

УДК 577.151.62

ПОЛУЧЕНИЕ БИФЕРМЕНТНЫХ СШИТЫХ АГРЕГАТОВ КАТАЛАЗЫ И СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ НА ОСНОВЕ ВАТЕРИТНОЙ МАТРИЦЫ

М.А. Тагирова, Н.Л. Еремеев, Н.Г. Балабушевич, Н.Л. Клячко

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В последнее время иммобилизованные мультиферментные системы пользуются большим спросом в биотехнологии. К преимуществам таких систем можно отнести их способность предотвращать накопление нестабильных промежуточных продуктов, снижение вторичных нежелательных реакций и достижение работы двух и более ферментов в реакционных процессах [1].

Биферментные комплексы каталазы и супероксиддисмутазы представляют собой выгодный подход к подготовке одношагового этапа, вместо многоступенчатых реакционных процессов, направленных на нейтрализацию АФК, образующихся после травм [2].

Одним из подходов, направленных на получение микросфер антиоксидантных ферментов сферической формы с узким распределением по размерам и с высокой остаточной активностью ферментов, является включение их в ватеритную матрицу, с последующим её растворением хелатирующими агентами.

Целью данной работы является разработка технологически простого способа инкапсулирования (на основе ватеритной матрицы с последующим ее растворением) антиоксидантных ферментов каталазы и супероксиддисмутазы, обеспечивающего длительное время стабильности и сохранением ферментативной активности биферментного поперечно-сшитого агрегата.

Микросферы ватерита с соосаженными биферментами (продукт СС-СОД/Cat) были получены сливанием растворов солей CaCl_2 и Na_2CO_3 в присутствии ферментов каталазы и супероксиддисмутазы. После промывки образовавшихся частиц от не связавшихся ферментов была проведена их обработка глутаровым альдегидом с последующей промывкой от избытка непрореагировавшего бифункционального агента (продукт СС-СОД/Cat-GA) и растворением карбонатной матрицы раствором 0,1 М ЭДТА дробным добавлением (СОД/Cat-CLEAs).

Полученные СОД/Cat-CLEAs имели сферическую форму диаметром $2,5 \pm 1,5$ мкм. Одновременное включение супероксиддисмутазы и каталазы не приводит к изменению формы ватерита, однако с введением второго фермента диаметр получаемых биферментных combi-CLEAs СОД/Cat значительно уменьшается и становится неравномерным.

Количество частиц СОД/Cat-CLEAs в разных буферных растворах оценивали с помощью оптической микроскопии (табл. 1). Теоретически рассчитали потенциальное количество микросфер СОД-CLEAs (исходя из среднего диаметра частиц, плотности и выхода синтеза СОД/Cat-CLEAs) и, что важно отметить, теоретические расчеты достаточно хорошо совпадали с экспериментальными данными для СС-СОД/Cat и СОД/Cat-CLEAs в разных буферных растворах.

Таблица 1. Общее количество частиц СС-СОД/Cat и СОД/Cat-CLEAs в разных буферных растворах.

	Теоретич. кол-во	СС-СОД/Cat	СОД/Cat-CLEAs (ЭДТА)	СОД/Cat-CLEAs (Трис – 8,0)	СОД/Cat-CLEAs (PBS – 7,4)
Кол-во ч-ц, шт.	$3,46 \cdot 10^9$	$(1,68 \pm 0,13) \cdot 10^9$	$(6,4 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$(4,7 \pm 0,14) \cdot 10^8$	$(3,2 \pm 1,07) \cdot 10^8$

Работа выполнена при финансовой поддержке Госрегистрационной темы АААА-А21-121011290089-4.

Использовано оборудование, закупленное по Программе развития МГУ имени М.В. Ломоносова.

Литература

- S. Lozano et al. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement – a review. Biocatalysis, 2015, V.1, P.166–177.
C.E. Hulsebosch. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. Adv. Physiol. Educ., 2002, V.26, P.238–255.