

РАЗРАБОТКА И ТЕСТИРОВАНИЕ НОВЫХ НАНОБИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛАЗОСОДЕРЖАЩИХ ФЕРМЕНТОВ И БИОСОВМЕСТИМЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ*И.А. Любкевич, С.А. Смирнова, А.И. Зорин, В.П. Молчанов, А.М. Сульман**Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия*

С учетом растущей устойчивости микроорганизмов к антибиотикам перспективной стратегией борьбы с инфекционными заболеваниями становится использование бактериолизитических ферментов. В качестве объекта исследования в данной работе выступали специально синтезированные образцы нанобиокатализаторов на основе лизоцима. Этот фермент относится к классу муреиновых гидролаз, расщепляющих пептидогликан, содержащийся в клеточных стенках бактерий. Он эффективен в борьбе с бактериями, особенно с теми, которые обладают грамположительной клеточной стенкой, может применяться для лечения таких инфекций как тонзиллит, бронхит, пневмония. Для повышения эффективности использования лизоцима проведена его иммобилизация на биосовместимых полимерных матрицах природного происхождения.

Тестирование синтезируемых нанобиокатализаторов выполнялось с применением бактерий вида *Micrococcus luteus*, являющегося стандартной тест-культурой для спектрофотометрических методик определения антибактериальной активности ферментов. Разработана методика определения антибактериальной активности нанобиокатализаторов на основе лизоцима, заключающаяся в измерении изменений оптической плотности во время действия препарата на тестовую культуру. Измерения проводились до достижения постоянной оптической плотности против дистиллированной воды, активность лизоцима вычислялась по изменению оптической плотности.

Эксперименты были проведены на растворах лизоцима и лизоциме, ковалентно или адсорбционно иммобилизованном на полимерных носителях – альгинате или хитозане. Носители были выбраны по принципам биоразлагаемости и биосовместимости. Ковалентная иммобилизация на хитозане осуществлялась путём случайной перешивки лизоцима и хитозана глутаровым альдегидом с последующей простой отмывкой препарата от избытка сшивающего агента. Иммобилизация на альгинате проводилась путем микрокапсулирования – это процесс заключения мелких частиц вещества в тонкую оболочку пленкообразующего материала. В результате микрокапсулирования получены частицы биокатализаторов в виде отдельных микрокапсул размером от долей микрона до сотен микрон.

Моделирование кинетики лизиса показало большую линейность реакции у препаратов с меньшей концентрацией. Степень кривизны кинетической кривой зависит от активности раствора. Наибольшей линейностью обладают пробы с минимальным содержанием (активностью) лизоцима. Активность препаратов с иммобилизованным лизоцимом в результате была ниже активности растворов чистого лизоцима. Препараты лизоцима, адсорбционно иммобилизованного на альгинате, были более активны чем препараты, связанные ковалентно (разницы между концентрациями обнаружено не было). Препараты лизоцима, иммобилизованного на хитозане, показали аналогичные результаты.

Разработаны математические модели для экспериментальных препаратов. Смоделированы скорости лизиса культуры *Micrococcus luteus*. В ходе анализа полученных данных рассчитаны коэффициенты уравнения ингибирования микробной культуры растворами лизоцима разной концентрации. По уравнению кинетики каталитического химического процесса рассчитана константа скорости реакции, установлен первый порядок реакции по лизоциму и полупорядок реакции по микрококку. Первый порядок означает наличие лишь одного субстрата реакции лизиса и правильность выбора для анализа уравнения кинетики Михаэлиса–Ментен. Полупорядок по микрококку объясняется наличием диффузионных ограничений в реакции. Рассчитаны коэффициенты V_m (максимальная скорость реакции при данной концентрации субстрата) и K_m (константа Михаэлиса) уравнения Михаэлиса–Ментен для разных концентраций раствора лизоцима.

В результате выполнения исследований экспериментально подтверждено, что разработанная методика определения активности может иметь широкое применение на фармацевтических и биотехнологических производствах для улучшения контроля качества выпускаемой продукции.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-79-10042).