

УДК 547.96:544.77.022

## ВЛИЯНИЕ СПОСОБА СИНТЕЗА НАНОКОМПЛЕКСОВ НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ХИМОТРИПСИНА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА НАНОЧАСТИЦАХ СЕРЕБРА

© 2019 г. А. В. Плющенко<sup>1,2</sup>, Л. Н. Боровикова<sup>1</sup>, О. А. Писарев<sup>1,2</sup>, \*

<sup>1</sup>Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, 199004 Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 19251 Россия

\*e-mail: chrom79@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.01.2019 г.

После доработки 20.03.2019 г.

Принята к публикации 22.04.2019 г.

На основе реакции восстановления азотнокислого серебра боргидридом натрия разработаны два способа синтеза гибридных органо-неорганических наноконплексов, включающих химотрипсин и наночастицы серебра. Согласно первому способу синтеза фермент добавляли в реакционную среду одновременно с другими реагентами, а второму – его добавляли в реакционную среду через определенные промежутки времени после начала реакции восстановления. Химотрипсин, иммобилизованный в составе наноконплексов, стабилизировал наночастицы серебра. Полученный обоими способами иммобилизованный фермент обладал повышенной по сравнению с нативным ферментом протеолитической активностью и в кислой и в сильно щелочной среде. При этом химотрипсин, иммобилизованный на наночастицах серебра вторым способом синтеза, обладал наибольшей активностью.

*Ключевые слова:* синтез наноконплексов, иммобилизация ферментов, химотрипсин, наночастицы серебра

DOI: 10.1134/S055510991905009X

Физико-химические условия, в которых используются ферменты в медицине и различных биотехнологических процессах, нередко оказываются неоптимальными для их функционирования, что приводит к значительному снижению их ферментативной активности. В связи с этим разработка новых методов иммобилизации ферментов, способствующих сохранению их активности при неоптимальных условиях среды, относится к одной из важнейших задач современной биотехнологии.

В настоящее время большое внимание уделяется исследованиям, связанным с разработкой методов иммобилизации ферментов на неорганических наночастицах. Это обусловлено двумя обстоятельствами. Во-первых, такой подход приводит к реализации многоточечного взаимодействия фермента с наночастицами, что повышает его температурную и рН стабильность и длительность хранения. Во-вторых, вследствие отсутствия стерических препятствий диффузионный транспорт субстрата к активному центру иммобилизованного фермента существенно “облегчается” (в отличие от иммобилизации ферментов на полимерах), что во многих случаях приводит к увеличению его ферментативной активности [1–3]. Ис-

пользование в качестве носителей наночастиц, обладающих также биологической активностью, позволяет создавать полифункциональные органо-неорганические наноконплексы, в которых каждая составляющая обеспечивает различную биологическую активность [4, 5].

Наночастицы серебра (Ag) обладают антибактериальными, а также уникальными физическими и электрическими свойствами [6, 7]. Наноконплексы на основе химотрипсина (ХТ) и наночастиц Ag, сочетающие протеолитические и бактерицидные свойства, способны стать основой полифункциональных лекарственных препаратов для лечения ран, ожогов и других воспалительных процессов [5].

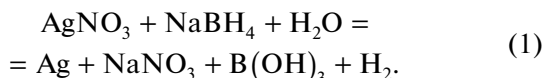
Цель работы – синтез и изучение размерных свойств наноконплексов, включающих ХТ и наночастицы Ag, а также изучение протеолитической активности иммобилизованного ХТ.

### МЕТОДИКА

В работе использовали  $\alpha$ -химотрипсин (КФ 3.4.21.1, “AppliChem”, Германия), казеинат натрия (“ООО Бригантина”, Россия), нитрат серебра, боргидрид натрия, трихлоруксусную кис-

лоту, гидроксид натрия, уксусную, ортофосфорную и борную кислоты и тирозин (“Вектон”, Россия).

Иммобилизация ХТ на наночастицах Ag осуществлялась путем введения фермента в реакцию восстановления (1) азотнокислого серебра ( $\text{AgNO}_3$ ) боргидридом натрия ( $\text{NaBH}_4$ ) с образованием коллоидного Ag.



Эта реакция осуществлялась в водной среде при атмосферном давлении,  $4^\circ\text{C}$  и 24-кратном (относительно эквимольного) избытке  $\text{NaBH}_4$ . Величины концентраций Ag ( $C_{\text{Ag}}$ ) и ХТ ( $C_{\text{ХТ}}$ ) составляли 0.1 и 2 мг/мл соответственно.

В качестве восстановителя был выбран  $\text{NaBH}_4$ , поскольку при его значительном избытке можно получить наночастицы размером меньше 50 нм вследствие большой разницы редокс-потенциалов восстановителя ( $-1.24\text{ В}$ , в щелочной среде) и Ag ( $0.8\text{ В}$ ). Такого размера стабилизированные наночастицы Ag нетоксичны и обладают высокой бактерицидной активностью [8], а иммобилизованный ХТ одновременно выполнял функцию стабилизатора наночастиц Ag в растворе.

Были изучены два способа образования наноконплексов (рис. 1):

а) ХТ добавляли в реакционную среду одновременно с другими реагентами (метод иммобилизации I, **Ag-ХТ-I**);

б) ХТ добавляли в реакционную среду через определенные промежутки времени после начала реакции синтеза (метод иммобилизации II, **Ag-ХТ-II**).

Значения pH растворов измеряли на pH-метре pH-673М (“Измерительная техника”, Россия), а их оптическую плотность определяли в кварцевых кюветах ( $1 \times 1\text{ см}$ ) в диапазоне от 220 до 800 нм на спектрофотометре Specord M-40 (“Carl Zeiss”, Германия).

Эффективные гидродинамические радиусы ( $R_h$ ) наноструктур определяли методом динамического рассеяния света (ДРС) [9]. Корреляционную функцию интенсивности рассеянного света получали с помощью коррелятора Photocor-FC с числом каналов 288 (“ООО Фотокор”, Россия). Анализ корреляционной функции осуществляли с помощью программы обработки данных DLS Dynals (“Гелиос”, Россия).

Протеолитическую активность ХТ определяли согласно ГОСТ 20264.2-88. Гидролиз казеината натрия, который использовался в качестве белкового субстрата, осуществляли при  $37^\circ\text{C}$ . Раствор казеината натрия готовили путем его растворения

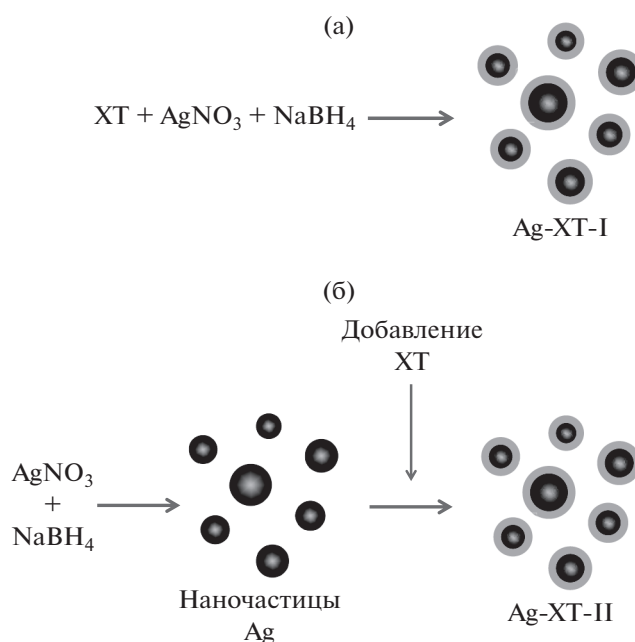


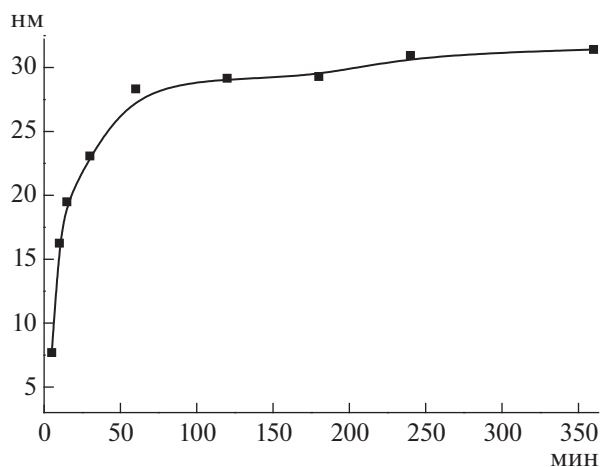
Рис. 1. Схема синтеза наноконплексов Ag-ХТ-I (а) и Ag-ХТ-II (б).

в универсальном буфере с заданным значением pH. Для приготовления универсального буферного раствора использовали 0.1 н. уксусную, ортофосфорную и борную кислоты, которые смешивали в равных объемных соотношениях. Значение pH раствора изменялось добавлением различного количества 1 н.  $\text{NaOH}$ . Для осуществления гидролиза в 68 мл раствора субстрата ( $C = 10\text{ мг/мл}$ ) вносили 3.4 мл раствора нативного ХТ ( $C_{\text{ХТ}} = 2\text{ мг/мл}$ ), либо наноконплекса ( $C_{\text{ХТ}} = 2\text{ мг/мл}$ ). Через определенные промежутки времени из реакционной смеси отбирали по 2 мл, добавляли 3 мл 0.5 н трихлоруксусной кислоты для остановки гидролиза. В качестве контроля использовали 2 мл раствора казеината натрия. Затем выпавший осадок отфильтровывали и измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости при 280 нм. Концентрацию прогидролизованного белка определяли, используя калибровочную кривую, полученную для тирозина.

За единицу активности (ед.) принимали количество фермента, необходимое для высвобождения 1 мкмоль тирозина в мин в условиях эксперимента. Активность фермента рассчитывалась по формуле:

$$A = \frac{PV}{t},$$

где  $A$  – активность фермента, мкмоль  $\text{мин}^{-1}$ ,  $P$  – концентрация продукта реакции, мкмоль  $\text{л}^{-1}$ ,  $t$  – время реакции, мин.



**Рис. 2.** Зависимость среднего гидродинамического радиуса наноконкомплексов Ag-ХТ-II от времени введения ХТ в реакционную смесь после начала реакции синтеза наночастиц Ag.

Удельную активность рассчитывали как число единиц активности на 1 мг фермента:

$$A_{\text{удел}} = \frac{A}{m},$$

где  $A_{\text{удел}}$  — удельная активность фермента, ед. мг<sup>-1</sup>,  
 $m$  — масса фермента, мг.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что оптимальные условия для действия нативного ХТ рН ~8.0, фермент быстро теряет свою активность при рН ниже 7.0 и выше 9.0 [10]. В связи с этим было проведено изучение протеолитической активности наноконкомплексов ХТ с наночастицами Ag при значениях рН, равных 6.0, 8.0 и 11.0.

Размеры наноконкомплексов Ag-ХТ-I (рис. 1а), определенные методом просвечивающей электронной микроскопии, находились в диапазоне от 2 до 5 нм [11]. Для получения более крупных стабилизированных наночастиц ХТ добавляли в реакционную среду через определенные проме-

жутки времени после начала реакции синтеза (Ag-ХТ-II, рис. 1б).

На рис. 2 представлена зависимость среднего гидродинамического радиуса наноконкомплексов Ag-ХТ-II от времени введения ХТ в реакционную смесь после начала реакции синтеза наночастиц Ag. При добавлении ХТ в реакционную смесь после небольшого промежутка времени (10–25 мин) наблюдался постепенный рост размеров наноконкомплексов Ag-ХТ-II. Можно предположить, что введение ХТ в реакционную смесь на ранних этапах синтеза, когда окислительно-восстановительная реакция не завершена, способствовало стабилизации не полностью сформировавшихся наночастиц Ag. Вместе с тем, при дальнейшем увеличении продолжительности реакции синтеза наночастиц Ag до добавления ХТ (более 1 ч) не наблюдалось значительного изменения размеров образующихся наноконкомплексов. По-видимому, в этом случае введение ХТ в реакцию восстановления приводило к предотвращению возможной агрегации наночастиц.

В связи с этим, была изучена протеолитическая активность наноконкомплексов Ag-ХТ-I и Ag-ХТ-II, которые были получены путем введения ХТ в реакцию синтеза через 1 ч после начала реакции.

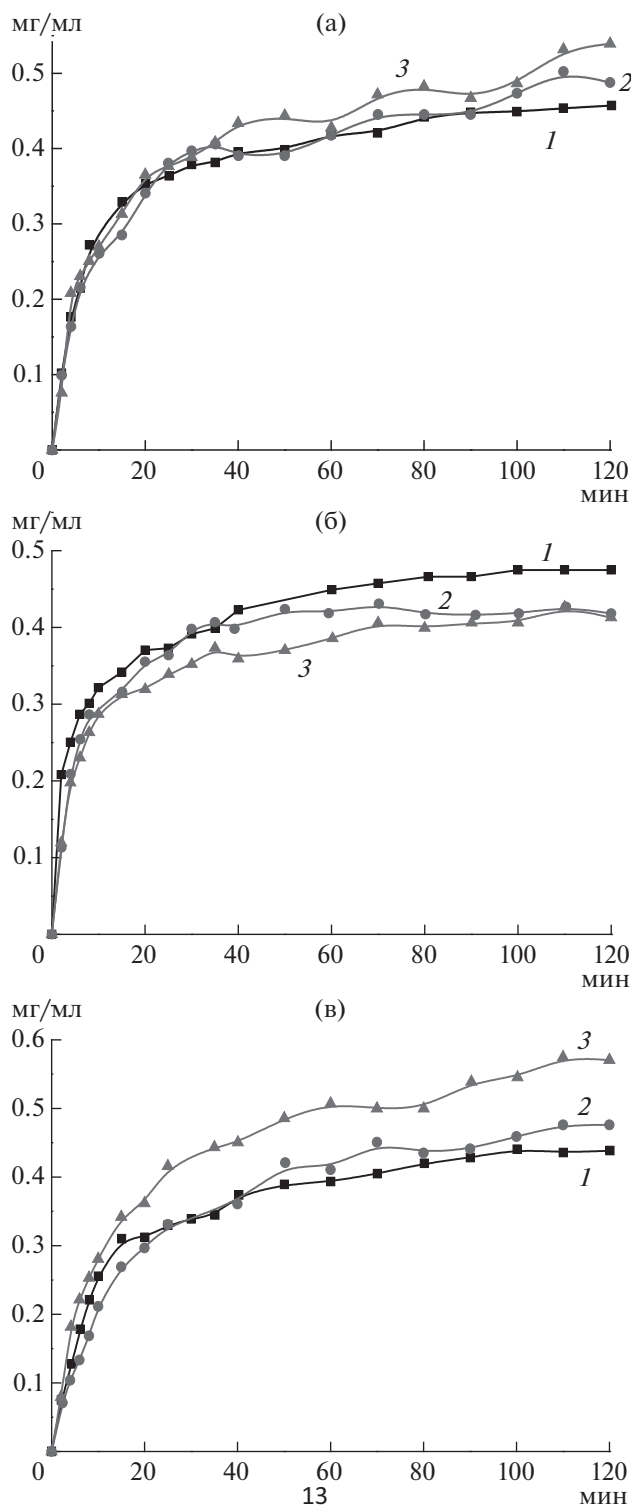
В табл. 1 представлены значения удельных протеолитических активностей нативного ХТ и наноконкомплексов Ag-ХТ-I и Ag-ХТ-II при рН 6.0, 8.0 и 11.0. Видно, что при рН 8.0 наибольшую активность проявлял нативный ХТ (3.45 ед. мг<sup>-1</sup>), превышая удельную активность наноконкомплексов Ag-ХТ-I и Ag-ХТ-II на ~17 и ~21% соответственно. Однако при рН 6.0 и 11.0 наибольшей активностью обладал наноконкомплекс Ag-ХТ-II. Так, его удельная активность превышала как активность ХТ, так и наноконкомплекс Ag-ХТ-I, при рН 6.0 на ~17 и ~25% соответственно, а при рН 11.0 — на ~33 и ~41% соответственно.

Однако, значения удельной активности фермента, определяемые на начальном этапе реакции в условиях избытка субстрата, не описывали полностью картину изучаемых процессов. В связи с этим была изучена кинетика накопления продукта ферментативной реакции для нативного и иммобилизованных ферментов (рис. 3а, 3б, 3в). На диаграмме (рис. 4) представлены суммарные данные по влиянию рН на максимальное количество продуктов реакций гидролиза.

При рН 8.0 конечное содержание продукта реакции гидролиза субстрата при использовании нативного фермента превышало эту величину для наноконкомплекс на ~13% вне зависимости от метода синтеза. Следовательно, иммобилизация ХТ на наночастицах Ag значительно не снижала его ферментативной активности при рН 8.0. При этом максимальное количество продукта реакции наблюдалось после ~30 мин гидролиза наноконкомплекс

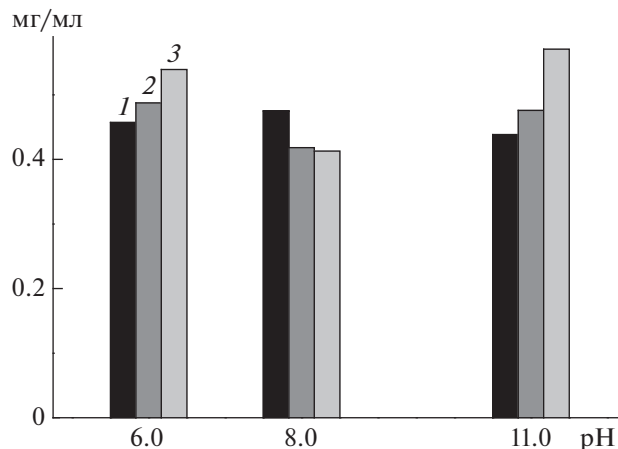
**Таблица 1.** Влияние рН на удельную протеолитическую активность нативного ХТ и наноконкомплекс

Образец	$A_{\text{удел}}$ , ед. мг <sup>-1</sup>		
	рН 6.0	рН 8.0	рН 11.0
ХТ	2.40	3.45	1.62
Ag-ХТ-I	2.22	2.87	1.43
Ag-ХТ-II	2.87	2.73	2.42



**Рис. 3.** Влияние способа синтеза наноконкомплексов Ag-ХТ на кинетику накопления продукта реакции гидролиза, катализируемой ХТ (1), Ag-ХТ-I (2) и Ag-ХТ-II (3), при рН 6.0 (а), 8.0 (б) и 11.0 (в).

сом Ag-ХТ-I, и после ~70 мин – наноконкомплексом Ag-ХТ-II. Таким образом, при рН 8.0 реакция гидролиза ферментом, иммобилизованным на наноча-



**Рис. 4.** Зависимость от рН максимальной концентрации продукта реакции гидролиза казеината натрия, катализируемой ХТ (1) и наноконкомплексами Ag-ХТ-I (2) и Ag-ХТ-II (3).

стицах Ag меньшего размера (Ag-ХТ-I), протекала быстрее, чем при его иммобилизации на более крупных наночастицах (Ag-ХТ-II).

При рН 6.0 и 11.0 наблюдалось повышение конечного содержания продукта реакции гидролиза при использовании наноконкомплекс по сравнению с нативным ХТ (рис. 4). При этом наивысшую протеолитическую активность проявлял наноконкомплекс Ag-ХТ-II. Так, конечное содержание продукта реакции, катализируемой этим наноконкомплексом, повышалось при рН 6.0 по сравнению с нативным ХТ на ~15%, а наноконкомплексом Ag-ХТ-I – на ~10%, а при рН 11.0 – по сравнению с нативным ХТ – на ~23%, а наноконкомплексом Ag-ХТ-I – на ~17%.

В щелочной среде эффект повышения по сравнению с нативным ХТ протеолитической активности фермента, иммобилизованного на наночастицах, наблюдался и при его иммобилизации на наночастицах селена [3]. Отметим также, что протеолитическая активность наноконкомплекса Ag-ХТ-II при рН 6.0 и 11.0 увеличивалась и по сравнению с наноконкомплексом Ag-ХТ-I.

Таким образом, иммобилизация ХТ на наночастицах Ag повышала его протеолитическую активность в кислой и сильно щелочной среде, то есть в неоптимальных условиях функционирования нативного фермента.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Arsalan A., Younus H.* // Int. J. Biol. Macromol. 2018. V. 118. № 11. P. 1833–1847.
2. *Zewde B., Ambaye A., Stubbs J. III., Dharmara R.* // Nanotechnol. Nanomed. 2016. V. 4. № 2. P. 1043–1056.
3. *Плющенко А.В., Боровикова Л.Н., Писарев О.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 4. С. 362–365.

4. *Walper S.A., Turner K.B., Medinz I.L.* // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015. V. 34. № 1. P. 232–241.
5. *Писарев О.А., Титова А.В., Боровикова Л.Н., Кипнер А.И., Ворошилова Т.М., Панарин Е.Ф.* // *Изв. Акад. наук. Сер. хим.* 2016. Т. 64. № 3. С. 790–794.
6. *Bhosale M.A., Bhanage B.M.* // *Curr. Org. Chem.* 2015. V. 19. № 8. P. 708–727.
7. *Терентьева Е.А., Аняри В.В., Кочук Е.В., Дмитриенко С.Г., Золотов Ю.А.* // *Журн. аналит. химии.* 2017. Т. 72. № 11. С. 978–999.
8. *Moritz M., Geszke M.* // *Chem.Eng. Journ.* 2013. V. 226. № 2. P. 596–613.
9. *Brown W.* *Dynamic Light Scattering: the Method and Some Application.* Oxford: Clarendon Press, 1993. 617 p.
10. *Кулаков В.И., Насонова В.А., Савельев В.С.* *Системная энзимотерапия. Опыт и перспективы.* Санкт-Петербург: Интер-Медика, 2004. 264 с.
11. *Плющенко А.В., Митусова К.А., Боровикова Л.Н., Кипнер А.И., Писарев О.А.* // *Оптика и спектроскопия.* 2018. Т. 125. № 2. С. 234–239.

## The Influence of the Synthesis Method of Nanocomplexes on the Proteolytic Activity of Chymotrypsin Immobilized on Silver Nanoparticles

A. V. Plyushchenko<sup>a, b</sup>, L. N. Borovikova<sup>a</sup>, and O. A. Pisarev<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, 199004 Russian Federation*

<sup>b</sup>*Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, 195251 Russian Federation*

\**e-mail: chrom79@yandex.ru*

Received January 16, 2019; revised March 20, 2019; accepted April 22, 2019

Two methods of the synthesis of hybrid organic-inorganic nanocomplexes including chymotrypsin and silver nanoparticles were developed based on the reduction reaction of silver nitrate and sodium borohydride. According to the first synthesis method, the enzyme was added to the reaction mixture simultaneously with other reagents. In the case of the second method, the enzyme was added to the reaction mixture at certain intervals after the start of the reduction reaction. Immobilized chymotrypsin stabilized silver nanoparticles. In comparison with the native enzyme the immobilized enzyme obtained by both methods possessed increased proteolytic activity in acidic and strongly alkaline media. The highest proteolytic activity was observed for chymotrypsin immobilized on silver nanoparticles according to the second synthesis method.

*Keywords:* synthesis of nanocomplexes, immobilization of enzymes, chymotrypsin, silver nanoparticles