

УДК 577.152.3 + 663.15

Т.С. Тодосійчук, Г.Я. Менжерес,  
В.Л. Чумак, М.А. Григор'єва

## ФІЗИКО-ХІМІЧНІ АСПЕКТИ ВЗАЄМОДІЙ ЕНЗИМНОГО КОМПЛЕКСУ ЦИТОРЕЦИ- ФЕН З НОСІЯМИ РІЗНОЇ ПРИРОДИ

### Вступ

Однією з тенденцій, що відзначається при розробці сучасних біологічно активних препаратів, є використання в їх складі широкого спектра допоміжних речовин, що мають різноманітне призначення – формоутворюючу, стабілізуючу, пролонгуючу дію тощо [1–4]. Використання допоміжних речовин дає можливість не тільки створити зручну для застосування форму препарату, але й скорегувати та іноді й підсилити активність біологічно активної субстанції. У певних випадках, наприклад при використанні іммобілізації при створенні препарату, допоміжна речовина виступає також як основа (носій) біологічно активної речовини.

Розробка вказаних засобів передбачає насамперед підбір допоміжних речовин, які відповідають за формоутворюючими та іншими провідними характеристиками призначенню препарату, і визначення їх впливу на діючу субстанцію. Однак надалі важливе значення має визначення способу і сили взаємодії субстанції та допоміжних речовин, що зумовлюватимуть стабільність і ефективність препарату, а також шляхи оптимізації його готової форми.

Однією з біологічно активних речовин, що має потенційно широкі сфери практичного застосування як протимікробний і антисептичний засіб, є бактеріолітичний ферментний препарат мікробного походження Циторецифен [5]. Для створення його готової форми було запропоновано використати іммобілізацію препарату адсорбційним методом, зважаючи на простоту, ефективність та технологічність даного способу закріплення субстанцій. Ряд речовин, які було обрано для дослідження як носії, досить відомі і використовуювані в аналогічних розробках і дають змогу створити задану форму препарату [6, 7].

### Постановка задачі

Вибір носіїв для розробки готової форми іммобілізованого препарату Циторецифен був

пов'язаний з їх потенційною здатністю стабілізувати і пролонгувати дію біологічно активних речовин, біологічно нешкідливістю та необхідними формоутворюючими характеристиками. Однак важливим було встановлення механізмів і особливостей взаємодій препарату та обраних носіїв, що зумовлюватиме стабільність та ефективність готової форми, а також дасть можливість при потребі скорегувати режими і параметри іммобілізації. Тому задачею дослідження було встановлення фізико-хімічних аспектів взаємодії ензимного комплексу Циторецифен з носіями різної природи з метою вибору композиції готової форми, що забезпечує оптимальну стабільність і ефективність препарату.

### Матеріали і методи досліджень

У дослідженні використовувався ферментний препарат Циторецифен, синтезований штамом *S. recifensis* v. *lyticus* 2435/М з літичною активністю 140 тис. од/г.

Для визначення літичної активності нативного та іммобілізованих ферментних препаратів використовувались тест-культури: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus bulgaricus* – добові культури, вирощені на м'ясо-пептонному агарі (МПА) і середовищі МРС, а також *Lactobacillus bulgaricus* 51 – ліофільно висушений препарат (ВО "Ензим", м. Ладижин). Визначення літичної активності проводилось турбідиметричним методом [8].

Як носії для іммобілізації використовувались аеросил марки А-300 (А), метилцелюлоза (МЦ) і гідрофільні полімери – поліетиленгліколь (ПЕГ), поліоксетилен (ПОЕ), полівініловий спирт (ПВС), а також поліакриламід (ПАА). Вплив носіїв на активність ферменту визначався за залишковою літичною активністю – порівнювався відсоток лізису тест-культури ферментом та комплексом фермент–носій.

Іммобілізацію проводили, вносячи відповідний носій (5 %) у розчин ферментного препарату (40 мг/мл), перемішуючи на магнітній мішалці протягом 30–60 хв при температурі 20–25 °С з наступним відділенням центрифугуванням протягом 20 хв при 5000 об/хв та висушуванням препаратів контактним способом при 30 °С [9, 10].

Дослідження зразків препаратів проводились спектральним методом у сумішах твердої речовини з інертним наповнювачем, що не поглинає в ІЧ-частині (бромідом калію). Спектри

зразків реєструвалися в таблетках з КВг методом ІЧ-спектроскопії на спектрометрі Tensor-37 (“Bruker”, Німеччина).

### Результати та їх обговорення

Як свідчать експериментальні дані (таблиця), найвища активність всіх отриманих іммобілізованих ферментних препаратів спостерігається по відношенню до клітин *L. bulgaricus*, нижча (прогнозовано) – по відношенню до *E. coli*, що пояснюється особливостями клітинної оболонки грамнегативних мікроорганізмів.

Очевидно, що процес іммобілізації загалом призводить до зниження активності ферментного препарату в середньому на 35–40 %, що особливо відчутно по відношенню до стафілококу. Так, порівнюючи залишкову стафілолітичну активність іммобілізованого на різних носіях ферменту з контролем (нативним ферментом), можна відзначити її втрату на рівні 50–60 %.

Поліоксиетилен як носій виявляє мінімальний негативний вплив на фермент. Залишкова лактолітична активність іммобілізованого на ПОЕ ферменту становить 85 %, а здатність до руйнування грамнегативних клітин знижується на 35 %. Однак залишкова стафілолітична активність даного препарату знаходиться на рівні інших і становить близько 40 %. При цьому слід відзначити, що процес іммобілізації з використанням ПОЕ супроводжувався певними труднощами, а саме тривалим розчиненням носія, утворенням неоднорідної реакційної суміші тощо.

Препарати, отримані на основі ПВС і ПАА поряд із досить високою залишковою стафілолітичною та лактолітичною активністю, характеризувалися мінімальною здатністю до руйнування клітин кишкової палички (10–15 % від контролю).

Поліетиленгліколь і аеросил можна віднести до носіїв, що мають стабільний вияв впливу на досліджуваний ферментний препарат та призводять до зберігання 45–60 % його активності відносно застосованих тест-культур. Вказана тенденція свідчить про те, що активність даних ім-

мобілізованих ферментних препаратів щодо інших мікроорганізмів може бути на такому ж рівні.

Залишкова активність іммобілізованих препаратів на основі ПОЕ, ПЕГ та аеросилу знаходиться на рівні 50–70 %, що є прийнятним показником ефективності при розробці аналогічних препаратів, особливо зважаючи на функціональні властивості власне самих носіїв [11, 12].

Для вибору носія, що буде використовуватись у подальшій розробці, досліджували механізми іммобілізації Циторецифену на вказаних речовинах. Для цього проводили спектральний аналіз іммобілізованих препаратів, а також самого ферментного препарату та носіїв.

Методом ІЧ-спектроскопії на спектрометрі Tensor-37 в таблетках з КВг були зареєстровані спектри зразків Циторецифену (рис. 1), носіїв та іммобілізованого на них ферменту відповідно поліетиленгліколя (рис. 2), поліоксиетилену ПОЕ (рис. 4) та аеросилу (рис. 5).

Оскільки всі ферменти належать до білкових сполук, їх ІЧ-спектри при змищенні смуг ототожнювали із спектрами білків, в яких основними характеристичними смугами є смуги пептидної групи (–CONH–). Відповідно до особливостей будови самої пептидної групи вказані смуги ІЧ-поглинання дуже інтенсивні та чітко проявляються в спектрах [13].

В ІЧ-спектрі ферменту (див. рис. 1) можна досить чітко ототожнити смуги, пов'язані з коливаннями пептидної групи. Смуга  $1646\text{ см}^{-1}$  в спектрі ферменту належить до валентних коливань пептидної групи  $\text{C}=\text{O}$  в групі (CONH) (так звана смуга Амід I). Смуга  $1543\text{ см}^{-1}$  належить до деформаційних коливань груп NH (Амід II). В області  $3300\text{--}3400\text{ см}^{-1}$  знаходиться складна інтенсивна смуга валентних коливань NH-груп, введених у водневий зв'язок. Інтенсивна смуга при  $1074\text{ см}^{-1}$  у ферменті пов'язана з коливаннями групи (C–O–C), а смуга  $1236\text{ см}^{-1}$  може бути віднесена до смуги Амід III (зумовлена деформаційними коливаннями –NH-групи) [14].

Таблиця. Визначення літичної активності ферментних препаратів, іммобілізованих на різних носіях

Тест-культура	Літична активність, од/мл						
	Поліоксиетилен	Поліетиленгліколь	Аеросил	Полівініловий спирт	Метилцелюлоза	Поліакриламід	Контроль
<i>L. bulgaricus</i>	$570 \pm 7$	$350 \pm 7$	$370 \pm 7$	$320 \pm 6$	$360 \pm 8$	$250 \pm 7$	$680 \pm 14$
<i>S. aureus</i>	$230 \pm 5$	$250 \pm 3$	$250 \pm 3$	$290 \pm 5$	$210 \pm 6$	$270 \pm 10$	$770 \pm 19$
<i>E. coli</i>	$240 \pm 4$	$150 \pm 3$	$140 \pm 6$	$60 \pm 3$	$120 \pm 4$	$50 \pm 2$	$380 \pm 8$

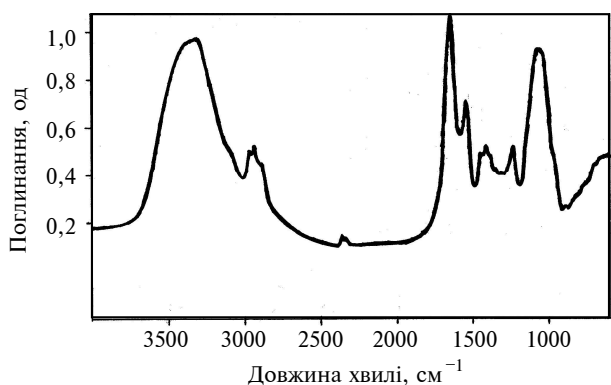


Рис. 1. Спектральна характеристика ферментного препарату Циторецифен

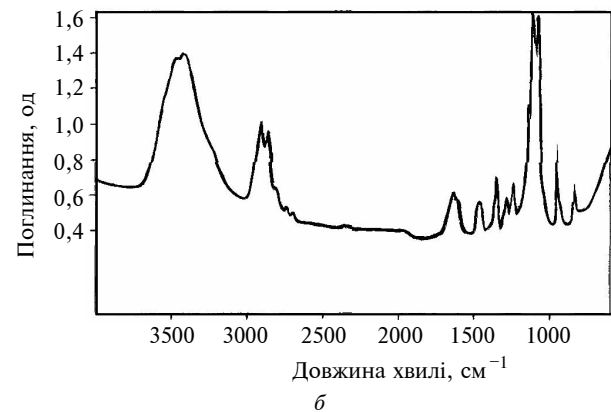
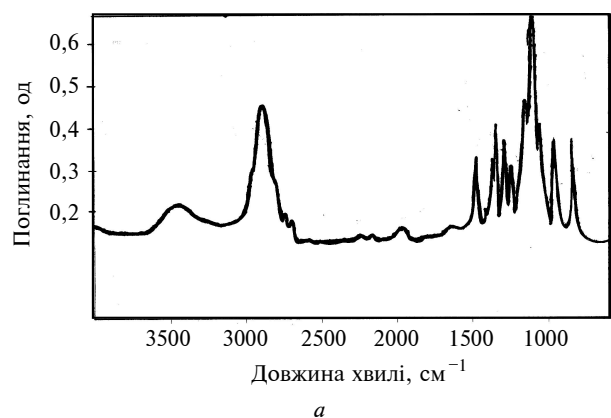


Рис. 2. Спектральні характеристики: *a* – поліетиленгліколь; *б* – іммобілізований на поліетиленгліколі Циторецифен

На рис. 2 наведено спектри поліетиленгліколя та іммобілізованого на ньому ферменту, який є суперпозицією двох спектрів – ферменту (див. рис. 1) і полімеру. У спектрі іммобілізованого ферменту (рис. 2, *б*) є видимою смуга ферменту при  $1637\text{ см}^{-1}$  (Амід I), яка зміщена в низькочастотну область спектра на  $9\text{--}10\text{ см}^{-1}$  по відношенню до спектра чистого ферменту (див. рис. 1). У спектрі полімеру також спосте-

рігається незначний зсув смуги валентних коливань групи простого ефіру (C–O–C): у спектрі ПЕГ – це смуга  $1149\text{ см}^{-1}$ , а в іммобілізованому зразку – смуга  $1140\text{ см}^{-1}$ . Також зміщена смуга  $842\text{ см}^{-1}$  до  $840\text{ см}^{-1}$ . Такі зміни в спектрі пов'язані із зміною структури матриці (полімеру) як результат взаємодії з ферментом.

Таким чином, іммобілізація ферменту на ПЕГ здійснюється за рахунок міжмолекулярної взаємодії пептидних груп ферменту і простої ефірної групи ПЕГ з утворенням водневого зв'язку по типу рис. 3.

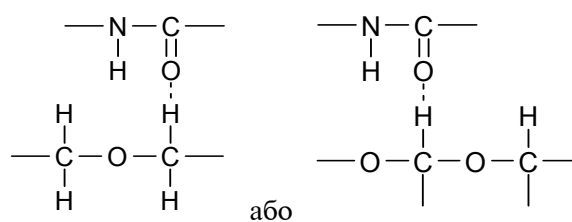


Рис. 3. Схема взаємодії ферменту та ПЕГ

Аналізуючи отримані спектри, слід зазначити, що в усіх зразках прописуються також смуги, зумовлені коливаннями гідроксильних груп залишків зв'язаної води. У зразках ферменту спостерігаються смуги деформаційних коливань OH-груп при  $1645\text{ см}^{-1}$  і в області валентних коливань – смуги при  $3450\text{--}3400\text{ см}^{-1}$ . За своїм положенням вони відповідають смугам OH-груп води, що бере участь в утворенні водневого зв'язку. Оскільки вказані смуги ІЧ-поглинання перекриваються за своїм положенням з характеристичними смугами в спектрі самого ферменту, то це ускладнює аналіз отриманих спектрів.

На рис. 4 наведено спектри поліоксиетилену та іммобілізованого на ньому ферменту. Спектр ПОЕ за положенням смуг і розподілу їх інтенсивності відповідає ІЧ-спектру ПОЕ [9]. Інтенсивні характеристичні смуги в спектрі полімеру зв'язані переважно з наявністю простого ефірного зв'язку ( $1149\text{ см}^{-1}$ ) і  $\text{—CH}_2\text{—}$  груп ( $2889\text{ см}^{-1}$ ).

Аналіз спектра іммобілізованого ферменту дозволяє виявити додаткові смуги:  $1637\text{ см}^{-1}$  і  $3418\text{ см}^{-1}$ , що ідентифікують пептидні групи ферменту і гідроксильні групи залишків води. У спектрі спостерігається незначний зсув смуг валентних коливань груп простого ефіру (C–O–C): у спектрі ПОЕ – це смуга  $1149\text{ см}^{-1}$ , а в іммобілізованому ферменті – смуга  $1146\text{ см}^{-1}$ . Такі зміни, очевидно, пов'язані з проявами міжмолекулярних взаємодій між пептидною гру-

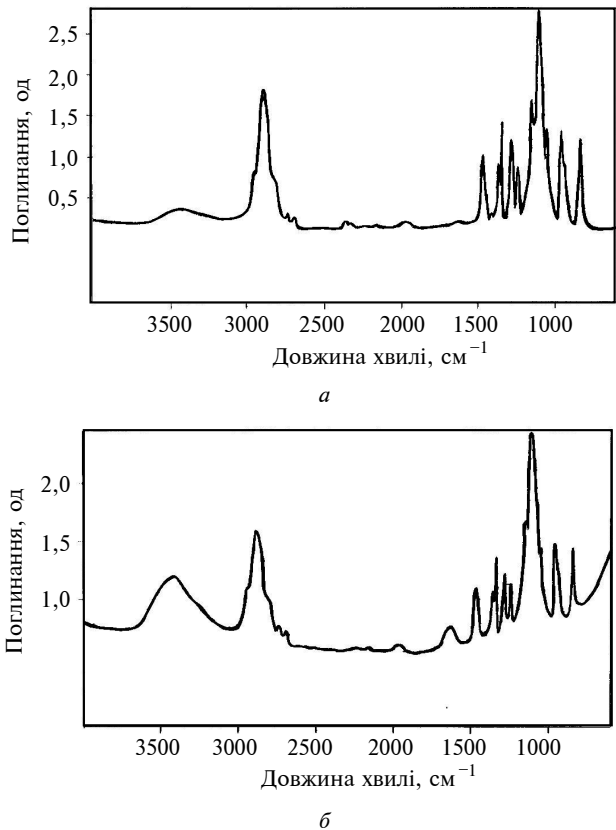


Рис. 4. Спектральні характеристики: *a* – поліоксиетилен; *б* – іммобілізований на поліоксиетилени Циторецифен

пою ферменту і простою ефірною групою ПОЕ. Схематично такий зв'язок можна зобразити аналогічно, як і у випадку взаємодії з ПЕГ (див. рис. 5).

Розглядаючи спектри аеросилу та іммобілізованого на ньому ферменту (див. рис. 5), можна побачити певні відмінності в розташуванні та наявності деяких характеристичних смуг (відносно ПОЕ і ПЕГ). Так, при суперпозиції смуги, характерної для аеросилу при  $1107\text{ см}^{-1}$  та ферменту  $1074\text{ см}^{-1}$ , визначаються валентні коливання при  $1110\text{ см}^{-1}$ . На спектрі іммобілізованого ферменту практично відсутні смуги нативного (чистого) ферменту при  $3309\text{ см}^{-1}$  (див. рис. 1) і  $1646\text{ см}^{-1}$ , що характеризують аміногрупу і пептидну, відповідно.

Оскільки іммобілізований на аеросилі фермент виявляє активність приблизно на такому ж рівні, як і іммобілізований на ПЕГ (див. таблицю), а отже, кількість ферменту в препаратах є близькою, то, очевидно, відбувається зв'язування вказаних груп ферменту в такий спосіб, що блокує їх ідентифікацію при спектральному дослідженні, або ж закріплення ферменту здійснюється за багатоцентровим механізмом.

Білкові молекули можуть адсорбуватися на аеросилі внаслідок утворення ними водневих зв'язків із силанольними групами поверхні кремнезему. Наявність на білковій молекулі великої кількості центрів, здатних утворювати водневі зв'язки з ОН-групами аеросилу, значно посилює адсорбцію.

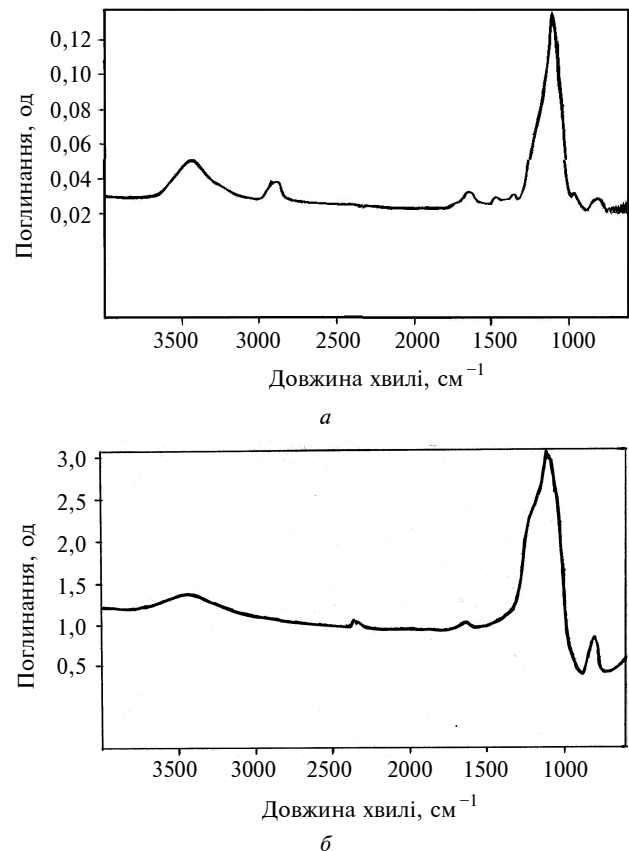


Рис. 5. Спектральні характеристики: *a* – аеросил; *б* – іммобілізований на аеросилі Циторецифен

У зв'язку з багатокомпонентністю ферментного комплексу може також виникнути явище конкурентної адсорбції [15], яка пов'язана з різними молекулярними масами компонентів комплексу, внаслідок чого в першу чергу адсорбуються ферменти певної конформації з більшою кількістю реакційних груп на поверхні.

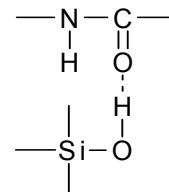


Рис. 6. Схема міжмолекулярних водневих зв'язків аеросилу та ферменту



Завдяки наявності заряду в білкових молекулах, виникають електростатичні взаємодії між поверхнею носія та ферментом. Вказані взаємодії можуть виявляти як позитивну, так і негативну дію на адсорбцію біомолекул. За одним із вірогідних механізмів адсорбції виникає додаткова рушійна сила, пов'язана із структурними змінами білкової молекули, що може подолати негативні впливи електростатичного відштовхування. Можна припустити, що активні групи на поверхні аеросилу беруть участь в утворенні міжмолекулярних водневих зв'язків з молекулами ферменту за схемою рис. 6.

Поява смуги в області  $3437\text{ см}^{-1}$ , за літературними даними, ідентифікує гідроксильні групи та вказує на взаємодію аеросилу і ферменту по ОН-групах, в якій беруть участь, очевидно, й залишки зв'язаної з ферментом води (рис. 7).

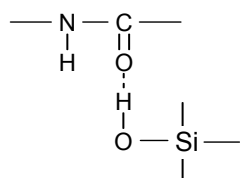


Рис. 7. Схема міжмолекулярних зв'язків аеросилу та ферменту по ОН-групах

Таким чином, спектральне дослідження іммобілізованих зразків вказує на те, що механізми взаємодії ферменту з аеросилом є різноманітнішими, а наявність великої кількості гідроксильних груп на його поверхні зумовлює утворення більшої кількості водневих зв'язків. Вказані факти визначають загалом вищу міцність іммобілізації ферменту на аеросилі порівняно з ПЕГ та ПОЕ.

### Висновки

1. Основними механізмами іммобілізації ензимного комплексу Циторецифен на поліетиленгліколі, поліоксиетилені та аеросилі є утворення водневих зв'язків, електростатичні та багатоцентрові взаємодії.

2. Перевага аеросилу як носія для створення готової форми іммобілізованого препарату Циторецифен зумовлена утворенням ним додатково водневих зв'язків із силанольними групами та багатьма ОН-групами поверхні кремнезему, за участю, очевидно, й залишків зв'язаної з ферментом води. Це визначає загалом вищу міцність іммобілізації ферменту на аеросилі та можливість використання вказаного носія при розробці технології препарату.

Т.С. Тодосійчук, Г.Я. Менжерес, В.Л. Чумак,  
М.А. Григорьева

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭНЗИМНОГО КОМПЛЕКСА ЦИТОРЕЦИФЕН С НОСИТЕЛЯМИ РАЗНОЙ ПРИРОДЫ

Исследованы физико-химические особенности иммобилизации ферментного препарата Циторецифен адсорбционным методом на носителях различной природы: аеросиле, метилцеллюлозе, полиэтиленгликоле, полиоксиэтилене, поливиниловом спирте, а также полиакриламиде. Проведено спектральное исследование образцов, иммобилизованных на аеросиле, полиэтиленгликоле, а также полиоксиэтилене, и установлены основные механизмы закрепления исследуемого энзимного комплекса на данных носителях – образование водородных связей, электростатические и многоцентровые взаимодействия. Определены преимущества аеросила как носителя энзимного комплекса по сравнению с другими исследуемыми веществами для создания эффективного противомикробного препарата поверхностного действия.

T.S. Todosiychuk, G.Ya. Mengeres, V.L. Chumak,  
M.A. Grygorieva

PHYSICAL AND CHEMICAL ASPECTS OF COOPERATION OF ENZYME COMPLEX CYTORECIFFEN WITH THE TRANSMITTERS OF DIFFERENT NATURE

By utilizing the adsorptive method on transmitters of different nature: silica, methylcellulose, polyethyleneglycole, polyoxyethylene, polyvinyl alcohol and polyacrylamide, we study physical and chemical properties of immobilization of the enzymatic preparation Cytocefifen. We perform the spectrum research of the samples immobilized on silica, polyethylene glycol and polyoxyethylene. We also determine the principal fixing mechanisms of enzymatic complex under study on the following transmitters: hydrogen relationships formation, electrostatic and polycentric interactions. In addition, we describe the silica advantages as the enzymatic complex transmitter in comparison with other substances to create the effective antimicrobial preparation for the surface action.

1. Григор'єва М.А. Імобілізація ферментів як спосіб отримання ефективних біопрепаратів для практичного застосування // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2008. – № 1. – С. 97–107.
2. Тодосійчук Т.С., Григор'єва М.А. Дослідження взаємного впливу гідролітичних ферментів у складі багатокомпонентних препаратів // II Міжнар. наук.-техн. конф. студентів і аспірантів та молодих вчених "Хімія і сучасні технології". – Дніпропетровськ, 2005. – С. 309.
3. Зайцева Е.А., Осипова Т.А. Развитие биокаталитических технологий в Московском университете и некоторых научно-исследовательских институтах России в начале XXI века // Вест. Москов. ун-та. Сер. 2. Химия. – 2002. – 43, № 6. – С. 340–344.
4. Ющенко В.А., Зингер Г.Е., Ирлинская Н.И. и др. Состояние и перспективы использования ферментов для синтетических моющих средств // Биосинтез ферментов микроорганизмами: Тез. докл. IV Всесоюз. конф., Ташкент, 19–22 сент. 1988. – Ташкент, 1988. – С. 170–171.
5. Тодосійчук Т.С. Розробка технології гідролітичного ферментного препарату Циторецифен: Автореф. дис. ... канд. техн. наук. – К., 2000. – 25 с.
6. Воробьева О.В. Биосорбенты для иммобилизации белковых комплексов ферментных препаратов // Биотехнология. – 2004. – № 2. – С. 70–75.
7. Дудинова И.О. Иммобилизации щелочной протеазы и  $\beta$ -галактозидазы на полимерных носителях: Дис. ... канд. техн. наук: 02.00.10. – К., 1995. – 172 с.
8. Павлова И.Н., Жолнер Л.Г., Захарова И.Я. и др. Серинная протеиназа с литическими свойствами // Микробиология. – 1988. – 57, № 3. – С. 398–404.
9. Григор'єва М.А., Ключко В.В., Тодосійчук Т.С. Оптимізація складу поживного середовища для біосинтезу ферментного комплексу продуцентом р. *Streptomyces* // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2008. – № 3. – С. 111–118.
10. Кельцев Н.В. Основы адсорбционной техники. – М.: Химия, 1984. – 280 с.
11. Геращенко И.И., Штатко Е.И., Бондарчук О.И. и др. Особенности взаимодействия микроорганизмов и ферментов с высокодисперсным кремнеземом // Медицинская химия. – 2003. – 7, № 8. – 153–167.
12. Курищук К.В., Пентюк О.О., Погорелий В.К. Энтеросорбент Силікс: властивості та клінічне застосування. – К.: Інститут хімії поверхні НАН України, 2003. – 21 с.
13. Крищенко В.П. Ближняя инфракрасная спектроскопия / Науч.-метод. центр по инфракрасной спектроскопии, АО "Интерагротех". – М.: Крон, 1997. – 638 с.
14. Еришов А.В., Машин А.И., Касьянов Д.Е. Инфракрасная спектроскопия аморфного кремния: Физика аморфных полупроводников. – Нижний Новгород: ННГУ им. Н.И. Лобачевского, 2001. – 24 с.
15. Гунько В.М. Конкурентная адсорбция // Теоретическая и экспериментальная химия. – 2007. – 43, № 3. – С. 133–169.

Рекомендована Радою  
факультету біотехнології і біотехніки  
НТУУ "КПІ"

Надійшла до редакції  
19 березня 2009 року