли по наклону линейной части кривой накопления продукта реакции во времени в течение 10 или 30 с от начала регистрации реакции: $V = D_{590}/30$ или $V = D_{590}/10$.

В работе определяли зависимость начальной скорости пероксидазной реакции от концентрации субстрата. Кинетические параметры – максимальную скорость V_{\max} и константу Михаэлиса–Ментен K_m находили из графиков Лайнуивера–Берка (двойные обратные координаты, $1/[S]$, $1/[V_{\text{нач}}]$).

Концентрацию инкапсулированного фермента определяли методом Брэдфорда по калибровочной кривой, построенной по концентрации бычьего сывороточного альбумина [8]. Концентрацию перекиси водорода определяли,

используя коэффициент экстинкции $\varepsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс инкапсулирования ферментов, предложенный авторами работы [3], можно условно разделить на три независимых этапа: 1) получение составных кальций-карбонатных сферолитов (CaCO_3 -фермент), 2) создание многослойной полиэлектролитной оболочки на сферолитах путем наслаивания противоположно заряженных полиэлектролитов методом очередной адсорбции на составные сферолиты, 3) удаление кальций-карбонатной компоненты. В результате получают полиэлектролитные микрокапсулы с ферментом внутри. Исследуемый в настоящей работе фермент – пероксидаза хрена.

Краткая характеристика пероксидазы хрена.

Выбор пероксидазы хрена в качестве объекта исследования обусловлен несколькими причинами. Пероксидаза – один из наиболее распространенных ферментов, содержащийся в растениях, микроорганизмах, тканях животных. Этот фермент катализирует окисление широкого спектра органических соединений пероксидом водорода с образованием токсичных пероксидов, удаляющихся из живых организмов. В качестве модельного фермента пероксидаза хрена широко используется в молекулярно-биологических исследованиях благодаря сравнительно небольшому размеру (молекулярная масса около 40 кДа), относительной стабильности и доступности. В биосенсорах пероксидазу хрена используют непосредственно в качестве биокатализатора или в качестве метки [9].

Пероксидаза хрена относится к группе двухкомпонентных ферментов, в составе которых присутствуют гемин, представленный протопорфирином IX в комплексе с трехвалентным железом, и полипептидная цепь. Фермент имеет размер белковой глобулы 50 Å, содержит около 43% α -спиральных участков, $3/4$ полипептидной цепи пероксидазы представлены гидрофобными незаряженными аминокислотами [10].

В настоящем исследовании детектируемым веществом (первым субстратом) является пероксид водорода, а вторым субстратом – бензидин.

Упрощенную схему пероксидазного цикла в этом случае можно представить следующим образом:

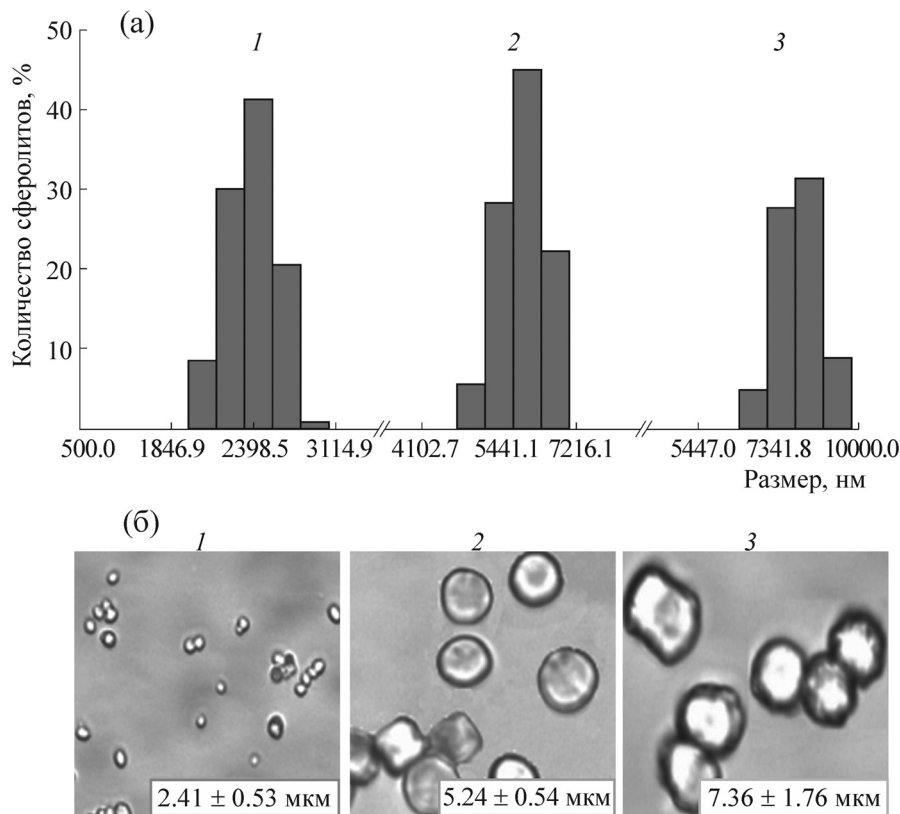
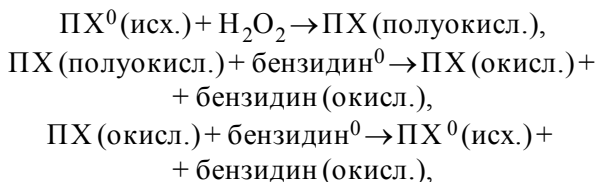


Рис. 1. Распределение микрочастиц CaCO_3 по размеру (по диаметру) для трех типов образцов: (а) – гистограммы распределения микросферолитов с разными диаметрами; (б) – фотографии этих же микросферолитов, полученные с помощью светового микроскопа.



где ПХ^0 (исх.), ПХ (полуокисл.), ПХ (окисл.) – исходная пероксидаза хрена и ее окисленные формы соответственно; бензидин^0 , бензидин (окисл.) – исходный бензидин и его окисленная форма соответственно.

Переходы ПХ (полуокисл.) \rightarrow ПХ (окисл.) и ПХ (окисл.) \rightarrow ПХ^0 являются одноэлектронными процессами, причем ПХ (полуокисл.) обладает двумя окисленными эквивалентами (один на железе гема, а другой в виде π -катион радикала на порфирине [11]) по сравнению с нативной формой фермента ПХ^0 , а ПХ (окисл.) – одним. Методом ЯМР-спектроскопии показано, что как в полуокисленной, так и в окисленной форме пероксидазы железо присутствует в феррильной форме, т.е. имеет формальный заряд +4 [12].

В процессе восстановления перекиси водорода участвуют железо (III) пропорфирина IX

и два ключевых дистальных аминокислотных остатка – His42 и Arg38 [10]. Вначале молекула H_2O_2 связывается с железом гема. Протон от перекиси переходит на гистидин, который выполняет роль основания. При этом Arg38 обеспечивает перераспределение электронной плотности между атомами кислорода, способствуя гетеролитическому расщеплению связи в молекуле перекиси водорода.

Получение составных микросферолитов (CaCO_3 -белок) заданного размера. Первый этап получения инкапсулированных ферментов методом биоминерализации состоит из получения собственно составных сферолитов (CaCO_3 -белок) – коровых сферических частиц с ферментом. Поскольку размеры сферолитов определяют размеры будущих микрокапсул, то на этом этапе важно было отработать метод получения коровых частиц заданного размера с узким распределением по диаметру. Отработка методики получения микросферолитов заданного диаметра проводилась без добавления фермента. Варьируя концентрацию реагентов, гидродинамические характеристики процесса (интенсивность и продолжительность перемешивания реакционной смеси), можно получить микро-

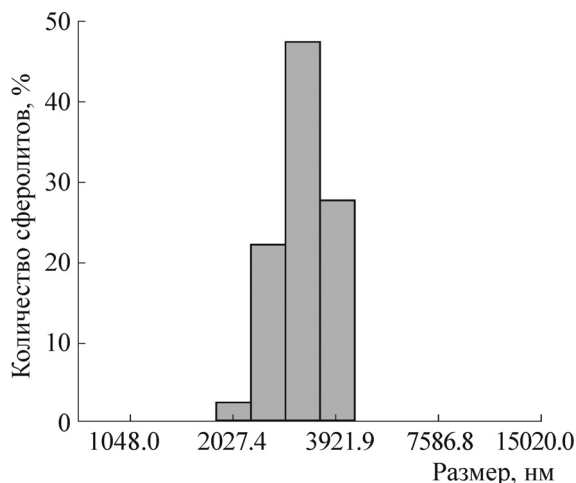


Рис. 2. Гистограмма распределения составных микросферолитов (CaCO_3 -пероксидаза хрена) по размеру со средним диаметром $3,62 \pm 0,52$ мкм.

сферолиты со средним диаметром от ~ 2 до 10 мкм с достаточно узким распределением по размеру. На рис. 1 показаны гистограммы распределения кальций-карбонатных сферолитов для трех типов образцов.

Отработав метод получения микросферолитов заданного размера, мы приступили к изготовлению составных сферолитов с пероксидазой хрена. В настоящей работе для получения инкапсулированного фермента использовали в основном составные сферолиты с диаметром приблизительно 3–5 мкм, полученные по методике, описанной в разделе «Материалы и методы». На рис. 2 показана гистограмма распределения составных микросферолитов для одного из экспериментальных образцов.

На рис. 3 представлена фотография пяти-слойных микрокапсул ПААГ/(ПСС/ПААГ)₂, которые были получены из составных сферолитов и с которыми проводили дальнейшие исследования.

Из рисунка видно, что полученные микрокапсулы однородны по размерам. Как показали наши дальнейшие исследования, размеры микрокапсул в пределах 2–10 мкм не влияли на ферментативную активность инкапсулированной пероксидазы хрена в пределах ошибки эксперимента. Размеры микрокапсул предположительно могут определять такие характеристики, как прочность, устойчивость микрокапсул.

Определение влияния полиэлектролитов полиаллиламина гидрохлорида и полистиролсульфоната на активность пероксидазы хрена. Второй этап получения инкапсулированных ферментов данным методом – это формирование полиэлектролитной оболочки. Метод предпо-

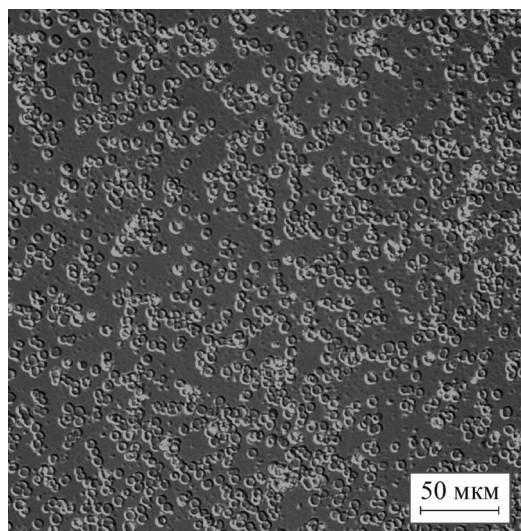


Рис. 3. Фотография нанесенных на покровное стекло микрокапсул ПААГ/(ПСС/ПААГ)₂ в световом микроскопе.

лагает поочередное наслаивание противоположно заряженных полиэлектролитов на составные сферолиты. При формировании такой оболочки в качестве первого полиэлектролита предпочтительно использовать поликатион, поскольку коровые микрочастицы CaCO_3 в целом отрицательно заряжены, их электрокинетический потенциал поверхности (ξ -потенциал) составляет $-12,2 \pm 2,5$ мВ [3]. Однако было показано, что полианионы, например полистиролсульфонат, также связываются с кальций-карбонатными частицами и могут быть использованы в качестве первого слоя при формировании полиэлектролитных микрокапсул [13–16]. В этих же работах было показано, что каталитическая активность инкапсулированных ферментов зависит от заряда полиэлектролитов, образующих внутреннюю оболочку.

Поэтому нами были проведены эксперименты по изучению воздействия полиэлектролитов на каталитическую активность пероксидазы хрена. Для проведения экспериментов были выбраны полиэлектролиты, имеющие выраженные отрицательный и положительный заряды: поликатион ПААГ и полианион ПСС. В буферный (натрий ацетатный буфер, pH 5,3) раствор «свободного» белка добавляли раствор ПААГ или ПСС до конечной концентрации 0,5 мг/мл, выдерживали при комнатной температуре 1 ч, после чего определяли активность пероксидазы хрена. Концентрация полиэлектролитов (0,5 мг/мл) была выбрана, поскольку именно эти концентрации использовались при капсулировании пе-

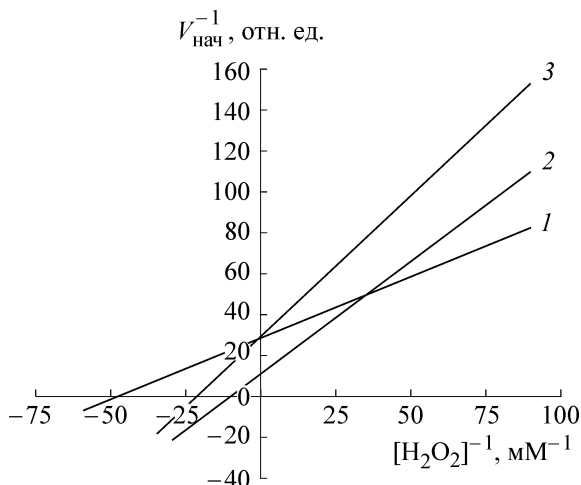


Рис. 4. Зависимости начальной скорости пероксидазной реакции от концентрации перекиси водорода: 1 – в отсутствие полиэлектролита, $V_{\max} = 0,0351 \pm 0,018$, $K_m = 0,021 \pm 0,001$; 2 – в присутствии ПААГ, $C_{\text{ПААГ}} = 0,5$ мг/мл, $V_{\max} = 0,096 \pm 0,048$, $K_m \text{ каж} = 0,106 \pm 0,052$; 3 – в присутствии ПСС, $C_{\text{ПСС}} = 0,5$ мг/мл, $V_{\max} = 0,034 \pm 0,017$, $K_i = 0,38 \pm 0,019$. Условия опыта: среда – 0,2 М натрий-ацетатный буфер, pH 5,3, концентрация пероксидазы хрена 0,05 мкг/мл, концентрация бензидаина 0,1 мМ, объем реакционной среды 3 мл.

пероксидазы хрена методом поочередной адсорбции.

Зависимость начальной скорости реакции пероксидазы хрена, определенной спектрофотометрически по изменению поглощения при длине волны 590 нм за 10 с, от концентрации перекиси водорода в присутствии полиэлектролитов показана на рис. 4. Данные представлены в двойных обратных координатах для уравнения Михаэлиса–Ментен.

Эксперименты показали, что полианион ПСС ингибирует каталитическую активность пероксидазы хрена (рис. 4, кривая 3). Как видно из рисунка, ингибирование активности фермента полианионом идет по конкурентному типу, $K_i = 0,380 \pm 0,019$. Такой результат влияния ПСС на каталитическую активность пероксидазы хрена скорее всего обусловлен электростатическим взаимодействием полианиона с активным центром пероксидазы хрена, который заряжен положительно. Совсем другая картина наблюдалась для поликатиона ПААГ. Каталитическая активность фермента в присутствии в реакционной среде ПААГ повышалась, при этом максимальная скорость реакции увеличилась почти в три раза и составила $V_{\max} = 0,0960 \pm 0,0048$, при $V_{\max} = 0,0351 \pm 0,0018$ в контроле (для свежеприготовленного фермента).

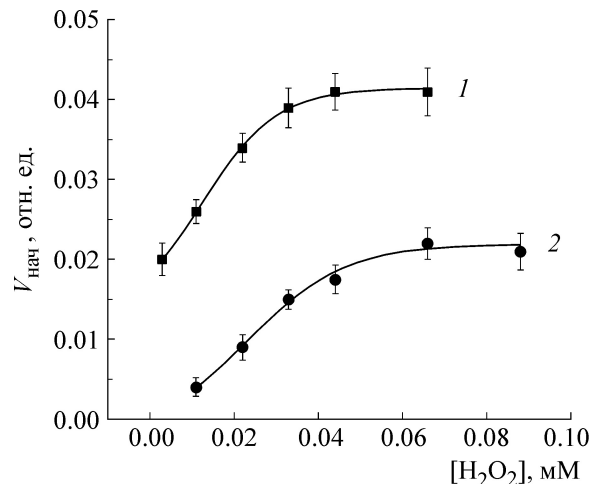


Рис. 5. Зависимости начальной скорости пероксидазной реакции от последовательности наложения полиэлектролитов: 1 – трехслойные капсулы с последовательностью наложения полиэлектролитов ПААГ/ПСС/ПААГ (положительный знак заряда внутренней оболочки, контактирующей с ферментом), $V_{\max} = (0,041 \pm 0,003 \text{ мМ})/30 \text{ с}$, $K_m \text{ каж} = 0,007 \pm 0,002$; 2 – трехслойные капсулы с последовательностью наложения полиэлектролитов ПСС/ПААГ/ПСС (отрицательный знак заряда внутренней оболочки, контактирующей с ферментом), $V_{\max} = (0,023 \pm 0,006 \text{ мМ})/30 \text{ с}$, $K_m \text{ каж} = 0,026 \pm 0,003$. Условия опыта: среда 0,2 М натрий-ацетатный буфер, pH 5,3, концентрация пероксидазы хрена 0,05 мкг/мл, концентрация бензидаина 0,1 мМ, объем реакционной среды 3 мл.

Промежуточный вывод из этих экспериментальных данных заключается в том, что для получения инкапсулированной пероксидазы хрена с более высокой ферментативной активностью первый (внутренний) слой полиэлектролитной оболочки при формировании микрокапсул предпочтительно изготавливать из поликатиона ПААГ.

Чтобы проверить данное предположение, были проведены исследования каталитической активности инкапсулированной пероксидазы хрена с оболочками ПААГ/ПСС/ПААГ (положительный заряд на внутреннем слое оболочки, контактирующей с ферментом) и ПСС/ПААГ/ПСС (отрицательный заряд на внутреннем слое оболочки). На рис. 5 показана зависимость активности пероксидазы для двух различных способов образования капсулы.

Как ожидалось по результатам предыдущего эксперимента, внутренний поверхностный заряд полиэлектролитной оболочки микрокапсулы, контактирующий с исследуемым ферментом, изменяет в разной степени его активность. Активность пероксидазы хрена, включенной в полиэлектролитные микрокапсулы с положи-

тельно заряженной внутренней поверхностью оболочки ПААГ/ПСС/ПААГ (рис. 5, кривая 1), примерно в два раза выше по сравнению с активностью этого фермента в капсулах с отрицательно заряженной поверхностью оболочки ПСС/ПААГ/ПСС (рис. 5, кривая 2), и сдвинута в сторону меньших концентраций перекиси водорода.

Для определения отличий каталитических характеристик инкапсулированного фермента и свободного фермента были проведены дополнительные исследования (рис. 6).

На графике зависимости начальной скорости пероксидазной реакции от концентрации субстрата перекиси водорода в двойных обратных координатах видно снижение максимальной скорости каталитической реакции и константы Михаэлиса–Ментен для капсулированного фермента, характерное для бесконкурентного типа ингибирования. То есть полиэлектролит ПААГ, образующий внутреннюю поверхность микрокапсулы и контактирующий с ферментом, ингибирует его активность по бесконкурентному типу (зависимости 1 и 2 на рис. 6 практически параллельны). Для пероксидазы хрена, заключенной в капсулы с отрицательно заряженной внутренней поверхностью ПААГ/(ПСС/ПААГ)₂, наблюдается снижение максимальной скорости $V_{\max} = 0,016 \pm 0,003$ мМ и увеличение $K_m \text{ каж} = 0,032 \pm 0,002$. Следовательно, здесь можно говорить о смешанном типе ингибирования полиэлектролитом ПСС, образующим внутреннюю поверхность микрокапсулы.

Таким образом, показано, что взаимодействие ферментов с отдельными полиэлектролитами отличается от их взаимодействия с упорядоченными поверхностями, образованными из этих же полиэлектролитов. Для более точного подбора первого слоя при инкапсулировании ферментов в качестве тестовых экспериментов предлагается добавлять в растворы с изучаемыми свободными ферментами полые микрокапсулы с нужным полиэлектролитом во внешнем слое так, как было в наших экспериментах по изучению фермента глюкозооксидаза [17].

Изучение влияния растворителей кальций-карбонатного ядра полиэлектролитных капсул на ферментативную активность пероксидазы хрена. Важным этапом технологии получения инкапсулированного функционально-активного фермента является процедура удаления кальций-карбонатной компоненты из микрокапсул. В работах [2,3,13] было показано существенное снижение активности инкапсулированных фер-

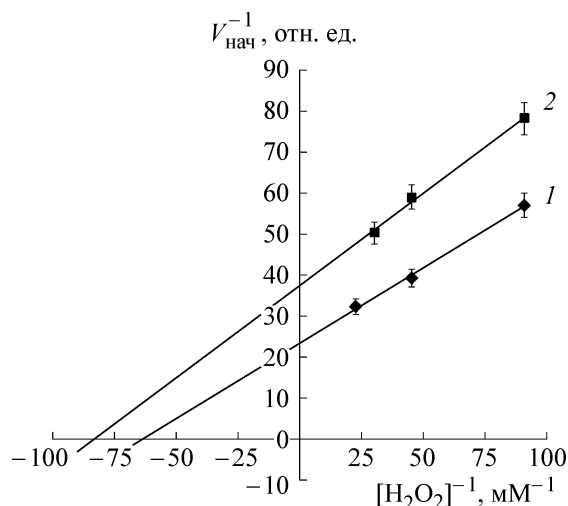


Рис. 6. Зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата перекиси водорода в двойных обратных координатах: 1 – свободная пероксидаза хрена: $V_{\max} = (0,043 \pm 0,002 \text{ мМ})/30 \text{ с}$, $K_m = 0,016 \pm 0,001 \text{ мМ}$; 2 – пероксидаза хрена, заключенная в капсулы с положительно заряженной внутренней поверхностью ПААГ/(ПСС/ПААГ)₂: $V_{\max} = (0,027 \pm 0,0013 \text{ мМ})/30 \text{ с}$, $K_m \text{ каж} = 0,012 \pm 0,006$. Условия опыта: 1 мМ МЕС-буфер, pH 5,3, 1 мМ бензидина, объем реакционной смеси 3 мл, концентрация фермента 0,05 мкг/мл.

ментов по сравнению с активностью свободных ферментов. Использование технологии удаления кальций-карбонатных ядер, применяемой для полых микрокапсул, в ряде случаев может не являться оптимальным для удаления карбоната кальция из двухкомпонентного (кальций-карбонат-фермент) корового ядра микрокапсул, поскольку растворитель взаимодействует с ферментом и может изменять его активность. Возникла необходимость подбора условий (и растворителя) для удаления кальций-карбонатной компоненты коровой частицы из микрокапсул с пероксидазой хрена, чтобы повреждающее воздействие растворителя на фермент было минимальным. В работе [18] было показано, что применение ЭГТА для удаления кальций-карбонатной компоненты из микрокапсул с уреазой повысило активность этого фермента до 70% от активности свободного фермента. Поэтому нами были поставлены эксперименты по действию растворителей на составные сферолиты с пероксидазой хрена, покрытые пятислойной оболочкой ПААГ/(ПСС/ПААГ)₂. Варьирование условий растворения коровой компоненты – использование ЭДТА или ЭГТА, изменение концентрации хелатирующего агента (2–25 мМ), длительности воздействия (2–18 ч), температуры (4–25°C), перемешивание растворов – показали, что во всех случаях при ис-

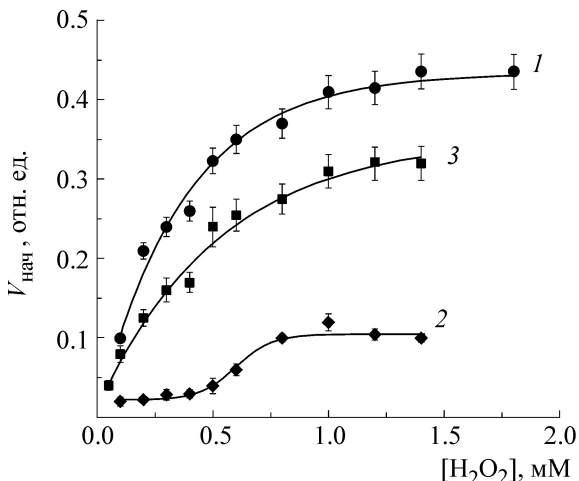


Рис. 7. Зависимости начальной скорости пероксидазной реакции от концентрации перекиси водорода: 1 – фермент в растворе буфера; $V_{\max} = 0,425 \pm 0,022$, $K_m = 0,25 \pm 0,03$; 2 – капсулированный фермент, очищенный в растворе ЭДТА в течение 2 ч, $V_{\max} = 0,105 \pm 0,022$, $K_m \text{ каж} = 0,53 \pm 0,03$; 3 – капсулированный фермент, очищенный в 5 мМ растворе ЭГТА в течение 16 ч, $V_{\max} = 0,315 \pm 0,025$, $K_m \text{ каж} = 0,26 \pm 0,02$.

пользовании ЭГТА в качестве растворителя кальций-карбонатной компоненты микрокапсул каталитическая активность инкапсулированной пероксидазы хрена была выше, чем при применении ЭДТА. На рис. 7 представлен график зависимости начальной скорости каталитической реакции пероксидазы хрена от концентрации субстрата пероксида водорода. Видно, что скорость реакции инкапсулированного фермента, очищенного от кальций-карбонатной компоненты с помощью ЭДТА (кривая 2), примерно в пять–шесть раз меньше скорости реакции свободного фермента (кривая 1). Замена растворителя ЭДТА на ЭГТА привела к повышению каталитической активности инкапсулированной пероксидазы хрена в два с половиной раза (кривые 2 и 3), при этом ее активность уже можно сравнивать с активностью свободного фермента (кривые 1 и 3). (Условия опыта: концентрация свободной пероксидазы 0,87 мкг/мл, концентрация инкапсулированного фермента 1,25 мкг/мл, 0,1 мМ бензидаина, 0,2 М натрий-ацетатный буфер, pH 5,3, объем реакционной смеси 3 мл. Капсулированный фермент с оболочкой ПААГ/(ПСС/ПААГ)₂.)

Снижение активности инкапсулированной (очищенной от CaCO₃ с помощью ЭДТА) пероксидазы хрена можно объяснить взаимодействием ЭДТА с ионами железа, присутствующими в активном центре фермента пероксидазы хрена, и соответственно изменением

средства фермента к субстрату. Поэтому мы предлагаем использовать в качестве хелатирующего агента раствор ЭГТА, который, в отличие от ЭДТА, связывает исключительно ионы двухвалентных металлов и обладает меньшим повреждающим воздействием на ферменты.

ВЫВОДЫ

Проведены исследования каталитической активности инкапсулированной пероксидазы хрена в зависимости от типа полиэлектролита, образующего внутренний слой микрокапсулы, контактирующей с ферментом. Показано, что фермент, контактирующий с внутренней оболочкой микрокапсулы, заряженной положительно, имеет лучшее сродство к субстрату пероксида водорода и обладает каталитической активностью примерно в два раза выше, чем фермент в капсулах с отрицательным внутренним слоем оболочки.

Показано, что использование ЭГТА вместо ЭДТА в качестве хелатирующего агента для удаления кальций-карбонатной компоненты из микрокапсул гораздо меньше повреждает фермент пероксидазу хрена. При этом активность инкапсулированного фермента становится сравнимой с активностью нативного фермента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (проект AP05134201).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. B. Sukhorukov, D. V. Volodkin, A. M. Günther, et al., *J. Materials Chem.* **14** (14), 2073 (2004).
2. D. V. Volodkin, M. Prevot, G. B. Sukhorukov, and A. I. Petrov, *Langmuir* **20** (8), 3398 (2004).
3. A. I. Petrov, D. V. Volodkin, and G. B. Sukhorukov, *Biotechnol. Progr.* **21** (3), 918 (2005).
4. В. И. Терновский, Ю. В. Чернохвостов, М. Г. Фомкина и М. М. Монтрель, *Биофизика* **52** (5), 825 (2007)
5. М. М. Монтрель, В. И. Терновский, М. Г. Фомкина и А. И. Петров, Патент № 2333231, Б.И. №25 (2008) (52).
6. Б. И. Сухоруков, С. А. Тихоненко, Е. А. Сабурова и др., *Биофизика* **52** (6), 1041 (2007).
7. G. B. Sukhorukov, M. M. Montrel, A. I. Petrov, et al., *Biosensors & Bioelectronics* **9** (11), 913 (1996).
8. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
9. Г. В. Преснова, М. Ю. Рубцова и А. М. Егоров, *Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева)* **LII** (2), 60 (2008).
10. И. Г. Газарян, Д. М. Хушпульян и В. И. Тишков, *Успехи биол. химии* **46**, 306 (2006).

11. L. K. Hanson, C. K. Chang, and M. S. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **3** (11), 427 (1981).
12. В. В. Рогожин, *Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов* (ГИОРД, СПб., 2004).
13. Е. А. Сабурова, С. А. Тихоненко, Ю. Н. Дыбовская и Б. И. Сухоруков, *Журн. физ. химии* **82** (3), 554 (2008).
14. А. В. Дубровский, Л. И. Казакова, Д. В. Гужвина и др., *Альманах клин. медицины* **17** (2), 325 (2008).
15. Б. И. Сухоруков, С. А. Тихоненко, Е. А. Сабурова и др., *Альманах клин. медицины* **17** (2), 371 (2008).
16. А. В. Дубровский, Е. В. Мусин, А.Л. Ким и С. А. Тихоненко, *Прикладная биохимия и микробиология* **52** (2), 250 (2016).
17. М. Г. Фомкина, Р. Е. Казаков, Г. М. Минкабиров, Ю. А. Ким, *Рос. биомед. журн.* **12** (3), 690 (2011).
18. М. Г. Фомкина и С. Ж. Ибадуллаева, *Научное приборостроение* **28** (3), 36 (2018).

Search for the Ways to Improve the Catalytic Activity of Encapsulated Horseradish Peroxidase

M.G. Fomkina*, G.M. Minkabirova*, A.M. Montrel*, and S.Zh. Ibadullaeva**

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Korkyt Ata Kyzylorda State University, ul. Aiteke Bi 29a, Kyzylorda, Republic of Kazakhstan*

We consider a method, proposed earlier, for encapsulation of enzymes using the layer-by-layer adsorption of oppositely charged polyelectrolytes into composite spherulites (CaCO₃-protein) followed by subsequent dissolution of the constituent calcium carbonate. The main objective of this work was to select conditions for encapsulation of the enzyme horseradish peroxidase by the said method for the purpose of obtaining encapsulated horseradish peroxidase with catalytic activity comparable to that of a free enzyme. During the implementation process, we explored stages of the methodology for the fabrication of polyelectrolyte microcapsules with the use of the studied enzyme. The technology for obtaining composite spherulites of the desired size ranging from 2 to 10 μm has been introduced. It has been shown that catalytic activity of horseradish peroxidase encapsulated in a microcapsule with positively charged inner surface of the microcapsule shell (the inner shell layer modified by a polycation polyallylamine hydrochloride) was significantly higher than that of horseradish peroxidase encapsulated in a microcapsule with negatively charged inner surface of the microcapsule shell (modified by a sodium polystyrene sulfonate (polyanion)). It has been found out that EGTA, a decalcifying agent, used to dissolve CaCO₃ in horseradish peroxidase macrocapsules is significantly less harmful to enzymes than EDTA. It has been shown that catalytic activity of horseradish peroxidase encapsulated in polyallylamine hydrochloride/sodium polystyrene sulfonate/polyallylamine hydrochloride microcapsules (with positively charged inner surface of the microcapsule shell) was 60–70% of the activity of the free enzyme (when EGTA was used to dissolve calcium-carbonate, the constituent of the composite spherulites).

Keywords: encapsulation, microcapsules, horseradish peroxidase, polyelectrolytes, catalytic activity, biosensors