

ОСОБЛИВОСТІ КІНЕТИКИ ГІДРОЛІЗУ *MICROCOCCLUS LYSODEIKTICUS* ІММОБІЛІЗОВАНИМИ ФОРМАМИ ЛІЗОЦИМУ

О.В. Севастьянов, І.І. Романовська, С.С. Декіна*

Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України, Одеса, Україна

*Corresponding author: s.dekina@gmail.com

Received 15 February 2020; Accepted 13 March 2020

Проблематика. Резистентність збудників бактеріальних захворювань до антибіотиків призводить до зниження ефективності терапії інфекційних хвороб, що своєю чергою стимулює пошук, модифікацію або створення нових антибактеріальних агентів, у т.ч. лізоцим-полімерних систем. Розробка нових біотехнологічних препаратів ензиму з мукоадгезивними властивостями, антимікробною дією, у формі гелів, гідрогелевих покриттів або плівок, перспективних для використання в медицині, неможлива без розуміння функціонування лізоциму в іммобілізованому стані. Тому дослідження кінетичних особливостей гідролізу субстрату вільним та іммобілізованим лізоцимом, порівняння кінетичних параметрів різних форм ензиму є актуальним завданням.

Мета. Дослідити кінетику гідролізу клітин *Micrococcus lysodeikticus* лізоцимом, іммобілізованим у желатин, натрієву сіль карбоксиметилцелюлози та полівінілового спирту; порівняти кінетичні характеристики з параметрами вільного ензиму.

Методика реалізації. Іммобілізацію лізоциму в желатин, натрієву сіль карбоксиметилцелюлози, полівінілового спирту здійснювали методом включення в гель. Кінетичні параметри функціонування ензиму визначали за початковими швидкостями лізису клітин *M. lysodeikticus*. Результати вимірювань аналізували графічними методами Лайнуївера–Берка і Хейнса, а також розрахунковим – Корніш–Боуден–Ейзенталя.

Результати. Досліджено кінетичні особливості реакції гідролізу клітин *M. lysodeikticus* вільним та іммобілізованим лізоцимом. Показано збільшення константи Міхаеліса K_M , максимальної швидкості реакції V_{\max} і відношення K_M/V_{\max} для іммобілізованого ензиму. Тенденція збільшення значень кінетичних параметрів зберігається при використанні як графічних методів лінеаризації Лайнуївера–Берка і Хейнса, так і розрахункового – Корніш–Боуден–Ейзенталя, що проявляється в перехідній активації лізоциму. Своєю чергою зменшення $k_{\text{кат}}/K_M$ свідчить про зменшення швидкості зв'язування іммобілізованого ферменту із субстратом.

Висновки. У результаті дослідження кінетики гідролізу трьома методами показано, що дія досліджуваних полімерів (желатину, натрієвої солі карбоксиметилцелюлози і полівінілового спирту) кінетично проявляється в перехідній активації ферменту, згідно з картиною лізису пептидоглікану клітинної стінки *M. lysodeikticus*. Виявлено, що найбільшою мірою на каталітичну ефективність лізоциму впливає натрієва сіль карбоксиметилцелюлози, зменшуючи її на 37,8 %, тоді як желатин і полівініловий спирт зменшують цей показник на 31,8 і 18,8 % відповідно. Отримані результати мають фундаментальне і прикладне значення, оскільки доповнюють знання про кінетичні особливості функціонування іммобілізованих форм лізоциму, взаємодію ензиму з полімерами і дають можливість оцінити каталітичну ефективність отриманих біотехнологічних продуктів.

Ключові слова: лізоцим; кінетика; желатин; карбоксиметилцелюлоза; криогель полівінілового спирту.

Вступ

Пошук нових ефективних лікарських форм лізоциму та прагнення до відмови від антибіотикотерапії в обґрунтованих випадках визначає актуальність досліджень у галузі медичної біотехнології – іммобілізації цього ензиму з використанням мукоадгезивних полімерних матриць медичного призначення для отримання стабільних високоактивних лікарських форм (гелів, нерозчинних гідрогелевих покриттів і плівок) пролонгованої дії. Їх перевагами над розчинами

ензиму є точність дозування, підвищена біодоступність, стабільність, сайт-специфічне введення на слизову тканину, тривалість дії, зручність застосування [1–4].

Раніше нами були розроблені полімерні системи антибактеріальної дії з іммобілізованим лізоцимом у вигляді гелів [5], гідрогелевих покриттів [6] і плівок [7]. Використання для іммобілізації ензиму мукоадгезивних полімерів, а саме натрієвої солі карбоксиметилцелюлози, полівінілового спирту і желатину, сприяли закріпленню препаратів на слизових тканинах і про-

яву ензимом максимальної гідролітичної активності, збереженню антимікробних властивостей, пролонгованості терапевтичної дії та високій стабільності.

Однак на особливу увагу заслуговує вивчення каталітичних властивостей іммобілізованого ензиму, оскільки воно має важливе значення для розуміння існуючих взаємодій в ензим-полімерних системах. Природа носія, його хімічні та фізичні властивості впливають на зв'язування іммобілізованого лізоциму із субстратом або швидкість реакції і, як результат, на ефективність каталітичного процесу.

У роботі [8] лізоцим, ковалентно іммобілізований у гранули хітозану, характеризується значною зміною максимальної швидкості реакції $V_{\text{макс}}$ з 5309 до 30 од. $\text{мг}^{-1}\text{білка}$, тоді як значення константи Міхаеліса K_M не змінюється. Кінетична картина, що спостерігається, характерна для такої іммобілізації лізоциму і пояснюється нездатністю субстрату досягати активного центра ензиму після іммобілізації на твердій основі.

Іонні взаємодії ензиму з носіями не призводять до суттєвої інгібуєчої дії, така іммобілізація лізоциму в різні види карагінану свідчить про зменшення каталітичної константи для іммобілізованого ензиму залежно від концентрації носія, при цьому лізоцим вивільняється з матриці у вигляді комплексу з карагінаном. Отримані гелі з ензимом перспективні для пролонгованої трансмукозальної доставки лізоциму [9].

Метою роботи було дослідження кінетики гідролізу клітин *Micrococcus lysodeikticus* вільним лізоцимом та лізоцимом, іммобілізованим у желатин, криогель полівінілового спирту і натрієву сіль карбоксиметилцелюлози, а також порівняння їх кінетичних характеристик.

Матеріали і методи

У роботі використовували лізоцим яєчного білка (КФ 3.2.1.17) (М.м. 14,4 кДа), клітини *M. lysodeikticus* 2665 ("Sigma-Aldrich", Німеччина), кверцетин ("Sigma-Aldrich", Німеччина), хлоргексидину біглюконат (ТОВ "Фармація", Україна), желатин (РВІ, Бельгія), натрієву сіль карбоксиметилцелюлози ("Caramellosa", Бельгія), полівініловий спирт ("Sigma-Aldrich", Німеччина).

Гідролітичну активність лізоциму визначали бактеріолітичним методом у натрій-фосфат-

ному буферному розчині ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, рН 6,2, 0,1 моль/дм³), використовуючи як субстрат *M. lysodeikticus* [10]. У кювету спектрофотометра вносили 3,75 см³ розчину субстрату, прогрітого до 25 °С з 0,15 см³ розчину лізоциму, що містить 200–400 од. ензиму. Реєстрували показання спектрофотометра за довжини хвилі 450 нм на п'ятій хвилині. За одиницю активності поклали таку кількість лізоциму, що призводить до зменшення оптичної густини суспензії клітин *M. lysodeikticus* на 0,001 од. за 1 хв.

Іммобілізацію лізоциму включенням у гель натрієвої солі карбоксиметилцелюлози проводили таким чином: наважку натрієвої солі карбоксиметилцелюлози (Na-КМЦ) масою 3 г заливали дистильованою водою об'ємом 50 см³, перемішували і залишали набрякати 12 год за кімнатної температури до утворення однорідного гелю. У приготований гель вносили розчин лізоциму (50 мг у 5 см³ води, кінцева концентрація ферменту в гелі 0,5%), ретельно перемішували. Отриману суміш доводили розрахованим об'ємом дистильованої води до кінцевої концентрації Na-КМЦ 3% і ретельно перемішували для рівномірного розподілу компонентів, після чого герметично упаковували і зберігали за температури 4 °С.

Іммобілізацію лізоциму включенням у желатину і натрієвої солі карбоксиметилцелюлози проводили таким чином: до 9 см³ 10%-ного водного розчину желатину додавали 1 см³ водного розчину лізоциму в концентрації 0,1; 0,5; 1% від желатину, перемішували протягом 20 хв за температури 30 °С; потім додавали 1 см³ гліцерину і 1 см³ водного розчину Na-КМЦ у концентрації 0,5% від желатину з подальшим ретельним перемішуванням. Отриману суміш виливали на підкладку, висушували за кімнатної температури. Після висушування висікали плівки діаметром 6 мм, герметично упаковували та зберігали за температури 4 °С.

Кріоіммобілізацію лізоциму проводили таким чином: до 25 см³ 10%-ного водного розчину полівінілового спирту додавали 8,8 см³ 0,1%-ного водного розчину лізоциму при постійному перемішуванні протягом 30 хв. Для формування криогелю суміш вносили в скляні чашки Петрі площею 63,6 см² і піддавали заморожуванню за –24 °С; витримували 24 год і розморозували, з повторним циклом заморожування і розморозування згідно з [5]. У результаті отримували пружний криогель з іммобілізованим лізоцимом.

Кінетичні параметри лізоциму визначали за початковими швидкостями лізису клітин *M. lysodeikticus*. Результати вимірювань аналізували із застосуванням графічних методів Лайнуївера–Берка і Хейнса, а також розрахункового – Корніш–Боуден–Ейзенталя [11]. При використанні цього методу визначення кінетичних параметрів також проводили тест на приналежність усіх значень однієї експериментальної вибірки [12] і нормальність розподілу за асиметрією та ексцесом [13]. Активність лізоциму – 300 од/см³, концентрація клітин *M. lysodeikticus* – 7–224 мкг/см³, згідно з [14].

Результати

Для дослідження особливостей кінетики гідролізу клітин *M. lysodeikticus* лізоцимом у ході попередніх експериментів із вільним ензимом підібрали концентрацію субстрату таким чином, щоб приблизно перебувати в рекомендованому діапазоні, що охоплює обидві гілки кінетичної кривої, для більш точного визначення кінетичних параметрів ферментативної реакції [15]. Цей діапазон ($7,5 \cdot 10^{-3}$ – $4,8 \cdot 10^{-1}$ г) клітин *M. lysodeikticus* у 1 дм³ використовували в ході всіх подальших експериментів.

Кінетичні параметри функціонування лізоциму досліджували для ензиму, іммобілізованого в натрієву сіль карбоксиметилцелюлози, криогель полівінілового спирту і желатин.

Залежність швидкості ферментативної реакції гідролізу субстрату від його концентрації в координатах Лайнуївера–Берка наведено на рис. 1.

Аналогічна картина спостерігається і при лінеаризації отриманих даних методом Хейнса (рис. 2), з тією відмінністю, що зростання відношення K_M/V_{\max} проявляється в збільшенні відрізків, що відсікаються екстрапольованими прямими на осі ординат ($[S]_0/V_{\text{спост}}$).

Одержані результати підтверджуються, з наданням для кожного з кінетичних параметрів (K_M і V_{\max}) помилок визначення, розрахунковим методом Корніш–Боуден–Ейзенталя.

Виявивши і відкинувши значення, що не належать до експериментальної вибірки, згідно з [13], проаналізувавши нормальність розподілу решти вибірки за асиметрією та ексцесом, ми отримали відношення значень до їх помилок репрезентативності (тобто A/m_A і E/m_E) для константи Міхаеліса в межах $1,187 \cdot 10^{-2}$ – $1,793$ та $2,377 \cdot 10^{-1}$ – $1,693$ відповідно. Оскільки ці відношення всюди <3, то розподіл значень є нормаль-

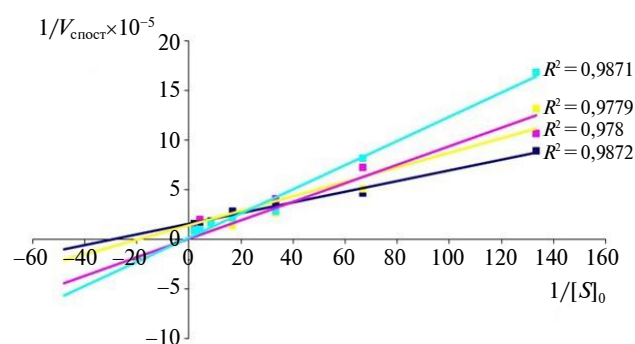


Рисунок 1: Залежність швидкості ферментативного гідролізу субстрату від його концентрації в координатах Лайнуївера–Берка: ■ – лізоцим вільний; ■ – лізоцим + желатин; ■ – лізоцим + криогель полівінілового спирту; ■ – лізоцим + натрієва сіль карбоксиметилцелюлози

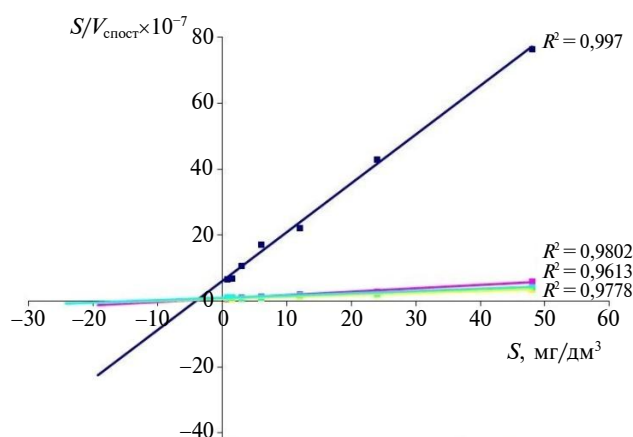


Рисунок 2: Залежність швидкості ферментативного гідролізу субстрату від його концентрації в координатах Хейнса: ■ – лізоцим вільний; ■ – лізоцим + желатин; ■ – лізоцим + криогель полівінілового спирту; ■ – лізоцим + натрієва сіль карбоксиметилцелюлози

ним (гауссовим) і його правомірно аналізувати за критерієм Стьюдента.

Значення кінетичних параметрів K_M і V_{\max} для вільного та іммобілізованого лізоциму, отримані трьома методами лінеаризації (Лайнуївера–Берка, Хейнса і Корніш–Боуден–Ейзенталя), наведені в табл. 1 і 2 відповідно.

Оскільки $V_{\max} = k_{\text{кат}}[E]_0$, було знайдено значення каталітичної константи $k_{\text{кат}}$, а також відношення $k_{\text{кат}}/K_M$ як показники каталітичної ефективності лізоциму (табл. 3).

Нарешті, з використанням представленої в праці [16] формули розрахунку значень константи перехідної активації знайдено її значення для досліджуваних іммобілізованих зразків лізоциму за даними трьох методів визначення K_M і V_{\max} (табл. 4).

Таблиця 1: Результати визначення константи Міхаеліса

Препарат	Константа Міхаеліса K_M , мг/дм ³		
	Метод Лайнуївера–Берка	Метод Хейнса	Метод Корніш-Боуден–Ейзенталя
Лізоцим вільний	34,5	40,9	34,8 ± 3,5
Лізоцим + желатин	51,8	75,3	75,5 ± 8,1
Лізоцим + КГПВС	136,8	114,9	137,4 ± 11,6
Лізоцим + Na-КМЦ	697,2	139,9	129,5 ± 14,7

Таблиця 2: Максимальна швидкість реакції гідролізу субстрату вільним та іммобілізованим лізоцимом

Препарат	Максимальна швидкість реакції $V_{\text{макс}}$ од/мг лізоциму за хв		
	Метод Лайнуївера–Берка	Метод Хейнса	Метод Корніш-Боуден–Ейзенталя
Лізоцим вільний	63743	67599	60338 ± 2971
Лізоцим + желатин	70848	84974	89269 ± 9385
Лізоцим + КГПВС	146776	169432	193467 ± 8977
Лізоцим + Na-КМЦ	570981	146306	139703 ± 15574

Таблиця 3: Показники каталітичної ефективності вільного та іммобілізованого лізоциму

Препарат	Метод Лайнуївера–Берка		Метод Хейнса		Метод Корніш-Боуден–Ейзенталя	
	$k_{\text{кат}} \cdot \text{с}^{-1}$	$k_{\text{кат}}/K_M$	$k_{\text{кат}} \cdot \text{с}^{-1}$	$k_{\text{кат}}/K_M$	$k_{\text{кат}} \cdot \text{с}^{-1}$	$k_{\text{кат}}/K_M$
Лізоцим вільний	$1,822 \cdot 10^4$	$5,281 \cdot 10^2$	$1,932 \cdot 10^4$	$4,721 \cdot 10^2$	$1,724 \cdot 10^4$	$4,955 \cdot 10^2$
Лізоцим + желатин	$2,025 \cdot 10^4$	$3,909 \cdot 10^2$	$2,428 \cdot 10^4$	$3,224 \cdot 10^2$	$2,551 \cdot 10^4$	$3,379 \cdot 10^2$
Лізоцим + КГПВС	$4,194 \cdot 10^4$	$3,066 \cdot 10^2$	$4,842 \cdot 10^4$	$4,214 \cdot 10^2$	$5,530 \cdot 10^4$	$4,025 \cdot 10^2$
Лізоцим + Na-КМЦ	$1,632 \cdot 10^5$	$2,341 \cdot 10^2$	$4,181 \cdot 10^4$	$2,989 \cdot 10^2$	$3,991 \cdot 10^4$	$3,082 \cdot 10^2$

Таблиця 4: Константа перехідної активації

Препарат	Метод Лайнуївера–Берка	Метод Хейнса	Метод Корніш-Боуден–Ейзенталя
Лізоцим + желатин	$1,817 \cdot 10^{-5}$ моль/дм ³	$1,061 \cdot 10^{-5}$ моль/дм ³	$7,384 \cdot 10^{-6}$ моль/дм ³
Лізоцим + КГПВС	$5,146 \cdot 10^{-6}$ моль/дм ³	$7,080 \cdot 10^{-6}$ моль/дм ³	$4,5287 \cdot 10^{-6}$ моль/дм ³
Лізоцим + Na-КМЦ	$3,206 \cdot 10^{-8}$ – $4,122 \cdot 10^{-9}$ моль/дм ³	$2,482 \cdot 10^{-7}$ – $3,191 \cdot 10^{-8}$ моль/дм ³	$2,206 \cdot 10^{-7}$ – $2,836 \cdot 10^{-8}$ моль/дм ³

Примітка. КГПВС – криогель полівінілового спирту; Na-КМЦ – натрієва сіль карбоксиметилцелюлози.

Обговорення

Кінетичні дослідження лізоциму та його іммобілізованих форм проводили, використовуючи стандартний субстрат ензиму – клітини *M. lysodeikticus*.

З огляду на отримані результати, вплив використаних для отримання іммобілізованих продуктів полімерів на кінетичні характеристики лізоциму проявляється таким чином:

а) збільшенням константи Міхаеліса K_M ;
 б) збільшенням максимальної швидкості реакції $V_{\text{макс}}$;

в) збільшенням відношення $K_M/V_{\text{макс}}$ (у цьому випадку збільшенням тангенсів кутів нахилу відповідних графіків для лізоциму за наявності полімерів порівняно з вільним ензимом).

Цікавим виявився той факт, що зазначена ситуація відповідає розглянутій (у числі інших) картині перехідної активації ензимів у праці В.І. Крупянка [16].

Привертає до себе увагу близькість значень кінетичних параметрів при використанні всіх трьох методів їх визначення для вільного ферменту і розбіжність між даними для гелю з іммобілізованим лізоцимом за Лайнуївером–Берком та іншими двома методами. Це не дивно, якщо врахувати, що цей метод є, як неодноразово відзначено в літературі [11, 17, 18], найменш точним за своєю природою. Найбільшою мірою це позначається в області $[S]_0 < K_M$, тобто в найбільш інформативній, оскільки саме в цьому діапазоні залежність $V_{\text{спост}}$ від $[S]_0$ є значною.

Збільшення каталітичної константи лізоциму $k_{\text{кат}}$ цілком зрозуміле, оскільки $[E]_0$ у ході експериментів змінювалася, тоді як зменшення відношення $k_{\text{кат}}/K_M$ свідчить про зменшення швидкості зв'язування ензиму із субстратом.

Розрахунки кінетичних параметрів трьома методами показали, що на значення K_M і $V_{\text{макс}}$ лізоциму білка курячих яєць у ході лізису пептидоглікану клітинної стінки *M. lysodeikticus* меншою мірою впливає желатин, тоді як полівініловий спирт і Na-КМЦ діють значно сильніше і приблизно однаково. Що стосується $k_{\text{кат}}$, то всі три методи тут теж узгоджуються між собою в сенсі найменш помітного впливу желатину. Відносно $k_{\text{кат}}/K_M$ використання даних за Лайнуївером–Берком свідчить про найбільш слабкий вплив на цей показник желатину, а результати за Хейнсом і Корніш–Боуден–Ейзенталем вказують на полівініловий спирт як на полімер, що найменшою мірою впливає на каталітичну ефективність лізоциму.

Висновки

Показано, що дія досліджуваних полімерів (желатину, натрієвої солі карбоксиметилцелюлози і полівінілового спирту) кінетично проявляється в перехідній активації ферменту, згідно з картиною лізису пептидоглікану клітинної стінки *M. lysodeikticus*. Виявлено, що найбільшою мірою на каталітичну ефективність лізоциму впливає натрієва сіль карбоксиметилцелюлози, зменшуючи її на 37,8 %, тоді як желатин і полівініловий спирт зменшують цей показник на 31,8 і 18,8 %, відповідно.

Отримані результати мають фундаментальне і прикладне значення, оскільки доповнюють знання про кінетичні особливості функціонування іммобілізованих форм лізоциму, його взаємодію з полімерами і дають можливість оцінити каталітичну ефективність отриманих біотехнологічних продуктів.

References

- [1] Boddupalli BM, Mohammed ZN, Nath RA, Banji D. Mucoadhesive drug delivery system: an overview. J Adv Pharm Technol Res. 2010;1(4):381-7. DOI: 10.4103/0110-5558.76436
- [2] Mansuri S, Kesharwani P, Jain K, Tekade R, Jain NK. Mucoadhesion: a promising approach in drug delivery system. React Funct Polym. 2016;100:151-72. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2016.01.011
- [3] Umesh K, Khuman L, Navneet P, Lekhray, Jai P, Omkar, et al. Understanding the concept of mucoadhesive drug delivery system: a novel approach over conventional dosage forms. Res J Pharm Dosage Forms Technol. 2018;10(2):103-8. DOI: 10.5958/0975-4377.2018.00016.2
- [4] Asati S, Jain S, Choubey A. Bioadhesive or mucoadhesive drug delivery system: a potential alternative to conventional therapy. J Drug Delivery Therap. 2019;9(4-A):858-67. DOI: 10.22270/jddt.v9i4-A.3708
- [5] Dekina SS, Romanovska II, Ovsepyan AM, Molodaya AL, Pashkin II. Immobilization of lysozyme in polyvinyl alcohol cryogel. Biotechnologia Acta. 2014;7(3):69-73. DOI: 10.15407/biotech7.03.069
- [6] Dekina SS, Romanovska II, Leonenko II, Yegorova AV. Mucoadhesive gel with immobilized lysozyme: preparation and properties. Biotechnologia Acta. 2015;8(3):104-9. DOI: 10.15407/biotech8.03.104
- [7] Dekina S, Romanovska I, Ovsepyan A, Tkach F, Muratov E. Gelatin/carboxymethyl cellulose mucoadhesive films with lysozyme: development and characterization. Carbohydr Polym. 2016;147:208-15. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.04.006
- [8] Liburdu K, Benucci I, Palumbo F, Esti M. Lysozyme immobilized on chitosan beads: kinetic characterization and antimicrobial activity in white wines. Food Control. 2016;63:46-52. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.11.015
- [9] Yampol'skaya GP, Elenskii AA, Pan'kina NV, Tarasevich BN, Kulichikhin VG. Properties of carrageenan gels with immobilized lysozyme. Colloid J. 2009;71(2):271. DOI: 10.1134/S1061933X09020185
- [10] Shugar D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. Biochim Biophys Acta. 1952;8:302-9. DOI: 10.1016/0006-3002(52)90045-0
- [11] Cornish-Bowden E. Fundamentals of enzymatic kinetics. Moscow: Mir; 1979. 280 p.
- [12] Plokhinsky NA. Biometrics. Novosibirsk: Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences; 1961. 364 p.
- [13] Linnik YV. The least squares method and the foundations of the mathematical-statistical theory of processing observations. Moscow: Fizmatgiz; 1962. 354 p.
- [14] Plesov AA, Berezin IV, Rabinovich ML. Kinetics of enzymatic reactions in heterogeneous systems. Bioorganicheskaya Khimiya. 1976;2(5):680-8.
- [15] Fersht E. Structure and mechanism of action of enzymes. Moscow: Mir; 1980. 432 p.
- [16] Krupyanko VI. Correction of equations for calculating the constants of two-parameter types of inhibition and activation of enzymes. Biochemistry. 2007;72(4):473-85.

- [17] Wilkinson GN. Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem J.* 1961;80(2):324-32. DOI: 10.1042/bj0800324
- [18] Keleti T. *Fundamentals of enzymatic kinetics.* Moscow: Mir; 1990. 350 p.

О.В. Севастьянов, И.И. Романовская, С.С. Декина

ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИКИ ГИДРОЛИЗА *MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS* ИММОБИЛИЗОВАННЫМ ЛИЗОЦИМОМ

Проблематика. Резистентность возбудителей бактериальных заболеваний к антибиотикам приводит к снижению эффективности терапии инфекционных заболеваний, что в свою очередь стимулирует поиск, модификацию или создание новых антибактериальных агентов, в т.ч. лизоцим-полимерных систем. Разработка новых биотехнологических препаратов энзима с мукоадгезивными свойствами, антимикробным действием, в форме гелей, гидрогелевых покрытий или пленок, перспективных для использования в медицине, невозможна без понимания функционирования лизоцима в иммобилизованном состоянии. Поэтому исследования кинетических особенностей гидролиза субстрата свободным и иммобилизованным лизоцимом, сравнение кинетических параметров различных форм энзима является актуальной задачей.

Цель. Исследовать кинетику гидролиза клеток *Micrococcus lysodeikticus* лизоцимом, иммобилизованным в желатин, натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы и поливиниловый спирт; сравнить кинетические характеристики с параметрами свободного энзима.

Методика реализации. Иммобилизацию лизоцима в желатин, натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, поливиниловый спирт осуществляли методом включения в гель. Кинетические параметры функционирования фермента определяли по начальным скоростям лизиса клеток *M. lysodeikticus*. Результаты измерений анализировали графическими методами Лайнуивера–Берка и Хейнса, а также расчетным – Корниш-Боуден–Эйзенталя.

Результаты. Исследованы кинетические особенности реакции гидролиза клеток *M. lysodeikticus* свободным и иммобилизованным лизоцимом. Показано увеличение константы Михаэлиса K_M , максимальной скорости реакции V_{\max} и отношения K_M/V_{\max} для иммобилизованного энзима. Тенденция увеличения значений кинетических параметров сохраняется при использовании как графических методов линеаризации Лайнуивера–Берка и Хейнса, так и расчетного – Корниш-Боуден–Эйзенталя, что проявляется в переходной активации лизоцима. В свою очередь уменьшение k_{cat}/K_M свидетельствует об уменьшении скорости связывания иммобилизованного энзима с субстратом.

Выводы. В результате исследования кинетики гидролиза тремя методами показано, что действие исследуемых полимеров (желатина, натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и поливинилового спирта) кинетически проявляется в переходной активации энзима, согласно картине лизиса пептидогликана клеточной стенки *M. lysodeikticus*. Выявлено, что в наибольшей степени на каталитическую эффективность лизоцима влияет натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, уменьшая ее на 37,8 %, тогда как желатин и поливиниловый спирт уменьшают этот показатель на 31,8 и 18,8 % соответственно. Полученные результаты имеют фундаментальное и прикладное значение, поскольку дополняют знания о кинетических особенностях функционирования иммобилизованных форм лизоцима, взаимодействии энзима с полимерами и позволяют оценить каталитическую эффективность полученных биотехнологических продуктов.

Ключевые слова: лизоцим; кинетика; желатин; карбоксиметилцеллюлоза; криогель поливинилового спирта.

O.V. Sevastyanov, I.I. Romanovskaya, S.S. Dekina

FEATURES OF THE HYDROLYSIS KINETICS OF *MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS* BY IMMOBILIZED LYSOZYME

Background. The problem of the resistance of bacterial pathogens to antibiotics leads to a decrease in the effectiveness of therapy of infectious diseases, which in turn stimulates the search, modification or creation of new antibacterial agents, including lysozyme-polymer systems. The development of new biotechnological preparations of the enzyme with mucoadhesive properties, antimicrobial action, in the form of gels, hydrogel coatings or films, promising for use in medicine, is impossible without understanding the lysozyme functioning in an immobilized state. Therefore, studying the kinetic features of substrate hydrolysis by free and immobilized lysozyme, comparing the kinetic parameters of various forms of the enzyme is an urgent task.

Objective. The aim of the paper is to study the kinetics of hydrolysis of *Micrococcus lysodeikticus* cells with lysozyme immobilized into gelatin, carboxymethyl cellulose sodium salt, and polyvinyl alcohol, as well as to compare kinetic characteristics with the parameters of the free enzyme.

Methods. Immobilization of lysozyme into gelatin, sodium salt of carboxymethyl cellulose, polyvinyl alcohol was carried out by incorporation into a gel. The kinetic parameters of the functioning of the enzyme were determined by the initial lysis rates of *M. lysodeikticus* cells. The measurement results were analyzed using the Linuiver–Burke's and Haines' graphical methods, as well as the Cornish-Bowden–Eisenthal's computational method.

Results. Kinetic features of the hydrolysis reaction of *M. lysodeikticus* cells by free and immobilized lysozyme were studied. The increase in Michaelis constant K_M , the maximum reaction rate V_{\max} and the ratio K_M/V_{\max} for the immobilized enzyme was shown. The tendency to increase the values of kinetic parameters is preserved both using the graphical linearization methods of Lineuiver–Burke and Haines and the Cornish-Bowden–Eisenthal's computational method, which is manifested in the transitional activation of lysozyme. In turn, a decrease in k_{cat}/K_M indicates a decrease in the rate of binding of the immobilized enzyme to the substrate.

Conclusions. As a result of studying the kinetics of hydrolysis by three methods, it was shown that the action of the studied polymers (gelatin, sodium salt of carboxymethyl cellulose, and polyvinyl alcohol) is kinetically manifested in the transitional activation of the enzyme, according to the pattern of peptidoglycan of the cell wall of *M. lysodeikticus*. It has been revealed that the catalytic efficiency of lysozyme is most affected by the sodium salt of carboxymethyl cellulose, decreasing it by 37.8%, while gelatin and polyvinyl alcohol decrease this parameter by 31.8 and 18.8%, respectively. The results of the study are of fundamental and applied value, since they complement knowledge of the kinetic features of the functioning of immobilized forms of lysozyme, the interaction of the enzyme with polymers, and allow us to evaluate the catalytic efficiency of the obtained biotechnological products.

Keywords: lysozyme; kinetics; gelatin; carboxymethyl cellulose; polyvinyl alcohol cryogel.